



**UNIVERSIDAD MAYOR**  
FACULTAD DE CIENCIAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA  

---

Escuela de Biotecnología

**“Desarrollo de un sistema de microscopía motorizado para el estudio de sistemas biológicos inmovilizados”**

Natalie Stephanie Duchens Mura

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile  
2024



**UNIVERSIDAD MAYOR**  
FACULTAD DE CIENCIAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA  

---

Escuela de Biotecnología

**“Desarrollo de un sistema de microscopía motorizado para el estudio de sistemas biológicos inmovilizados”**

Natalie Stephanie Duchens Mura

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Jaime Andrés Rivas Pardo, PhD

Santiago - Chile  
2024

*“Dame señor la fuerza de las olas del mar,  
que hacen de cada retroceso un nuevo punto de partida”*

*- Gabriela Mistral*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Mayor, en especial a la Escuela de Biotecnología, por su participación y apoyo durante mi formación académica y profesional. Quiero expresar mi gratitud a todos los profesores que me acompañaron a lo largo de mi carrera, cuya vocación y dedicación fueron clave para seguir adelante y sacar a relucir mi potencial. En particular, a la Dra. Annette Nicole Trombert y al Dr. Ricardo Nilo, así como a los profesores que nos han dejado, Leopoldo Silva y Joaquín Ipinza, quienes marcaron mi camino y a quienes recordaré siempre. También agradezco al Centro de Genómica y Bioinformática, a los integrantes y doctores del laboratorio de Genómica Microbiana y al grupo de Biología Mecánica, como Ivana Orellana y Michelle Mendoza.

En especial, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional. A mis padres, Angela Mura y Miguel Duchens, por los sacrificios que han hecho por mí y mis hermanos, por su amor y por enseñarnos a no rendirnos. A cada uno de mis hermanos Maureen, Alain y Jean Paul, por creer en mí, brindarme su cariño y por compartir tantos momentos importantes a mi lado. Gracias por permitirme ayudarlos cuando estaban estudiando o arreglando algo; desde niña, lo único que deseaba era crecer para así pasar más tiempo con ustedes. A las parejas de mis hermanos, por compartir mi alegría y ser parte de mi vida. A todos mis sobrinos, mis hermanos chicos, por alegrar la vida de todos y confiar en su tía cuando necesitan ayuda para aprender. A mi prometido, Harry Palma, por amarme incondicionalmente y ser mi compañero de vida, por su bondad y siempre desear lo mejor para todos; no hay nadie más bueno que tú. A tus padres, quienes sin duda alguna siempre me apoyan y esperan lo mejor de mí. Con mención especial a Frankie, Luffy y Robin por acompañarme día y noche en el transcurso de todo este largo periodo académico.

Mi gratitud también va para Doris Fuentes, por compartir y transmitir su pasión por la belleza de las ciencias naturales y por lo hermoso que es aprender.

Agradezco al Estado por otorgarme la Beca de Gratuidad, una oportunidad que valoro enormemente.

Finalmente, agradezco a mí misma por perseverar.

## **INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

### Centro de Genómica y Bioinformática – Universidad Mayor

El proyecto de tesis se llevó a cabo en el Centro de Genómica y Bioinformática (CGB) de la Universidad Mayor, dirigido por la Dra. Elena Vidal. El CGB está compuesto de tres unidades dedicadas a la investigación de las ciencias básicas y aplicadas: Laboratorio de Bioinformática, Laboratorio de Genómica Vegetal y Laboratorio de Genómica Microbiana.

El tutor de tesis fue Jaime Andrés Rivas Pardo, cuyo grupo de investigación corresponde al grupo de Biología Mecánica perteneciente al laboratorio de Genómica Microbiana, dirigido tanto por el Dr. Rivas Pardo, como por el Dr. Sebastián Reyes Cerpa. Cuyas líneas de investigación independientes se comunican en la investigación de los mecanismos involucrados en las relaciones entre patógeno y hospedero.

Este trabajo de investigación, asociado al laboratorio del Dr. Rivas Pardo, fue parte del proyecto de investigación –Mechano Pharmacology of the Bacterial Adhesion– apoyado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) mediante el fondo FONDECYT 1221064. Esta propuesta involucraba dentro de sus objetivos específicos motorizar y controlar vía microcontroladores tipo Arduino un espectrómetro de fuerza.

## ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **AFM:** Microscopio de Fuerza Atómica, del inglés Atomic Force Microscope
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **BNC:** Connector BNC, del inglés Bayonet Neill-Concelman Connector
- **BSA:** Albúmina de suero bovino, del inglés Bovine Serum Albumin
- **CCD:** Dispositivo acoplado a carga
- **CNC:** Control numérico computarizado
- **CPU:** Unidad Central de Procesamiento
- **DAQ:** Tarjeta de Adquisición de Datos
- **DC:** Corriente continua, del inglés Direct Current
- **FFT:** Transformación Rápida de Fourier, del inglés Fast Fourier Transform
- **GAS:** Grupo A de estreptococos
- **GPU:** Unidad de Procesamiento Gráfico
- **HCl:** Cloruro de hidrógeno
- **IDE:** Entorno de Desarrollo Integrado, del inglés Integrated Development Environment
- **LPXTG:** Leucina-Prolina-X (cualquier aminoácido)-Treonina-Glicina
- **mm:** Milímetros
- **MP:** Posición del Magneto, del inglés Magnet Position
- **MT:** Pinzas Magnéticas, del inglés Magnetic Tweezer
- **NEMA:** Asociación Nacional de Fabricantes Eléctricos, del inglés National Electrical Manufacturers Association
- **nm:** Nanómetros
- **OP:** Pinzas Ópticas, del inglés Optical Tweezers
- **OP:** Posición Óptica, del inglés Optical Position
- **PBS:** Tampón fosfato salino, del inglés Phosphate Buffered Saline
- **PCB:** Placa electrónica de circuito impreso, del inglés Printed Circuit Board
- **PID:** Proporcional, integral y derivativo
- **PLA:** Ácido poliláctico
- **pN:** PicoNewtons
- **μM:** Micrómetro
- **RAM:** Memoria de Acceso Aleatorio, del inglés Random Access Memory
- **ROI:** Región de interés, del inglés Region of Interest
- **SMFS:** Espectroscopia de fuerza de molécula única
- **STEAM:** Ciencia, Tecnología, Ingeniería, Arte y Matemáticas, del inglés Science, Technology, Engineering, Arts, and Mathematics
- **Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

## ÍNDICE

RESUMEN .....	iii
SUMMARY .....	iv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Adhesión bacteriana .....	1
1.2 Streptococcus pyogenes y Spy0128 .....	3
1.3 Espectroscopia de Fuerza y las técnicas más relevantes .....	4
1.4 Pinzas Magnéticas .....	9
1.5 Controladores de tipo Arduino .....	12
1.6 Motorización .....	12
1.7 Proyecto de Tesis .....	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1 Hipótesis.....	15
2.2 Objetivos .....	15
2.2.1 Objetivo General: .....	15
2.2.2 Objetivos Específicos:.....	15
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Materiales .....	16
3.1.1 Componentes Ópticos.....	16
3.1.2 Componentes Estructurales .....	16
3.1.3 Componentes Electrónicos.....	16
3.1.4 Reactivos Químicos .....	17
3.1.5 Proteínas .....	17
3.1.6 Filamento de impresión 3D e impresora.....	18
3.2 Métodos .....	18
3.2.1 Diseño y Desarrollo de Piezas de Impresión 3D.....	18
3.2.2 Motorización del Espectrómetro de Fuerza.....	19
3.2.3 Preparación y funcionalización de cámaras de fluidos .....	20
3.2.4 Mediciones de fuerza biomoléculas individuales .....	22
3.2.5 Análisis Estadístico .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1 Diseño y Modelado de la Estructura y Soporte del Microscopio .....	24
4.2 Montaje Digital del Sistema Optomecánico.....	25

4.3	Diseño y Modelado del Sistema de movimiento X/Y .....	28
4.4	Impresión 3D .....	35
4.5	Ensamblado del Microscopio Invertido.....	39
4.6	Sistema Motorizado vía microcontroladores de tipo Arduino.....	48
4.7	Ensayos de estabilidad de los sistemas de movimiento XY .....	53
4.8	Ensayos mecánicos de sistemas biológicos inmovilizados.....	63
4.9	Prueba de Conceptos del Sistema Motorizado .....	72
5.	DISCUSIÓN.....	74
6.	CONCLUSIONES .....	79
7.	IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.....	81
8.	REFERENCIAS.....	83
9.	ANEXO/MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	90

## RESUMEN

La adhesión bacteriana es un proceso crucial en el inicio de la colonización de superficies abióticas o bióticas, lo cual puede desencadenar en infecciones. Las bacterias emplean estructuras filamentosas conocidas como fimbrias o pili para adherirse a la superficie de objetos o a las células del huésped. Mediante la espectroscopia de fuerza, se puede estudiar las propiedades mecánicas de biomoléculas individuales involucradas en la adhesión bacteriana. Esto se logra a través de la disposición de diferentes técnicas y equipos que permiten examinar eventos biomecánicos a escala nanométrica. En este contexto, el presente trabajo de tesis se centra en el desarrollo e implementación de un sistema motorizado para microscopia de fuerza, con el objetivo de investigar y comprender mejor la adhesión bacteriana y propiedades mecánicas de proteínas elásticas.

Para alcanzar este objetivo general, se establecieron tres objetivos específicos: ensamblar un microscopio invertido capaz de aplicar campos magnéticos, motorizar la platina del microscopio utilizando microcontroladores de tipo Arduino y, por último, detectar y analizar microesferas para ensayos mecánicos de sistemas biológicos inmovilizados. La motorización del microscopio, de la platina, permiten un control preciso de los movimientos en los ejes XY, lo que optimiza la observación y manipulación de las muestras, pero también representa un avance significativo hacia la automatización de equipos de laboratorio.

El desarrollo del proyecto implicó el diseño y producción de piezas mediante impresión 3D, la modelación digital completa del espectrómetro de fuerza, y su posterior ensamblaje. Asimismo, se llevó a cabo un sistema de movimientos XY motorizado utilizando diversos componentes electrónicos de tipo Arduino, incluyendo la realización de una prueba de conceptos. Se realizaron ensayos de estabilidad, experimentos con sistemas biológicos inmovilizados y análisis estadísticos, lo que permitió validar la funcionalidad del sistema.

Un aspecto fundamental del proyecto radica en las oportunidades biotecnológicas que ofrece. La capacidad de investigar las fuerzas involucradas en las interacciones biomoleculares proporciona un conocimiento profundo de los mecanismos que facilitan el anclaje de las bacterias a superficies, lo cual es esencial para entender el inicio de infecciones. La caracterización de las propiedades mecánicas y elástica de proteínas, como las que conforman los pili bacterianos, es clave para desarrollar estrategias de intervención que puedan interrumpir las interacciones moleculares que favorecen la colonización bacteriana. Este enfoque podría resultar en la creación de nuevas terapias dirigidas a prevenir la adherencia y el desarrollo de infecciones, con un impacto significativo en la lucha contra bacterias patógenas. Además, el sistema motorizado desarrollado no solo representa un avance técnico en la microscopía de fuerza, sino que también abre nuevas posibilidades para la investigación en biotecnología, ofreciendo herramientas adaptables y mejorables para el estudio de la microbiología y otras disciplinas relacionadas.

## SUMMARY

Bacterial adhesion is a crucial process in the onset of colonization of abiotic or biotic surfaces, which can trigger infections. Bacteria use filamentous structures known as fimbriae or pili to adhere to the surface of objects or host cells. Through force spectroscopy, the mechanical properties of individual biomolecules involved in bacterial adhesion can be studied. This is achieved through the use of different techniques and equipment that allow the examination of biomechanical events at the nanoscale. In this context, this thesis focuses on the development and implementation of a motorized system for force microscopy, with the aim of investigating and better understanding bacterial adhesion and mechanical properties of elastic proteins.

To achieve this overall objective, three specific goals were established: to assemble an inverted microscope capable of applying magnetic fields, to motorize the microscope board using Arduino-type microcontrollers, and to detect and analyze microspheres for mechanical testing of immobilized biological systems. The motorization of the microscope, the stage, allows precise control of the movement on the XY axes, optimizing the observation and manipulation of samples and representing a significant advance towards the automation of laboratory equipment.

The development of the project involved designing and producing parts using 3D printing, completing the digital modeling of the force spectrometer, and its subsequent assembly. In addition, a motorized XY motion system was created using various Arduino-type electronic components, including the execution of a proof of concept. Stability tests, experiments with immobilized biological systems and static analyses were performed, which allowed the validation of the system's functionality.

A key aspect of the project lies in the biotechnology opportunities it offers. The ability to investigate the forces involved in biomolecular interactions provides an in-depth understanding of the mechanisms that facilitate the anchoring of bacteria to surfaces, which is essential for understanding the onset of infection. The characterization of the mechanical and elastic properties of proteins, such as those that make up bacterial pili, is key to developing intervention strategies that can interrupt the molecular interactions that favor bacterial colonization. This approach could result in the creation of new therapies aimed at preventing adhesion and the development of infections, with a significant impact on the fight against pathogenic bacteria. In addition, the motorized system developed not only represents a technical advance in force microscopy, but also opens up new possibilities for biotechnology and other related disciplines.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Adhesión bacteriana

Dentro de las primeras etapas de la colonización de superficies, tanto abióticas como bióticas, se encuentra la adhesión bacteriana, un paso esencial para iniciar el proceso que permite el anclaje de las bacterias a un sustrato. En algunos casos, esta interacción crítica puede dar lugar a una infección y posterior desarrollo de patogenicidad en organismos vivos (1). La eficacia y durabilidad de la unión entre el microorganismo y el sustrato, o la superficie de la célula huésped, dependen en gran medida de las interacciones moleculares entre ambas superficies. En las bacterias, estas interacciones están medidas por la presencia de fimbrias y pili, que facilitan la adherencia (2). Estas estructuras filamentosas, están compuestas por subunidades de pilinas y adhesinas. Las proteínas conocidas como pilinas forman apéndices que se proyectan desde la membrana o pared bacteriana y pueden alcanzar longitudes extraordinarias que superan el tamaño de la propia bacteria. Las adhesinas, que se originan en la membrana citoplasmática, se ensamblan de manera jerárquica, comenzado con la incorporación de las subunidades de adhesina (2–4). Además de su papel crucial en la patogénesis, asegurando a la bacteria en la superficie, los diferentes tipos de pili desempeñan funciones adicionales asociadas a la motilidad, la transferencia de material genético e incluso la formación de biopelículas. Esto convierte a los pili bacterianos en estructuras versátiles y resilientes, capaces de resistir perturbaciones ambientales, así como fuerzas físicas y mecánicas que las mismas bacterias ejercen durante su interacción con el hospedero (1).

En el caso de muchas bacterias Gram positivas, estos “pelos” son ensamblados en el espacio extracelular de forma covalente a partir de subunidades de pilinas, en un proceso catalizado por una enzima auxiliar denominada sortasa (3). Por otro lado, el ensamblaje del pilus de las bacterias Gram negativas es algo diferente. Estas bacterias suelen tener un pilus que, a pesar de que estar constituido por cientos de repeticiones de la proteína pilina, no se encuentra unido covalentemente; sino que, las subunidades se asocian por medio de una complementariedad de plegamiento estabilizado por enlaces de hidrógeno. Esta actividad es facilitada por chaperonas residentes del espacio periplasmático, también conocida como acomodadora o Usher (4,5). El término “Gram positiva” o “Gram negativa” se refiere a la clasificación de las bacterias según la composición de la pared celular, y está relacionado con el tipo de tinción que adquieren tras ser teñidas con cristal violeta. Las bacterias Gram positivas se tiñen de morado debido a su elevada cantidad de peptidoglucano en su pared celular, mientras que las Gram negativas se tiñen de rosa, ya que poseen baja cantidad de peptidoglucano y presentan una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos (6). Esta diferencia en la estructura de la pared parece estar relacionada con variaciones en los sistemas de anclaje, lo que contribuye a la segregación de estos tipos de bacterias.

En el caso particular de los pili de las bacterias Gram positivas, para llevar a cabo el ensamblado covalente de subunidades, es necesaria la presencia de una secuencia específica de aminoácidos: Leucina-Prolina-X (cualquier aminoácido)-Treonina-Glicina, la cual es sucedida por un dominio hidrofóbico y una cadena corta cargada positivamente (3). Esta secuencia específica de aminoácidos, *LPXTG*, es reconocida por la sortasa, la cual escinde el motivo entre los residuos T y G para unir temporalmente el grupo carboxilo de la treonina al sitio activo (cisteína) de la enzima y luego es anclada a la pared celular de la bacteria (3). A continuación, la pilina sufre un ataque nucleofílico desde el grupo amino de la cadena lateral de lisina, generando de esta manera un enlace isoapéptídico entre la treonina y el motivo *LPXTG* de la siguiente subunidad, dando paso al proceso de polimerización de subunidades hasta completar el pilus, que finalmente se proyecta desde la pared celular (3,7).

Tanto en las bacterias Gram negativas como Gram positivas, las adhesinas se localizan en el extremo apical del pilus. Estas adhesinas, conocidas como lectinas, son proteínas de unión a azúcares que se encuentran en la membrana externa de la superficie bacteriana. Dependiendo del ejemplar de bacteria Gram, pueden variar en tamaño y en tipo. Por ejemplo, en microorganismos Gram negativos pueden ser monoméricas o poliméricas, mientras que en Gram positivos pueden ser cortas y rígidas o largas y flexibles (8). Las adhesinas poseen una estructura bastante conservada que les permite unirse con especificidad a componentes de la superficie del hospedero, a través de interacciones moleculares de tipo proteína-proteína o proteína-carbohidrato (5,9). Dicha interacción contribuye a un paso complementario pero esencial para iniciar la colonización, ya que una vez que el patógeno concreta exitosamente la adherencia, se dificulta significativamente su eliminación; lo que facilita el desarrollo de una posterior infección (10).

De esta manera la adherencia exitosa y sostenida, junto con la resistencia mecánica al despliegue, son factores críticos en la colonización e infección de las bacterias patógenas. La presencia de los enlaces isopeptídicos en los pili de las bacterias Gram positivas las convierte en organismos de mayor interés en términos de estabilidad en las subunidades del pilus y el anclaje que ejercen en el hospedero, a diferencia de las bacterias Gram negativas que no tienen enlaces isopeptídicos en los pili (7). La formación de este enlace intramolecular ocurre de manera autocatalítica entre residuos de lisina y asparagina, específicamente entre el grupo amino y el grupo carbonilo, en los aminoácidos respectivamente; Y constituye un esqueleto polipeptídico cuyas fuerzas físicas, ya sea de tensión o compresión u otras, afectan la interacción entre los residuos y de estos con la superficie del blanco, resistiendo mecánicamente fuerzas externas para mantener la adherencia y la forma de las subunidades de pilina (11).

Debido a lo mencionado anteriormente, estudiar y comprender los eventos biomecánicos asociados a la adhesión bacteriana, en particular el rol de los pelos de adhesión, la biogénesis del pilus, los mecanismos químicos y moleculares involucrados en la formación del enlace isopeptídico, es fundamental. Estos conocimientos no solo contribuirán a describir el comportamiento de las bacterias, sino que también podrán ser aplicados en el desarrollar nuevos fármacos o vacunas para prevenir y tratar infecciones bacterianas; destacando que los mecanismos de adhesión de las bacterias Gram positivas han sido estudiadas en menor detalle que los de las bacterias Gram negativas. Por ello, el uso de herramientas especializadas, como los espectrómetros de fuerza, resulta esencial para avanzar en este campo, ya que permiten estudiar propiedades mecánicas a nivel molecular. Con el avance de las tecnologías, se hace necesario optimizar e innovar estos instrumentos, integrando sistemas motorizados que faciliten la visualización y manipulación de sistemas biológicos inmovilizados. Este enfoque permitirá estudiar las propiedades biomecánicas de proteínas elásticas involucradas en la adhesión bacteriana, como los pili, mejorando la eficiencia y el tiempo de análisis de interacciones moleculares y mecánicas en sistemas complejos (1,8,12).

## 1.2 *Streptococcus pyogenes* y Spy0128

Existen más de 100 especies de estreptococos, los cuales se clasifican en diferentes serogrupos según la composición de sus paredes celulares y sus características antigénicas, así como en subespecies (13). Uno de los más infecciosos y exclusivos del ser humano es *Streptococcus pyogenes*, una cocácea Gram positiva, perteneciente al grupo A de estreptococos (GAS). Es una bacteria patógena oportunista, comensal en la microbiota del tracto respiratorio superior y la piel humana (1,14,15). Sin embargo, en determinadas condiciones, puede colonizar y desencadenar infecciones como faringitis, amigdalitis, impétigo, celulitis y fascitis necrosante, entre otras infecciones de la piel y tejidos blandos. Además, puede provocar enfermedades postestreptocócicas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis (14,15). Se estima que la cantidad de infecciones causadas por *S. pyogenes* son aproximadamente 181 millones de casos anuales alrededor del mundo. Aunque por lo general, las infecciones de este patógeno no son mortales, en algunos casos se transforman en enfermedades invasivas, causando cerca de 500 mil muertes al año (16,17).

*S. pyogenes* es una de las cocáceas Gram positivas más virulentas y de gran potencial patogénico; cuando se presenta la oportunidad, este microorganismo produce infecciones que comúnmente se tratan con antibióticos como los betalactámicos, a los cuales no es resistente (14,18). Sin embargo, en algunos casos es necesario combinar antibióticos para un tratamiento efectivo. Hay aislados que han presentado resistencia a antibióticos como las tetraciclinas, lo cual es un problema serio (18). Los factores de virulencia asociados a esta bacteria en particular incluyen la producción de numerosas exotoxinas, enzimas y proteínas (13,15,16). Estos factores son esenciales para colonizar la superficie de las células del huésped y evadir el sistema inmune; entre estos destaca la proteína Spy0128, que desempeña un papel importante en la adherencia y la invasión (1).

Durante la adhesión bacteriana, los pili son relevantes, ya que permiten que las bacterias se adhieran a superficies bióticas y abióticas, siendo crucial en la colonización inicial y la invasión. Los pili facilitan la interacción específica con los receptores en la superficie de las células huéspedes. La proteína Spy0128, pilina principal del pilus de *S. pyogenes*, contribuye a la formación de biopelículas y a resistir la respuesta inmune del huésped. Spy0128 naturalmente corresponde a una proteína inextensible, capaz de soportar fuerzas de hasta 800 pN, y cuya estructura está compuesta por dos dominios similares a inmunoglobulina ("Ig-like") dispuestos en tándem. Estos dominios contienen enlaces isopéptidicos intramoleculares que le confieren gran estabilidad térmica, proteolítica y también resistencia mecánica frente a la extensión, contribuyendo a una adhesión robusta a superficies y fortaleciendo la virulencia del patógeno (1,19). Debido a su papel esencial, Spy0128 es una potencial diana terapéutica. Comprender sus mecanismos de acción, junto con los de otros factores de virulencia, es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias para prevenir y tratar infecciones causadas por este patógeno. Además, el estudio de Spy0128, proporciona información valiosa sobre los eventos de plegamiento y desplegamiento de proteínas, así como las fuerzas involucradas en la adhesión bacteriana, lo que puede investigarse mediante espectroscopia de fuerza (1).

El estudio de la adhesión bacteriana mediada por Spy0128 y su rol en la virulencia de *S. pyogenes* no solo es relevante desde el punto de vista biomédico, sino también desde una perspectiva biomecánica. Estudiar cómo esta proteína interactúa con superficies y resiste fuerzas mecánicas es esencial para comprender los mecanismos moleculares subyacentes en la adhesión bacteriana. En este contexto, la espectroscopia de fuerza es una herramienta fundamental, ya que permite analizar las propiedades mecánicas y la interacción entre moléculas a nivel individual. Esta técnica hace posible medir fuerzas de adhesión molecular, procesos de plegamiento y desplegamiento, resistencia mecánica y otros

parámetros biomecánicos relevantes involucrados en la adhesión bacteriana. Los datos que aporta la espectroscopía de fuerza son esenciales para comprender cómo Spy0128 contribuye a la colonización y la patogénesis de *S. pyogenes*. Además, dichos estudios no solo permiten caracterizar las propiedades biomecánicas de Spy0128, sino que también abren nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias dirigidas a desestabilizar la estructura de los pili (1,8,12).

### 1.3 Espectroscopia de Fuerza y las técnicas más relevantes

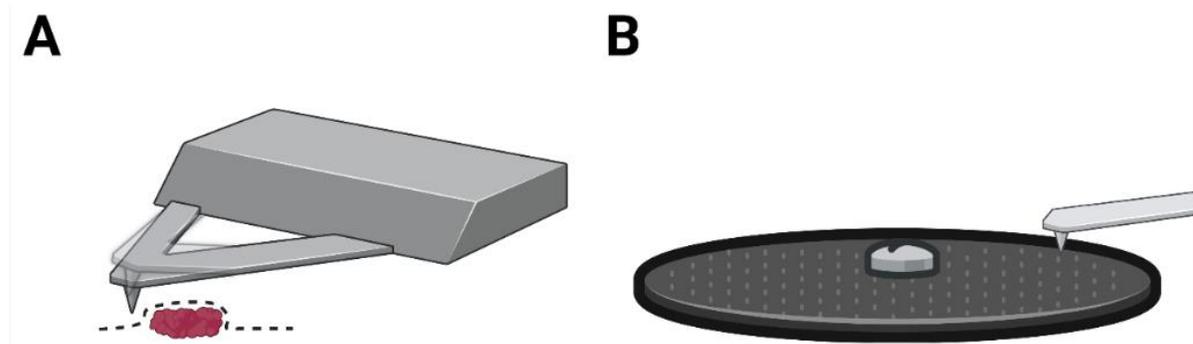
Desde el siglo pasado, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido caracterizar y manipular la fuerza a nivel molecular (20,21). La espectroscopia de fuerza permite medir y estudiar el comportamiento de biomoléculas sometidas a fuerzas mecánicas. En particular, la espectroscopia de fuerza de molécula única o SMFS (del inglés Single Molecule Force Spectroscopy) ha sido fundamental para investigar las propiedades biomecánicas y estructurales de sistemas biológicos (12), incluyendo ácidos nucleicos (ADN y ARN), lípidos, carbohidratos y proteínas. Esta técnica es revolucionaria, ha llevado la comprensión de la dinámica y estabilidad de biomoléculas a avances significativos en áreas como la biofísica, la biología estructural e incluso en la biotecnología (22,23).

Por ejemplo, para estirar una hebra de ADN se necesitan fuerzas entre  $\sim 10$  pN y  $\sim 65$  pN (24–26). Para desestabilizar la estructura de proteínas como los motores moleculares, por ejemplo, las kinesinas, se necesitan fuerzas que rondan los 4 pN a 5 pN (27,28). Para intervenir en la interacción de actina-miosina, se necesitan fuerzas superiores a  $\sim 6$  pN para romperla (29). Por otro lado, en proteínas elásticas como la titina, la proteína más grande del cuerpo humano, se requieren fuerzas de 6 pN a 8 pN para desplegarla (30). En el caso de las proteínas estructurales del pilus en bacterias, como la proteína L, involucrada en la adhesión bacteriana de *Fingoldia magna*, se necesita un rango de fuerza de entre  $\sim 20$  pN a  $\sim 45$  pN (12). Asimismo, la proteína Spy0128, que conforma gran parte del pili de *Streptococcus pyogenes*, es capaz de resistir fuerzas de hasta 800 pN (1,19), sin embargo, versiones modificadas de la proteína, en las que se interrumpen los enlaces isopeptídicos ubicados en los dos dominios de la proteína, requieren fuerzas de  $\sim 50$  pN a  $\sim 300$  pN para desestabilizar sus dominios (1,19).

La SMFS ha permitido la obtención de información detallada sobre resistencia, elasticidad, mecanismos de plegamiento y desplegamiento de proteínas y otros complejos biomoleculares, así como sobre enlaces químicos en relaciones intermoleculares (31). Esto ha demostrado la importancia de los mecanismos moleculares que los sistemas biológicos emplean para la detección, transducción y generación de fuerzas a escala biológica, como por ejemplo durante la adhesión bacteriana (22). La implementación de diversas técnicas y equipos en SMFS ha permitido visualizar y manipular biomoléculas. Por ejemplo, el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) permite obtener imágenes topológicas detalladas de biomoléculas, proporcionando información crucial sobre su estructura y dinámica (32). Las Pinzas Ópticas (OT) sirven para capturar y manipular elementos microscópicos e incluso nanométricos, permitiendo el análisis de las fuerzas ejercidas sobre estos (33). Las Pinzas Magnéticas (MT) están enfocadas en el estudio y control específico de fuerzas a niveles biológicos, permitiendo investigaciones detalladas sobre la biomecánica molecular y las propiedades físicas de las biomoléculas (12,34).

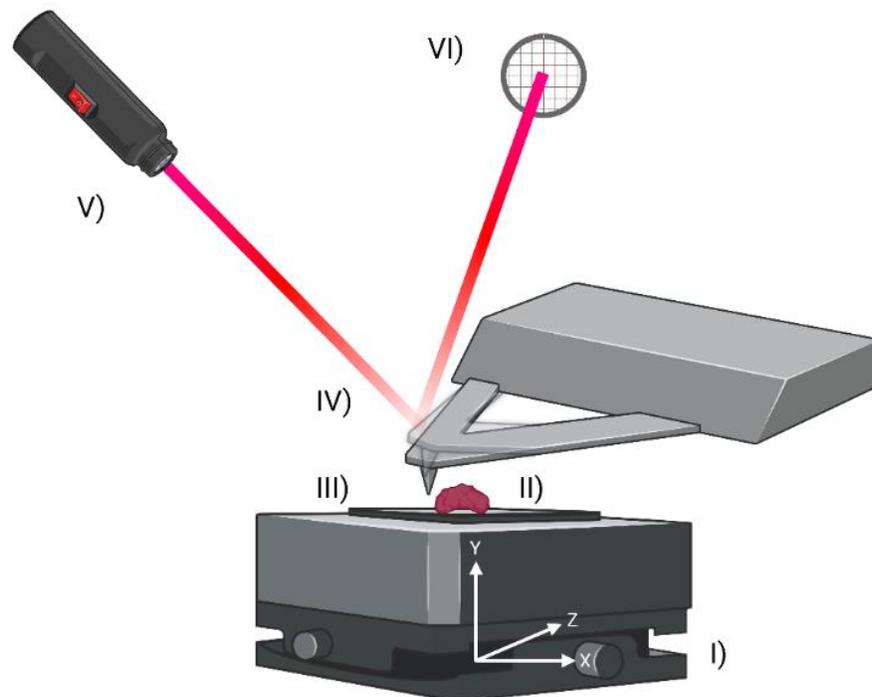
El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), desarrollado en 1986 por los científicos Binnig, Quate y Gerber (35), es una herramienta sumamente poderosa, relevante y relativamente fácil de utilizar en la espectroscopía de fuerza única (SMFS). Emplea una micropunta de aproximadamente 10 a 20 nm de diámetro en el extremo libre de un cantiléver. Esta punta permite escanear la superficie completa prácticamente de cualquier material, desde compuestos inertes como vidrio y polímeros hasta biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, entre otros (12,26,36–38).

La muestra se coloca sobre un cristal piezoeléctrico que permite movimientos tridimensionales (Eje X-Y-Z), permitiendo que la punta del instrumento entre en contacto con la superficie para obtener una imagen 3D que reconstruye a la muestra con gran precisión (26,36,39). Como analogía, el contacto de la punta del AFM con la muestra es similar al de una aguja de tocadiscos que recorre la superficie de un vinilo, captando el grabado de este (**Figura 1.1**). Además de generar imágenes detalladas, el AFM permite aplicar fuerzas que van desde los  $\sim 10$  pN hasta los  $\sim 10^6$  pN (39,40), lo que permite medir fuerzas de adhesión y propiedades mecánicas. Esta capacidad permite obtener información a nivel molecular sobre la estabilidad mecánica y la transducción de fuerza en biomoléculas individuales e incluso células (22,41)



**Figura 1.1. Analogía del funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) con un Tocadoiscos.** (A) La punta del cantiléver entra en contacto con la superficie de una muestra, el escaneo de la superficie provoca una deflexión en la punta del cantiléver, que se transduce en una señal, permitiendo obtener información de la topología de la muestra y las fuerzas. (B) De manera similar, la aguja de tocadiscos que recorre la superficie de un disco de vinilo, y las variaciones en la superficie del disco se traducen en música (B). (Los elementos de la figura no están a escala). *Preparado en con BioRender.*

La presencia de un fotodiodo es crucial para captar la deflexión generada de las interacciones entre la punta y la superficie de la muestra, y así determinar tanto la topología de la muestra como la aplicación de fuerza. Los movimientos vibratorios que sufre la punta son transmitidos al cantiléver, sobre este llega un rayo láser incidente que es reflejado, permitiendo registrar la señal de la deformación que es captada por el fotodetector, durante el escaneo el piezoeléctrico ajusta la altura (Eje Z) para obtener resultados de alta calidad y específicos (**Figura 1.2**) (26,36).



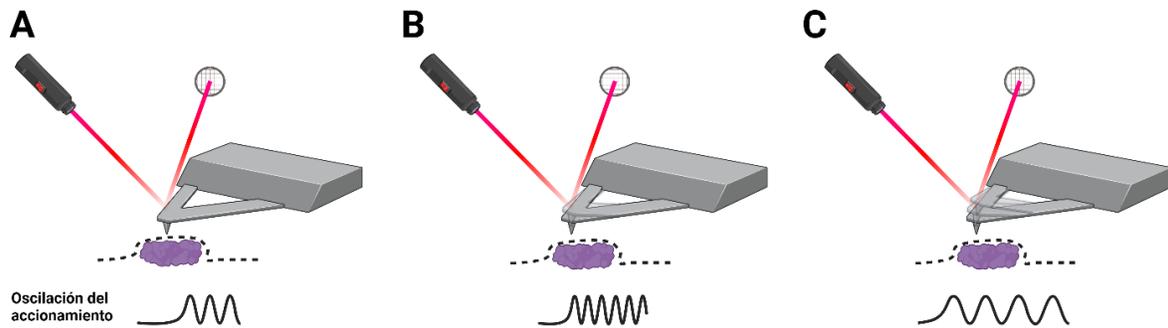
**Figura 1.2. Esquema del funcionamiento y componentes del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).** La punta del cantiléver recorre la superficie de la muestra, la deflexión que sufre es captada por un fotodiodo que recibe un rayo láser reflejado. (I) El piezoeléctrico realiza movimientos tridimensionales para cambiar la posición entre la muestra y el cantiléver; (II) la muestra puede ser un material inerte o biológica; (III) la punta del cantiléver interactúa con la muestra; (IV) el cantiléver sufre una deflexión durante la interacción con la muestra; (V) los movimientos son captados por un rayo láser; (VI) el fotodiodo detecta el rayo láser reflejado, convirtiendo la luz en una señal eléctrica. (Los elementos de la figura no están a escala). *Preparado en con BioRender.*

El AFM opera en diferentes modos: Contacto (Contact Mode), Golpeteo (Tapping Mode) y Golpeteo con Fuerza Máxima (PeakForce Tapping) (**Figura 1.3**). En el Tapping Mode, la punta y la muestra interactúan de manera intermitente debido al movimiento oscilante por parte del cantiléver. En el PeakForce Tapping, el movimiento es similar, pero con una disminución de la frecuencia de oscilación y un aumento en la amplitud. Esto incrementa enormemente la resolución de las imágenes resultantes; ambos modos de Golpeteo son configuración más apropiadas para la generación de imágenes debido a que la fuerza lateral aplicada sobre la muestra es menor, reduciendo el riesgo de daño. Mientras que, en el Contact Mode la punta y la muestra interactúan de manera continua, permitiendo un escaneo constante y además realizar estudios de fuerza, sin embargo, la fuerza lateral constante daña la muestra (26,36). Para la medición de fuerza  $\mathbf{F}$ , el cantiléver cumple con la ley de Hooke, lo cual está dado por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{F} = -k \Delta z$$

(Ecuación 1)

Donde la fuerza  $\mathbf{F}$  se calcula multiplicando la constante elástica del resorte en la punta del cantiléver ( $\mathbf{k}$ ), que representa la rigidez del material, por la diferencia en la distancia de la flexión o deformación del cantiléver ( $\Delta z$ ), permitiendo así determinar la fuerza mecánica ejercida por la muestra o sobre la muestra (42,43).



**Figura 1.3. Esquema comparativo de los modos de operación del AFM.** La punta del cantiléver recorre la superficie de la muestra, según el modo en el cual se utilice el instrumento se obtendrán imágenes topológicas de las muestras y/o mediciones de fuerza. Contact Mode (A), la punta del cantiléver interactúa de forma continua con la superficie de la muestra, este modo es ideal para los ensayos de fuerza como el estudio de la adhesión, elasticidad, entre otros. Tapping Mode (B) y PeakForce Mode (C), el movimiento oscilatorio del cantiléver a una velocidad constante resulta en un contacto intermitente entre la punta y la muestra, estas configuraciones son ideales para la obtención de imágenes de alta resolución. (Los elementos de la figura no están a escala). *Preparado en con BioRender.*

A modo de resumen, el AFM es una herramienta integral en la SMFS, ya que ofrece la capacidad de visualizar, de manera tridimensional (26), biomoléculas únicas con gran detalle y además explorar las fuerzas mecánicas que actúan sobre ellas, ampliando significativamente nuestra capacidad para estudiar y manipular las fuerzas a nivel biológico. Por ejemplo, en el campo de las ciencias como la biofísica, la biología estructural, biotecnología, entre otro. Se ha logrado comprender la cantidad de fuerza necesaria para desestabilizar proteínas (23,38,44,45), a través de ello ha sido posible entender los cambios conformacionales de éstas que además están asociados a mecanismos moleculares. Grandes hallazgos sobre la mecánica y flexibilidad de la estructura de ácidos nucleicos como el ADN han sido posible mediante el uso de AFM (26,37), además de obtener imágenes con niveles de detalle a escala atómica del ADN (23,46) de materiales inertes como el grafito (47).

Las Pinzas Ópticas (OT), desarrolladas en los 70s por el científico Arthur Ashkin, ganador del premio nobel en 2018 (48), corresponden a un instrumento que permite manipular pequeños objetos como microesferas, células y biomoléculas (48,49) Esto se logra a través del control de un láser de alta intensidad que genera un haz de luz focalizado, afectando la dinámica de partículas microscópicas en tres dimensiones y permitiendo manipular a la partícula atrapada con gran precisión (48–50). El rayo láser de alta intensidad pasa a través de un objetivo de microscopía, lo que crea un gradiente de intensidad de luz. Este gradiente genera un foco de mayor intensidad de luz que actúa como una verdadera trampa de luz para las partículas pequeñas (desde 10  $\mu\text{m}$  hasta 25 nm) cuyo índice de refracción es mayor al del medio en el que se encuentran (49,51,52). De esta manera, son atraídas al foco de alta intensidad, por la fuerza del gradiente óptico que se genera; para estudios componentes como biomoléculas se deben unir a la partícula (**Figura 1.4**). Sin embargo, esto limita el uso de este método a cierto tipo de partículas, por lo que las partículas con menor o igual índice de refracción con el medio no serán eficientes en el estudio (49,53).

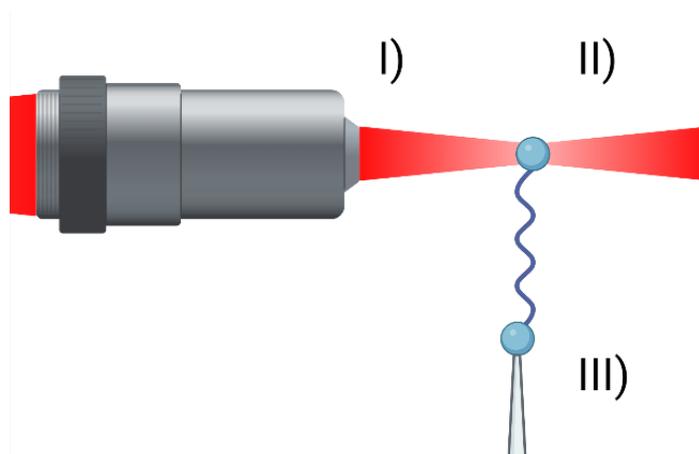
El nivel de precisión de las Pinzas o Trampas Ópticas es nanométrico; el principio por la cual dicha herramienta funciona es en base a la fuerza de radiación de la luz, de modo que la longitud de onda utilizada es sumamente importante para la generación de la “trampa óptica” (51). La interacción entre la partícula y el haz del láser genera una refracción y dispersión de la luz, el cambio en la dirección de

los fotones afecta el momento de estos, resultando en la aplicación de fuerza sobre la partícula, que va desde  $\sim 0.02$  pN a  $\sim 0.25$  nN (50,53). Las fuerzas de precisión de radiación en OT generan “fuerzas de gradiente”, responsables de atraer a la partícula en dirección del gradiente de intensidad a la “trampa”, manteniendo a la partícula en el foco del láser, y “fuerzas de dispersión”, que van en la dirección de la propagación del haz de luz, lo que empuja a la partícula. Cuando ambas fuerzas entran en equilibrio atrapan a la partícula (**Figura 1.4**) ((49,52). La relación entre la fuerza que permite atrapar la partícula y la potencia del láser está dada por la siguiente ecuación:

$$F = Q \left[ \frac{nP}{c} \right]$$

(Ecuación 2)

Donde la fuerza **F** necesaria para atrapar una partícula se calcula multiplicando el factor adimensional **Q** por el cociente del índice de refracción **n** y la potencia del rayo láser incidente **P**, dividido por la velocidad de la luz **c** en el espacio libre. La fracción  $nP/c$  representa el momento incidente por segundo en un medio con un índice de refracción dado por **n** (54–56).



**Figura 1.4. Esquema del funcionamiento de las trampas o pinzas ópticas.** Un láser de alta intensidad genera un haz de luz que es focalizado por medio de un objetivo de microscopía (I), creando un gradiente de intensidad de luz, el foco de mayor intensidad atrapa, a través del equilibrio entre la fuerza de gradiente óptico y la fuerza de dispersión, partículas pequeñas cuyo índice de refracción es mayor al del medio circundante (II). La muestra está unida por un extremo a la partícula entrampada y por el otro extremo a una molécula que se encuentra en un soporte como una micropipeta de vidrio (III). (Los elementos de la figura no están a escala). *Preparado en con BioRender.*

Así, las Pinzas Ópticas pueden emplearse para aplicar fuerzas controladas a la partícula atrapada, para estudiar propiedades mecánicas de polímeros y muestras biológicas como células, para comprender sus procesos a nivel celular o sus motores moleculares (57,58). Además, pueden utilizarse para investigar biomoléculas como ADN o ARN, para comprender su estructura, o proteínas para entender su elasticidad y adhesión (50,59). Sin embargo, el láser de alta intensidad y el calor generado por este puede dañar las muestras, afectando sus propiedades biológicas y físicas (49,50).

## 1.4 Pinzas Magnéticas

Las Pinzas Magnéticas conocidas como “Magnetic Tweezer” (MT), fueron desarrolladas en 1996 por Strick, Bensimon y Croquett con la finalidad de estudiar las propiedades elásticas de una sola molécula de ADN (25,60). Este instrumento, al igual que el AFM y el OT, es una excelente herramienta para la espectroscopía de fuerza única (SMFS), debido a su versatilidad en cuanto a la aplicación de fuerza a biomoléculas individuales (12). Sin embargo, se destaca por sobre los otros métodos debido a la capacidad para ejercer y controlar fuerzas en un amplio rango en la escala biológica, es decir, en unidades diminutas que requieren de gran precisión como picoNewtons, entre  $\sim 10^{-3}$  pN a  $\sim 10^2$  pN, para un MT sin electroimanes (24,25,31). En contraste, un MT electromagnético puede aplicar fuerzas con un rango desde  $\sim 10^{-2}$  pN a  $\sim 10^4$  pN (32,44).

El principio para la aplicación de fuerza en el MT está basado en las propiedades magnéticas de microesferas paramagnéticas (61), para ello el MT utiliza un campo magnético generado por imanes o electroimanes. El gradiente generado por el campo magnético provoca que las partículas experimenten fuerza y torque (momento de fuerza) (62,63), permitiendo una manipulación precisa y controlada; lo cual está dado por la ecuación:

$$\mathbf{F} = \nabla(\mathbf{m} \times \mathbf{B})$$

(Ecuación 3)

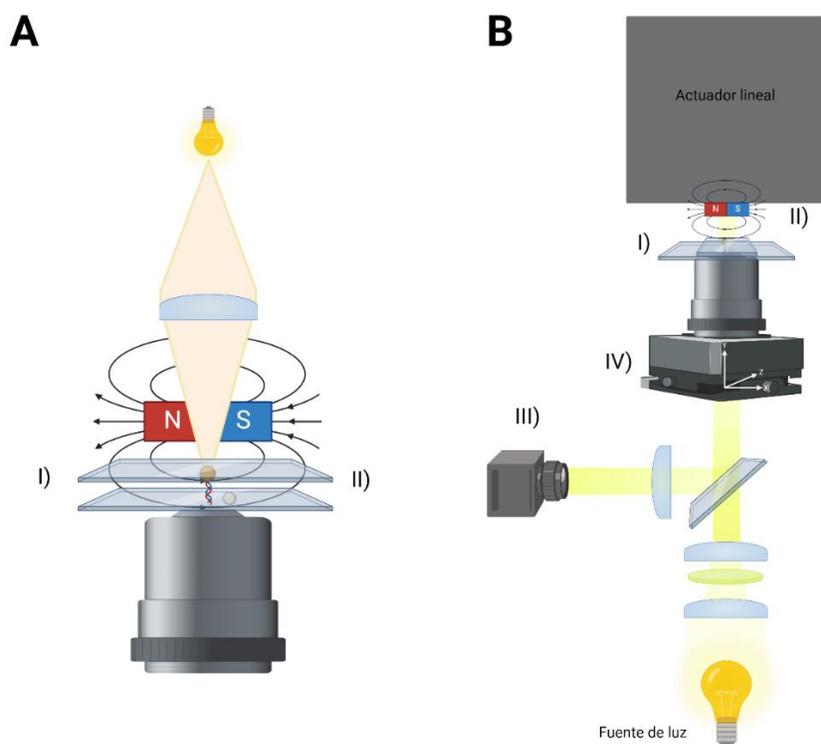
Donde la fuerza magnética  $\mathbf{F}$  actúa sobre una microesfera paramagnética con un momento  $\mathbf{m}$  en presencia de un campo magnético  $\mathbf{B}$ . El gradiente está representado por  $\nabla$ , y varía espacialmente (24,64,65).

Las Pinzas Magnéticas (MT) son consideradas como el instrumento más “sencillo” en comparación con el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) y las Pinzas Ópticas (OT). El diseño esencial del MT es el de un microscopio invertido (66); la versión básica está constituida principalmente por un par de magnetos permanentes que generan un campo magnético, una cámara para captar imágenes y un portaobjetos en donde la muestra está unida a la base del vidrio. En el extremo superior, la muestra está unida a una partícula paramagnética que es atraída por el campo magnético (**Figura 1.5**) (25,60).

El sistema sofisticado y simple de los MT radica en su capacidad para aplicar y medir fuerzas en moléculas individuales, sin emplear sistemas optomecánicos complejos como en los otros instrumentos (26,31,36,49,52). Pese a su simplicidad, los MT han sido adaptados, personalizados y mejorados. De modo que, las versiones modernas utilizan diferentes actuadores lineales para controlar el movimiento de los imanes o el desplazamiento de la muestra en el eje Z mediante un piezoeléctrico (12,67). Además, se emplean cámaras tipo CCD para mejorar la captura de imágenes para captar el movimiento a altas frecuencias (12,25), y se han desarrollado cámaras de fluidos para manejar las muestras con mayor precisión (12,25) (**Figura 1.5**). Otra mejora, es el remplazo de los imanes permanentes por electroimanes, que permiten controlar con mayor exactitud aplicación del campo magnético, además de ampliar el rango de fuerza que se puede aplicar (25,31); entre otras modificaciones que han mejorado el estudio detallado de las propiedades mecánicas, elásticas y estructurales de biomoléculas a nivel individual.

Como se mencionó anteriormente, el MT permite medir y controlar con precisión la fuerza ejercida sobre moléculas únicas a través del procesamiento de imágenes, esto es posible debido al uso de “beads” o perlas (68). Básicamente, el microscopio requiere de dos perlas; una paramagnética la cual

está unida a la muestra, y otra fija, no magnética, que sirve de referencia en términos de posición. El microscopio aplica un campo magnético generado por dos imanes permanentes para atraer las perlas paramagnéticas unidas a la muestra, como proteínas, permitiendo rastrear dichas perlas. El rastreo se realiza mediante un objetivo de inmersión anclado en un sistema piezoeléctrico que envía señales a un controlador (**Figura 1.5**) (12,67). Una fuente de luz proyecta un haz que interactúa con las perlas generando anillos concéntricos, de modo que la trayectoria de la onda lumínica cambia y varía según la aplicación del campo magnético(12). Este cambio en la trayectoria corresponde a la difracción de la luz, debido a los cambios de posicionamiento que experimentan las microesferas. Los datos sobre las fluctuaciones son capturados por una cámara CCD de alta velocidad que registra las imágenes. La difracción de la luz permite ajustar el rastreo en tiempo real y calcular la fuerza ejercida sobre la muestra a través de la posición y la distancia. Los movimientos de los anillos concéntricos son captados por la cámara se transducen al dominio de la frecuencia, donde el procesamiento de imágenes es realizado con la Transformación Rápida de Fourier (FFT) (12,33). La FFT facilita la conversión de señales entre dos dominios diferentes, permitiendo analizar las fluctuaciones y el movimiento asociado a las microesferas paramagnéticas que sufren los efectos del campo magnético (**Figura 1.5**). La variación de la amplitud de las frecuencias es comparada con una librería de imágenes generada a partir de imágenes previas a diferentes distancias tanto de la microesfera paramagnética como de la microesfera de referencia; permitiendo determinar el desplazamiento de las microesferas paramagnéticas durante ejercicios de “desplegar” (Unfolding) y “replegar” (Refolding) (12,33).



**Figura 1.5. Esquema del funcionamiento de las Pinzas Magnéticas (MT).** En las ilustraciones se representa el funcionamiento de un MT básico (A) en contraste con un MT mejorado (B). La interacción entre un campo magnético y una microesfera paramagnética unida a una molécula individual (I), como una proteína, genera fluctuaciones en la posición de la microesfera es comparado con una microesfera de referencia (II), lo cual es capturado por una cámara (III) y rastreado por un piezoeléctrico (IV), las señales captadas son enviadas a un controlador y por consiguiente a un computador. (Los elementos de la figura no están a escala). *Preparado en con BioRender.*

Diversos factores son relevantes en cuanto a la eficiencia del instrumento y la obtención de resultados precisos. Uno de los factores clave es la uniformidad del campo magnético aplicado, que depende de la calidad y el tipo de magnetos utilizados (25,69). Utilizar un solo magneto no permite aplicar torque; por ende, un par es esencial. La fuerza es proporcional a la distancia entre estos y la muestra, pues mientras más cerca estén, mayor será el gradiente del campo magnético (25). Tanto los imanes como el tipo, tamaño y propiedades magnéticas de las microesferas paramagnéticas influyen en la frecuencia y amplitud de la fuerza ejercida. Además, la distancia entre los magnetos y las microesferas paramagnéticas es crucial para aplicar la cantidad correcta de fuerza sobre la muestra, afectando la precisión y fiabilidad de los experimentos (69). Como se mencionó anteriormente, los MT más básicos utilizan magnetos permanentes, de neodimio (NdFeB) (12,25,32,69). Las microesferas paramagnéticas más utilizadas son de 2,8  $\mu\text{m}$  de diámetro, como las Dynabeads de Invitrogen M270 o M280 (Thermo Fisher Scientific) (70,71), que pueden experimentar fuerzas de entre  $\sim 10$  pN a  $\sim 100$  pN (12,25,69). Las microesferas más pequeñas permiten experimentar con fuerzas a una escala biológica muy pequeña. Sin embargo, a pesar de haber diferentes tamaños en las microesferas paramagnéticas también hay de diferentes composiciones que afectan en la experimentación, las más comunes son la mencionadas anteriormente que están conformadas por un núcleo de óxido de hierro recubierto con poliestireno (70,71).

Una característica deseable de las Pinzas Magnéticas (MT) por sobre el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) y las Pinzas Ópticas (OT) es el tiempo de experimentación. Esto hace alusión a la duración de un experimento con una sola molécula. Para ello, la resolución temporal es muy importante, ya que esta se ve afectada tanto por la composición estructural, la optomecánica, los parámetros ambientales, como la capacidad de cada instrumento, además de la naturaleza propia de las muestras biológicas en donde algunos eventos pueden ocurrir en segundos o menos (22,50,67). En el AFM, los experimentos pueden durar minutos, debido al posible daño que la muestra pueda sufrir durante el escaneo para la generación de imágenes. Por otro lado, para ensayos de fuerza, el tiempo puede extenderse a horas; pero esto depende de la calidad de la punta del cantiléver, que puede afectar la estabilidad y durabilidad de la experimentación (12,22,26). En el caso de las OT, la duración de los experimentos también depende del tipo de muestra y de los problemas asociados con la resolución temporal, así como el objetivo del ensayo. Cabe destacar, que las muestras pueden sufrir daño por luz y calor, especialmente durante ensayos de fuerza, donde la desnaturalización o degradación pueden ocurrir en cosa de minutos (22,50,72). Por lo tanto, el MT posee grandes ventajas significativas por sobre los otros instrumentos, pues se puede realizar ensayos de fuerza con una molécula individual durante periodos prolongados, con estudios documentados que han durado días (12,22,32).

Al comparar las capacidades de aplicación de fuerza, el MT destaca significativamente frente al AFM y las OT. Mientras que las OT pueden generar fuerzas en el rango de  $\sim 0.02$  pN a  $\sim 0.25$  nN al emplear la fuerza de radiación de la luz (50,53), el AFM puede aplicar fuerzas desde  $\sim 10$  pN hasta  $\sim 10^6$  pN, cuyo máximo es superior al de los otros equipos (39,40). En contraste, el MT ofrece un rango de fuerzas desde  $\sim 10^{-3}$  pN hasta  $\sim 10^2$  pN (24,25,31), con versiones electromagnéticas alcanzando  $\sim 10^{-2}$  pN hasta  $\sim 10^4$  pN (32,44), llegando a un nivel en la escala biológica más pequeño que los otros instrumentos no pueden alcanzar. Esta versatilidad del MT para aplicar y controlar un amplio rango de fuerza, combinado con la relativa sencillez del equipo y menor complejidad asociada a la experimentación (25,60,66), así como el gran tiempo de experimentación que permite con una sola molécula (12,22,32), lo posiciona como una herramienta superior, facilitando la innovación y adaptabilidad en diversas aplicaciones experimentales.

## 1.5 Controladores de tipo Arduino

Los componentes de tipo Arduino fueron diseñados y desarrollados desde el 2005 por Massimo Banzi, David Cuartielles, David Mellis, Tom Igoe y Gianluca Martino (73). Estos dispositivos se pueden emplear para casi cualquier aplicación, ya que están equipados con un microcontrolador re-programable, otorgando la posibilidad de desarrollar proyectos interactivos que combinan la flexibilidad de editar tanto el software como el hardware según las necesidades del usuario. Diversos componentes electrónicos pueden ser conectados de forma simple y rápida sin la necesidad de soldar elementos al utilizar cables dupont (73). El entorno de programación implementado para los microcontroladores de tipo Arduino es la plataforma "Arduino IDE", que permite su instalación en diferentes sistemas operativos como Linux, Windows y Mac OS (74,75). El lenguaje de programación que utiliza corresponde a C++, que se compila, lo que significa que es traducido al código máquina antes de ejecutarse, permitiendo un control preciso de los recursos microcontrolador utilizado y estableciendo un acceso directo a sus puertos, proporcionando un control eficaz y detallado (76).

Existe una infinidad de variantes de Arduino, cada una diseñada para más de un propósito específico y con diferentes características. El componente más común y esencial es la típica tarjeta Arduino UNO R3, que corresponde a una placa electrónica de circuito impreso (PCB) (77). Esta tarjeta, junto con otros modelos, facilita la innovación en todas las áreas de STEAM, ciencia, tecnología, ingeniería, artes y matemáticas (78). De esta manera, gracias a su versatilidad, los Arduino permiten innovar en los instrumentos empleados en la espectroscopia de fuerza de molécula única (Single Molecule Force Spectroscopy, SMFS). Como se mencionó anteriormente, las Pinzas Magnéticas (MT) son equipos muy versátiles en cuanto a la aplicación de fuerzas magnéticas para el estudio de las propiedades mecánicas, elásticas y de adhesión de biomoléculas únicas, como proteínas (12,33). La posibilidad de adaptar y personalizar el MT utilizando Arduino permite mejorar la experimentación y ajustar el equipo para estudios específicos, ampliando el alcance de las investigaciones científicas y biotecnológicas.

## 1.6 Motorización

La investigación en los laboratorios académicos va de la mano con una serie de elementos que son indispensables para llevar a cabo estudios y experimentos, como el uso de reactivos, instrumentos y equipos. La experimentación en sí misma puede ser extremadamente exigente en términos de tiempo y dedicación. Automatizar ciertas prácticas y equipos no solo agiliza y optimiza los resultados esperados, sino que también mejora la eficiencia y experiencia del personal, reduciendo significativamente el tiempo necesario para realizar experimentos y obtener datos. La automatización puede aplicarse tanto a herramientas manuales como a equipos complejos, y puede ser total o parcial (79). Si bien, los laboratorios industriales o clínicos son capaces de costear los equipos automatizados de alta gama y robots comerciales, los laboratorios académicos pueden beneficiarse enormemente de reproducir dispositivos de menor costo y adaptarlos a sus necesidades específicas.

El paso más vital y previo a la automatización de cualquier instrumento o equipo es la motorización. Motorizar significa dotar al equipo de componentes motorizados que permiten el movimiento controlado de sus partes. Este paso es fundamental porque, sin esto no se puede implementar un sistema de control automatizado eficaz. Al motorizar un equipo, este adquiere la capacidad de realizar movimientos precisos y repetibles de manera automática, reduciendo significativamente la tasa de error y, en algunos casos incluso, eliminándola por completo, lo que es esencial para la automatización. De esta manera, una vez que se motoriza un equipo, se pueden integrar sistemas de control y desarrollar software para automatizar sus funciones (79).

Existen diversos componentes electrónicos que sirven para motorizar instrumentos, equipos de laboratorio y más. La elección del tipo de motores a emplear depende de las necesidades específicas de cada aplicación, para ello se deben considerar diversos factores como la velocidad, torque y costos. Entre los tipos de motores hay de corriente continua (DC)(80), servomotores y motores a paso (stepper motors) (81,82). Estos últimos son especialmente importantes en la instrumentación científica debido a su alta precisión en el control del posicionamiento, algo vital para estudiar fenómenos biológicos a escala biológica. Los pulsos eléctricos permiten controlar su posición, moviéndose en “pasos”, es decir, completan una rotación de 360° dependiendo de la cantidad de pulsos y el ángulo de rotación (82,83). Además, pueden ser controlados por Arduino, lo cual es relevante para una fácil integración y programación en proyectos de motorización y automatización, destacando la posibilidad de adaptar tanto el software como el hardware de Arduino a las necesidades específicas de cada proyecto (73,78).

Una analogía muy interesante tiene que ver con el proceso de evolución de la costura (79,84). Al pensar en lo laborioso que es coser a mano, se comprende la importancia de la motorización y automatización en la vida cotidiana y en el desarrollo que ha sufrido la industria textil. Con el tiempo, se han desarrollado instrumentos que son capaces de abarcar diversas necesidades en cuanto a costos, usos y la magnitud de la producción, por ende, existe la oportunidad de utilizar versiones manuales, semi manuales, motorizadas y automatizadas, siendo esta última la más costosa (79,84). En contraste, en el caso de las Pinzas Magnéticas utilizadas en la espectroscopia de molécula única, existen pocas alternativas, ya que no hay instrumentos de este estilo en particular que estén motorizados y tampoco automatizados. Por lo que lo más entendible para un laboratorio, es desarrollar y personalizar uno para especializar el estudio que se lleva a cabo.

## **1.7 Proyecto de Tesis**

La adhesión bacteriana es un paso crucial para la colonización de superficies bióticas y abióticas, siendo fundamental para el desarrollo de infecciones. Este fenómeno es de gran importancia en las ciencias biológicas, como la microbiología, la biofísica, biotecnología y la biomedicina. Comprender los eventos biomecánicos relacionados con la adhesión bacteriana a nivel de moléculas únicas es esencial para desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de infecciones. Para ello, es necesario estar a la vanguardia, de modo que el apoyo de STEAM (Ciencia, Tecnología, Ingeniería, Arte y Matemáticas) es imprescindible para optimizar la investigación. En este contexto, la espectroscopia de fuerza única (SMFS), utilizando las Pinzas Magnéticas (MT), se presenta como una herramienta prometedora, capaz de medir y aplicar fuerzas a escala biológica en un amplio rango de piconewtons (pN). Sin embargo, la necesidad de optimizar y automatizar estos sistemas es evidente para mejorar la eficiencia y reproducibilidad de los experimentos, lo cual es costoso para grandes laboratorios y la industria, pero no para los laboratorios de investigación académica. Por lo tanto, se propone combinar la experiencia de las ciencias biológicas con la tecnología para desarrollar e implementar un innovador sistema motorizado para microscopia de fuerza, como una alternativa económica y previa a la automatización del estudio de la adhesión bacteriana a nivel de moléculas individuales.

El diseño propuesto se basará en la adaptación y optimización de un equipo de microscopia disponible en el Laboratorio de Genómica Microbiana (85), para poner a prueba la versatilidad del MT y mejorar la precisión de las mediciones. El microscopio será de bajo costo y la metodología del proyecto se dividirá en varias fases. En primer lugar, se realizará el diseño completo del microscopio utilizando el software Fusion 360, donde se establecerán los componentes optomecánicos, estructurales y electrónicos del sistema, permitiendo su simulación y renderización en la nube. Varios componentes

estructurales y de soporte serán fabricados mediante impresión 3D con filamentos de ácido poliláctico (PLA+), el resto serán de aluminio, asegurando un diseño económico y sostenible. Para motorizar el espectrómetro de fuerza, se diseñará una platina motorizada utilizando componentes de Arduino y motores paso a paso NEMA8. Este diseño se comparará con dos platinas manuales de movimientos XY: una "Original" con un sistema de movimientos manuales por un microcontrolador comercial y una "Manual 3D" completamente realizada en impresión 3D. El software que controlará el instrumento estará escrito en el lenguaje de programación C++, permitiendo un control preciso y ajustable de los movimientos XY del sistema "Motorizado".

Para llevar a cabo el estudio de la adhesión bacteriana, se utilizará la proteína Spy0128 como modelo sencillo para experimentación, de modo que se deberá clonar y expresar en un sistema recombinante de *Escherichia coli* de la cepa BL21 pLysS. Además, se prepararán y tratarán adecuadamente cámaras de fluidos para garantizar la correcta funcionalización y adherencia de las muestras experimentales. El objetivo de este proyecto es desarrollar un sistema de microscopia de fuerza motorizado que sea económico, eficiente y capaz de optimizar los tiempos de análisis, mejorando la precisión y reproducibilidad de los resultados experimentales. La integración de tecnología de motorización y automatización en los equipos de laboratorio no solo representa una mejora técnica significativa, sino que también responde a la necesidad estratégica de impulsar la investigación científica y tecnológica. Este proyecto de tesis propone un enfoque innovador para el estudio de sistemas biológicos inmovilizados; a través del desarrollo e implementación de un sistema motorizado para espectroscopia de fuerza, se evaluarán mecanismos biomecánicos fundamentales, como el desplegamiento de los dominios I27 de la proteína modificada Spy0128. Esto contribuirá de manera significativa al campo de la biología y biotecnología, al proporcionar una herramienta accesible y versátil que optimice recursos y mejore los experimentos de investigación. Además, permitirá avanzar en la comprensión de los mecanismos biomecánicos involucrados en la adhesión bacteriana, ofreciendo nuevas perspectivas para el desarrollo de tratamientos y tecnologías en el ámbito biomédico e industrial.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

“El desarrollo de un sistema motorizado para el control de un espectrómetro de fuerza permite explorar por horas los mecanismos de adhesión bacteriana/ proteínas elásticas”

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo General:

- ❖ Desarrollar e implementar un sistema motorizado para microscopia de fuerza para el estudio de la adhesión bacteriana/ proteínas elásticas.

#### 2.2.2 Objetivos Específicos:

1. Ensamblar un microscopio invertido con la habilidad de aplicar campos magnéticos.
2. Motorizar y controlar vía microcontroladores tipo Arduino el espectrómetro de fuerza.
3. Detectar y analizar microesferas para ensayos mecánicos de sistemas biológicos inmovilizados.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Componentes Ópticos

Los componentes ópticos utilizados para el desarrollo del instrumento corresponden a lentes de tipo plano convexo con diferentes puntos focales, denominados “Coated Plano Convex Lens” (Los modelos específicos son: LA1951-B - Ø25.4 F=25.4; LA1608-B - Ø25.4 F=75.0; LA1509-B - Ø25.4 F=100.0), También se utilizó un espejo dicróico 50:50 para reflejar y transmitir luz (BSW10R 50:50 UVFS Plate Beamsplitter) y un filtro de banda de paso alto (FGL495 - Ø25 mm GG495, 495 nm). Estos lentes fueron adquiridos de Thorlabs. Para aumentar la resolución y claridad de la imagen de la muestra, se empleó un objetivo de inmersión Motic 100x (PANTHERA OBJECTIVE - PLAN ACHROMAT UC 100X/1.25/ S-OIL (WD=0.16MM) - (1101001705251)). Para preparar las cámaras de fluidos, se utilizaron dos cubreobjetos de TED PELLA INC (260164 SuperSlip® Cover Glass de 24 x 40 mm; 260140 Micro Cover Glass de 22 x 22 mm). Finalmente, se usó un diafragma (CP20S - 30 mm Cage System Iris Diaphragm) para variar la incidencia de luz.

##### 3.1.2 Componentes Estructurales

Los componentes estructurales descansan sobre una base de acero inoxidable de 90x90 cm de 100 kg, soportada por tapones de silicona sobre una mesa de granito. El espectrómetro de fuerza está montado principalmente en dos perfiles de aluminio 6063-T5 (V-slot) tipo C de 80x40 mm, sobre una plataforma de aluminio de 20 x 20 cm. Para incorporar las piezas ópticas, se utilizaron diversas monturas de Thorlabs (CBB1/M - 30 mm Cage System U-Bench; CP35/M - 30 mm Cage Plate; CP36 - 30 mm Cage Plate; CP38 - Ø2" Outer Diameter Round Cage Plate with SM1 Internal Thread). Además, se utilizó un cubo para un espejo dicróico (CM1-DCH/M - 30 mm Cage Cube with Dichroic Filter Mount). Las monturas se unieron entre sí mediante barras lineales de aluminio cortas y largas (ER6, ER2 - Cage Assembly Rod), y varios adaptadores (RMSA3, SM1A17 y SM1A4).

Para aplicar el campo magnético, se utilizó un par de imanes de neodimio NdFeB grado N52 (K&J Magnetics). Para movilizar el piezo-objetivo en el rango de los micrómetros se empleó un actuador lineal manual (SM1ZA - Z-Axis Translation Mount, 30 mm Cage Compatible). Para mover la platina el eje horizontal (XY), se utilizaron tres opciones diferentes: Un sistema en miniatura que permite realizar movimientos de precisión a nivel microscópico (XY Linear Platina, Miniature, 0.125 in. Travel, 0.55 lb. Load, Newport) denominado “**Original**”. Un componente estructural diseñado completamente en impresión 3D, llamado “**Manual 3D**”. Y una versión motorizada del diseño anterior, apodado “**Motorizado**”.

##### 3.1.3 Componentes Electrónicos

Para la confección y control del sistema de movimientos XY “Motorizado”, se utilizó una tarjeta Arduino UNO R3 SMD, junto con motores a paso Nema 8 (8HS11-0204S, 1,8°, 4.8V, 0.2A). Los motores fueron controlados mediante controladores Pololu A4988 y una tarjeta CNC shield, que permite controlar hasta cuatro motores a paso. Para la conducción del instrumento, se empleó un joystick. Las conexiones se realizaron con cables dupont (HH), y tanto los motores como la tarjeta Arduino fueron alimentados por una fuente de poder regulable seleccionable (BA2122A, Best America, 12VDC-2A).

Para la estabilización de la imagen y enfoque automático mediante el control de movimientos precisos en el eje Z, se utilizó un piezoeléctrico (P-725.CDD, Physik Instrumente). La captura de imágenes se realizó con una cámara de alta velocidad (MQ013MG-ON, 1.3 MP, 210 fps, 1280x1024 pixels, Monochrome CMOS, Ximea). La iluminación de las cámaras de micro fluidos fue proporcionada mediante una fuente de luz blanca proveniente de un LED ((MCWHL6-C1 - 6500 K, 548 mW, 1200 mA).

El control del campo magnético se realizó con un actuador de enfoque lineal (LFA-10 +, servoamplificador SCA814, Equipment Solutions), capaz de moverse 10 mm con un rango de resolución de 50 nm y un circuito PID. En cuanto a la adquisición de datos y el control del LFA-10 + y el piezoeléctrico, se utilizó una tarjeta de adquisición de datos (DAQ, NI USB-6341, National Instruments). Para las conexiones y comunicación se llevaron a cabo utilizando cables de tipo BNC estándar y un computador con CPU AMD Ryzen 7, GPU NVIDIA 2070 super, 16GB RAM y SSD M.2.

### 3.1.4 Reactivos Químicos

Para la preparación de las cámaras de fluidos se utilizaron diversos reactivos, entre ellos; Hellmanex III (1%) (Hellma, Z805939), (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES, Sigma Aldrich, 281778-5ML), glutaraldehído (Sigma Aldrich, G7776-10mL (-20C)), buffer fosfato salino (PBS), buffer tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), buffer ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES), albumina de suero bovino (BSA), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), ligando de HaloTag (04 amino ligando 5mg/mL en DMF/DMSO, Promega, P6741 (-80C)). Para la experimentación con biomoléculas, se utilizaron microesferas paramagnéticas funcionalizadas con estreptavidina de 2,8 μm (Dynabeads M-270 Streptavidin, Invitrogen, 65305) y microesferas de referencia de poliestireno de 2,5 μm funcionalizadas en su superficie con grupos aminos (Amino-polystyrene Beads 2.5-2.9 μm, Spherotech, AP-25-10). Además, se empleó aceite de inmersión (IMMOIL-F30CC, Microscopes-Immersion Liquids for Light Microscopy, Olympus).

### 3.1.5 Proteínas

El sistema de aplicación de campos magnéticos del espectrómetro de fuerza, conocido como Pinzas Magnéticas, fue previamente calibrado utilizando la proteína L de *Finogoldia magna* expresada en la cepa ERL de *Escherichia coli*, siguiendo la Ley de magnetos ya publicada anteriormente (12).

Para la experimentación con sistemas biológicos inmovilizados, se utilizó la proteína recombinante Spy0128 de *Streptococcus pyogenes*. Esta proteína fue expresada en el laboratorio de Genómica Microbiana por el Grupo de Biología Mecánica, utilizando el vector pFN18A y la cepa BL21 pLysS de *Escherichia coli*.

La proteína recombinante Spy0128 incluye una secuencia Avi-Tag en su extremo superior, previamente biotinilada en el laboratorio. Este proceso, catalizado por la enzima biotina ligasa BirA, consiste en la unión covalente de una molécula de biotina al grupo amino de un residuo específico dentro de la secuencia Avi-Tag. De esta manera, la secuencia Avi-Tag biotinilada permite la interacción y unión con la estreptavidina presente en las microesferas paramagnéticas M270. Por otro lado, en el extremo inferior, la proteína incorpora una secuencia Halo-Tag, que al interactuar con su ligando Halo; como se describe en la sección de *Métodos*, “Preparación y funcionalización de cámaras de fluidos”, permite la adhesión de la proteína a la superficie del vidrio. Además, el constructo proteico incluye tres dominios estables y elásticos, similares a inmunoglobulinas, denominados I27, los cuales se encuentran intercalados entre dos segmentos de Spy0128.

### 3.1.6 Filamento de impresión 3D e impresora

Para la fabricación de los componentes de impresión 3D se utilizó el ácido poliláctico (PLA+), específicamente los filamentos Black PLA+ y Silver PLA+ de la marca eSUN. Los componentes estructurales y las distintas platinas del microscopio fueron impresos utilizando la impresora 3D Ender 3 V3 KE de Creality.

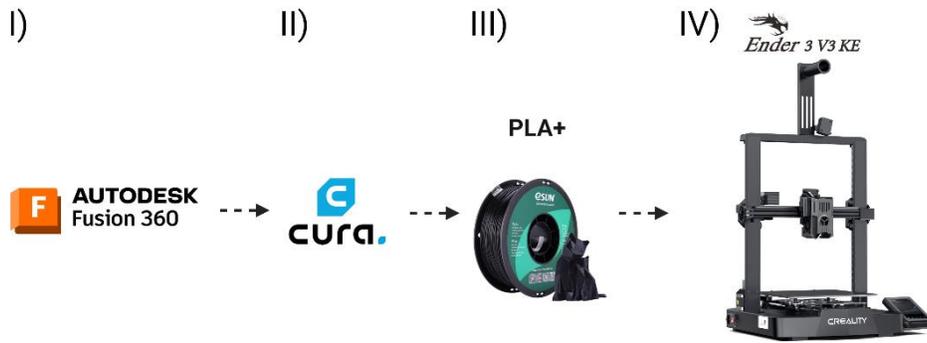
## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Diseño y Desarrollo de Piezas de Impresión 3D

El diseño del microscopio se basó en la continuación de un modelo previamente implementado en el laboratorio por el Grupo de Biología Mecánica. Todo el microscopio, incluyendo los componentes optomecánicos, estructurales, electrónicos y las tres alternativas de platina, fue diseñado en "Fusion 360", un programa de AutoDesck que facilita el diseño, simulación y renderización de componentes tridimensionales en la nube. Los elementos ópticos del microscopio fueron adquiridos en su mayoría de Thorlabs (*ver sección de Materiales, "Componentes ópticos"*). Para integrarlos al diseño, se descargaron los archivos en formato "SolidWorks" de estos componentes desde la página web de Thorlabs y se importaron a Fusion 360, permitiendo llevar a cabo el ensamblado de las piezas que conformarían el sistema óptico del microscopio (**Figura 3.1**). Otros componentes, como los elementos electrónicos, provinieron de Cimech3D, National Instruments, Physik Instrumente y Ximea. Los componentes que no contaban con la alternativa de descargar el modelo 3D directamente desde la página de cada entidad se obtuvieron de "GRABCAD".

Posterior al ensamblado del sistema óptico del microscopio, en el mismo programa Fusion 360 se planteó el diseño de las estructuras que se imprimirían en 3D, tales como las piezas de soporte general y las diferentes opciones de platinas del microscopio. Para ello, se utilizó la opción de "Boceto" en el programa, y luego se extruyeron las piezas a partir de los dibujos planteados para otorgarles dimensionalidad y visualizarlas. Cabe destacar que las piezas se fueron modificando y perfeccionando a través de ensayo y error. Una vez finalizado el proceso de modelado de dichos componentes, se exportaron como "malla" en formato ".stl". Estos archivos se importaron en UltiMaker Cura, un programa encargado de traducir las coordenadas necesarias para la impresora 3D y establecer los parámetros de impresión (**Figura3.1**).

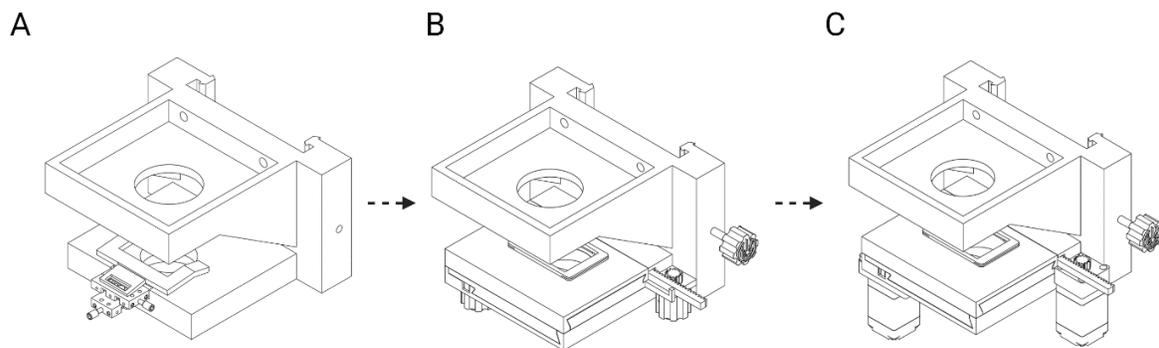
Posteriormente, los componentes de impresión 3D se imprimieron utilizando la impresora 3D Ender 3 V3 KE de Creality, con los filamentos Black PLA+ y Silver PLA+ de la marca eSUN (**Figura3.1**). Esta combinación de herramientas y materiales permitió crear componentes precisos y funcionales, esenciales para el ensamblaje y funcionamiento óptimo del microscopio diseñado.



**Figura 3.1. Diagrama del proceso de diseño e impresión 3D del microscopio.** (I) El diseño del microscopio se modeló por completo en Fusion 360, los archivos de impresión 3D finalizados se exportaron en formato “stl” para su posterior procesamiento. (II) Los archivos “stl” se importaron en UltiMaker Cura, donde se configuraron los parámetros de impresión. (III) Los componentes estructurales y las diferentes platinas fueron impresos en 3D utilizando filamento PLA+ de la marca eSUN, (IV) en la impresora Ender 3 V3 KE de Creality. *Preparado en con BioRender.*

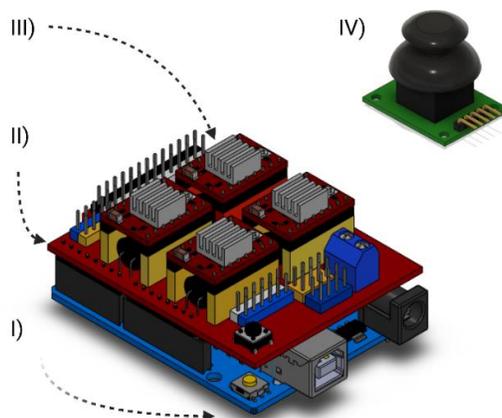
### 3.2.2 Motorización del Espectrómetro de Fuerza

Con la finalidad de desarrollar un microscopio de menor costo e innovador que optimicé el tiempo de investigación y esté específicamente adaptado para los experimentos realizados en el laboratorio, se planteó motorizar el espectrómetro de fuerza. Inicialmente, se diseñó una platina “Original” que sirvió como punto de referencia para establecer parámetros estándar en las futuras opciones. La platina “motorizada” surgió como una adaptación de la opción “Manual 3D”, ofreciendo una alternativa más económica a la del modelo “Original” (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2. Comparación de las tres alternativas de platina.** (A) El diseño “Original” compuesto por un sistema de movimiento XY de Newport; (B) el sistema “Manual 3D”, una alternativa completamente realizada en impresión 3D que ofrece un reemplazo económico y accesible al sistema original; y (C) el sistema “Motorizado”, corresponde a una adaptación del sistema “3D manual” equipada con motores paso a paso, controlados por microcontroladores de tipo Arduino.

El diseño de la platina motorizada incluyó el uso de microcontroladores de tipo Arduino, para un control preciso y con la opción de editar tanto software como hardware. Se implementaron dos motores de paso a paso NEMA 8 (**Figura 3.2 C**) junto con una tarjeta Arduino UNO R3 SMD, un CNC Shield, dos Driver A4988 y un módulo de joystick (**Figura 3.3**), utilizando cables dupont para establecer las conexiones necesarias. La fuente de poder utilizada fue una regulada seleccionable (12V-DC-2A). Para la programación del sistema, se utilizó el lenguaje C++ en el entorno de desarrollo Arduino IDE.



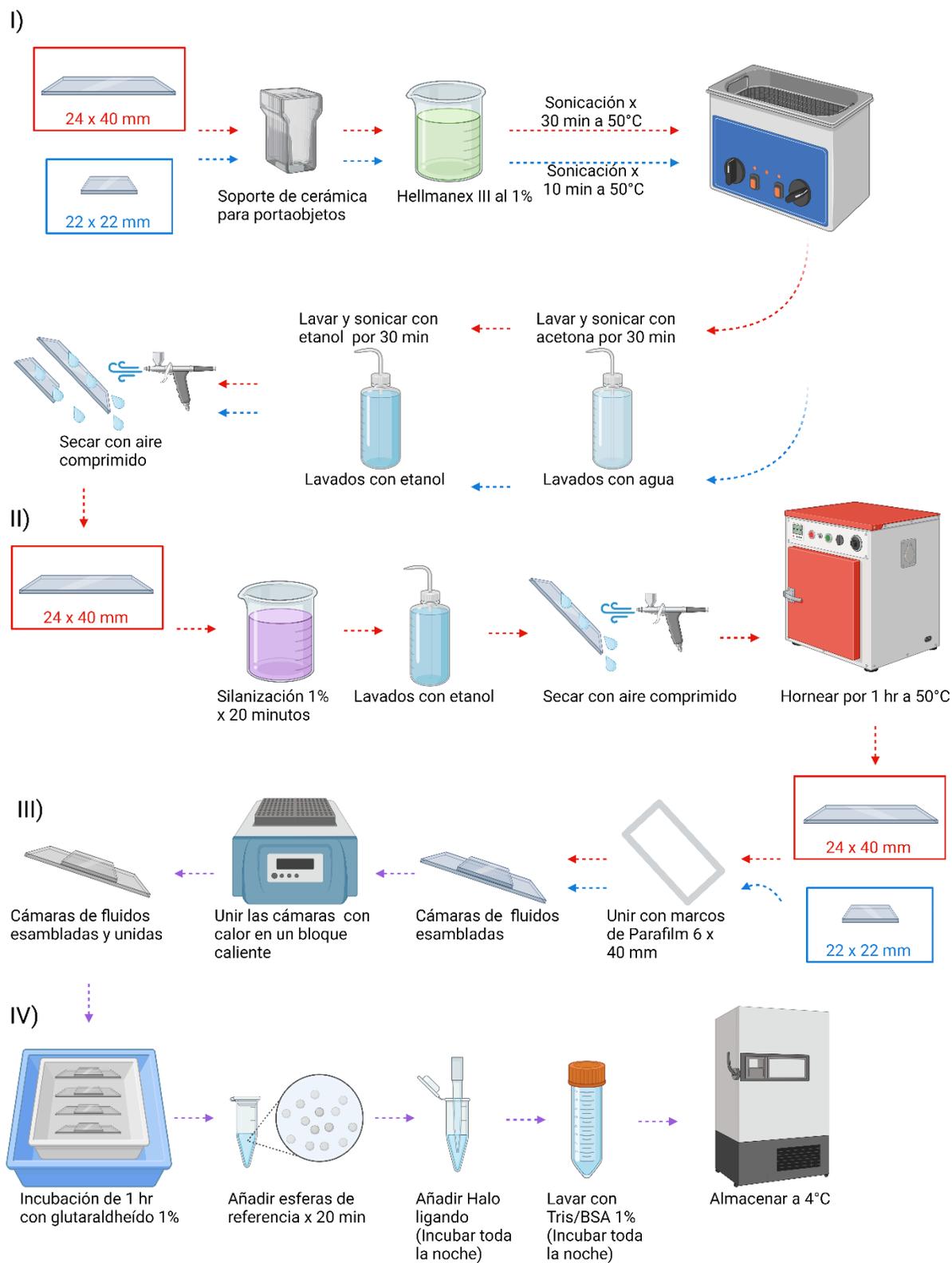
**Figura 3.3. Configuración del sistema electrónico para el control de la platina motorizada.** (I) Tarjeta Arduino UNO R3 SMD, (II) CNC Shield para el control de máquinas motorizadas, (III) dos controladores de motores paso a paso Pololu A4988 y un módulo joystick para controlar el movimiento (IV).

### 3.2.3 Preparación y funcionalización de cámaras de fluidos

Para realizar experimentos en el espectrómetro de fuerza, Pinzas Magnéticas, se deben preparar cámaras de fluidos. Para su confección, se utilizaron dos cubreobjetos de TED PELLA INC (260164 SuperSlip® Cover Glass de 24 x 40 mm; 260140 Micro Cover Glass de 22 x 22 mm), unidos por un marco rectangular cortado cuidadosamente de un Parafilm. Antes de unir ambas láminas de vidrio delgado, los cubreobjetos de 24 x 40 mm se limpiaron con detergente Hellmanex III al 1% durante 30 minutos en un Sonicador a 50°C. Posteriormente, se lavaron y sonicaron con acetona por 30 minutos, seguido de un nuevo lavado con agua y sonicación con etanol molecular por 30 minutos, finalizando con un secado mediante aire comprimido. Los cubreobjetos de 22 x 22 mm, por su parte, se limpiaron con detergente Hellmanex III al 1% durante 10 minutos en un Sonicador a 50°C, seguido de lavados con agua y etanol molecular, concluyendo con un secado mediante aire comprimido (**Figura 3.4**).

Posteriormente, los cubreobjetos de 24 x 40 mm fueron silanizados al 1% mediante inmersión durante 20 minutos, seguidos de lavados con etanol molecular y un secado con aire comprimido, antes de ser horneados por una hora a 100°C. Una vez completados los pretratamientos individuales de ambas láminas de vidrio, se procede al ensamblado de las cámaras de fluidos. Se ubican láminas de película de parafina (Parafilm) recortadas con forma de marcos de 6 x 40 mm entre ambos cubreobjetos para unirlos y de funcionar como espaciador entre ambos vidrios. Luego, las cámaras ensambladas son dispuestas en un bloque caliente a 90°C con el objetivo de derretir el Parafilm y unir las piezas. Finalmente, se utilizó un lápiz hidrofóbico para marcar líneas en el cubreobjeto de 22 x 22, lo cual evita derramar con líquidos la parte superior de la cámara de fluido (**Figura 3.4**).

Una vez que las cámaras de fluidos están ensambladas y unidas, se procede a realizar un pretratamiento de las superficies. En donde las cámaras son incubadas durante 1 hora con una solución al 1% de glutaraldehído diluido en PBS (amortiguador fosfato pH 7.4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 27 mM). Posteriormente, se retira el exceso de disolución y se añaden 100 µL, 200x, de microesferas de referencia de poliestireno no magnéticas de 2,5 µm (Spherotech), a una concentración de 0,025% diluido en PBS, dejándolas actuar por 20 minutos. Luego se retira el exceso y se deja toda la noche con 100 µL de ligando Halo diluido en PBS a una dilución de 500x. Finalmente, las cámaras se lavan y se funcionalizan con un amortiguador Tris/BSA 1% (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA 1% p/v) durante toda la noche y son almacenadas en una cámara húmeda a 4°C (**Figura 3.4**).

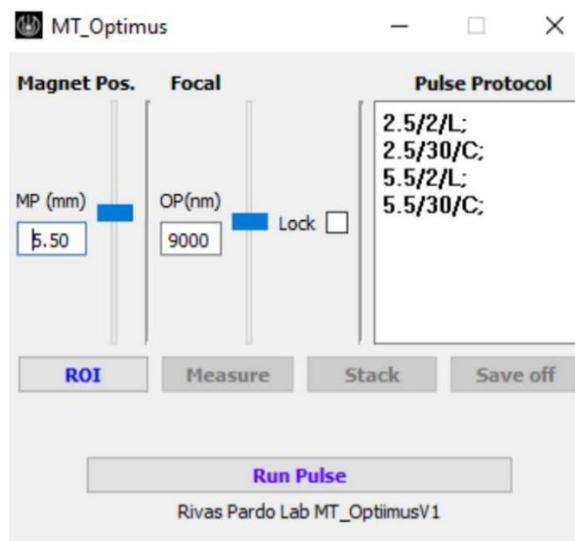


**Figura 3.4. Diagrama de la preparación y ensamblado de las cámaras de fluidos.** (I) Preparación de cubreobjetos; (II) silanización y horneado; (III) ensamblaje y unión de cámaras de fluidos; (IV) pretratamiento y almacenado a 4°C. Preparado en con BioRender.

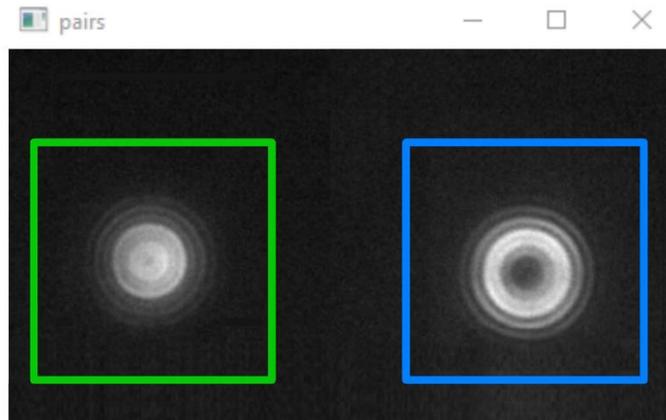
### 3.2.4 Mediciones de fuerza biomoléculas individuales

Para realizar mediciones de fuerza en biomoléculas individuales, como proteínas, en un microscopio de Pinzas Magnéticas, se utilizan cámaras de fluidos. Tras realizar los pretratamientos y postratamientos de las cámaras de fluidos, estas estarán listas para su utilización. Para comenzar la experimentación con proteínas, por ejemplo, la proteína Spy0128 de *S. pyogenes*, se deben lavar tres veces la cámara almacenada a 4°C con HEPES/BSA 1% (Hepes pH 7.2 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, BSA 1% p/v). Después de retirar el exceso, se añade una disolución de la proteína en PBS a una concentración entre 1 a 10  $\mu\text{M}$  por 20 minutos; en este caso, se utilizó una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Luego, se lava nuevamente con HEPES/BSA 1% y se añade una alícuota de 60  $\mu\text{L}$  de microesferas paramagnéticas de estreptavidina (Dynabeads M-270, Invitrogen), solución que fue preparada previamente a partir de 30  $\mu\text{L}$  de microesferas de estreptavidina en 1000  $\mu\text{L}$  de HEPES/BSA 1%, y que estaba en constante agitación en un rotor. Las microesferas paramagnéticas se unirán a la proteína modificada ya que esta incluye una secuencia Avi-Tag en su extremo superior, la cual fue previamente biotinilada en el laboratorio. Este proceso, catalizado por la enzima biotina ligasa BirA, consiste en la unión covalente de una molécula de biotina al grupo amino de un residuo específico dentro de la secuencia Avi-Tag. De esta manera, la secuencia Avi-Tag biotinilada permitirá la interacción y unión con la estreptavidina presente en las microesferas paramagnéticas M270.

El software de medición que se utiliza para la experimentación se denomina “MT\_Optimus” (Figura 3.5), este proviene de una adaptación previa realizada por el Grupo de Biología Mecánica. En primera instancia, se debe ubicar una microesfera paramagnética que presente un movimiento pendular moderado y luego una microesfera de referencia lo más próxima a esta (Figura 3.6). Se selecciona la región de interés (ROI) y se realiza una librería de 125 imágenes por microesfera, de la posición en Z de las microesferas, partiendo 2500 nm debajo de la mitad de estas (Stack). La posición se calcula en tiempo real con la Transformación rápida de Fourier (FFT). Posteriormente, se ajusta la correlación que compara la posición de ambas microesferas, con la posición óptica (OP) y se inicia la medición, estableciendo la posición de los magnetos (MP) (Figura 3.5).



**Figura 3.5. Software para controlar el microscopio.** MP: posición del magneto, OP: posición óptica. ROI: región de interés de la cámara. Run Pulse: sistema automático de aplicación de pulsos basados en la posición del magneto.



**Figura 3.6. Microesferas para rastrear biomoléculas individuales.** En el rectángulo verde se muestra la microesfera de referencia, mientras que en el rectángulo azul se observa la microesfera paramagnética.

### 3.2.5 Análisis Estadístico

Los resultados de las mediciones de fuerza de biomoléculas individuales se representan en histogramas, lo cuales permiten visualizar eventos de despliegue y repliegue, indicando el tiempo de los ensayos y la fuerza aplicada en piconewtons (pN). Estos gráficos relacionan la fuerza ejercida con la posición de los magnetos y muestran la extensión en nanómetros (nm) de las biomoléculas bajo perturbaciones magnéticas. Estos análisis se realizan con el programa Igor Pro-8 (Wavemetrics), previamente adaptado por el Grupo de Biología Mecánica para los experimentos.

Este software facilita análisis estadísticos de las propiedades mecánicas de las biomoléculas, como elasticidad, adhesión y respuesta a fuerzas mecánicas. Así las gráficas pueden ajustarse a distribuciones estadísticas, como las distribuciones normales, para calcular valores promedio, desviaciones estándar y dispersión. El programa también facilita la deconvolución de señales superpuestas, ofreciendo información detallada sobre el comportamiento del sistema.

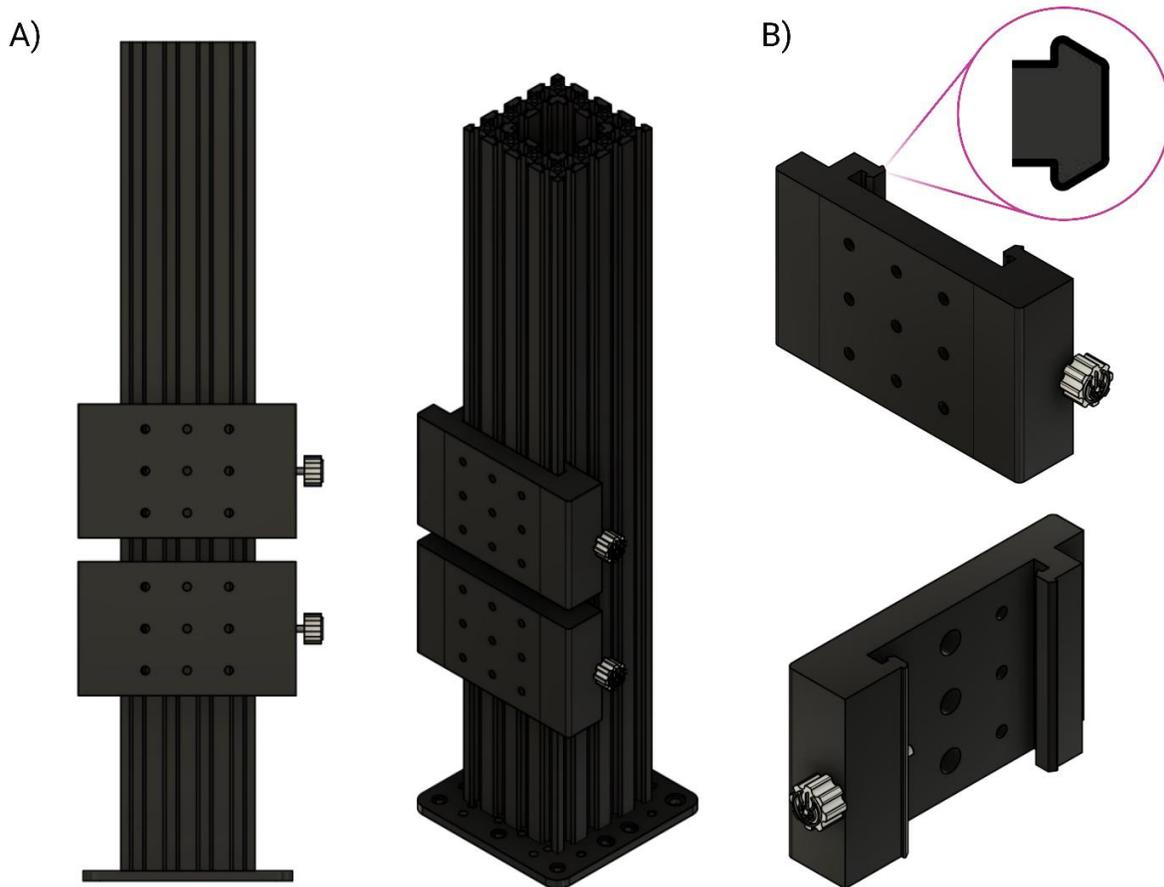
El análisis Quick Fit Gauss, integrado en Igor Pro-8, es una herramienta clave para ajustar los datos a distribuciones normales. Este método permite identificar valores promedio y evaluar la variabilidad o dispersión de los datos, proporcionando valores físicos y estadísticos representativos. Además, estos ajustes permiten refinar los resultados, comparar distribuciones y analizar similitudes o diferencias entre varias curvas ajustadas a datos experimentales.

Por otro lado, el análisis Multi-Peak Fit, permite ajustar y descomponer múltiples picos superpuestos en un conjunto de datos. Este enfoque resulta útil en experimentos donde las señales contienen componentes individuales muy próximos, como ocurre con el despliegue de dominios proteicos bajo fuerza. Al cuantificar y ajustar cada pico individual a modelos como distribuciones normales, se obtiene información esencial sobre las características de cada señal individual, permitiendo estudiar el comportamiento mecánico de los dominios proteicos frente a la aplicación de fuerzas.

## 4. RESULTADOS

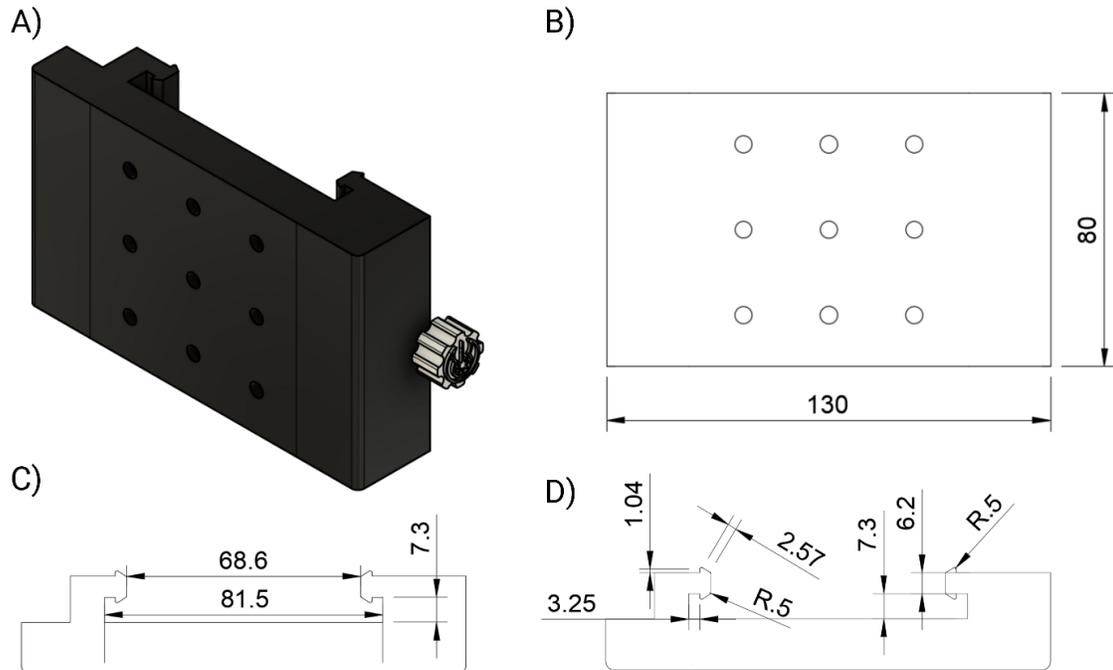
### 4.1 Diseño y Modelado de la Estructura y Soporte del Microscopio

Por medio del programa “Fusion 360” se realizó el modelado completo del microscopio de Pinzas Magnéticas (MT), comenzando por las piezas estructurales y de soporte. Entre estas se encuentran los perfiles de aluminio 6063-T5 (V-slot) tipo C, que fueron dispuestos y organizados como una sola torre de 50 cm de alto montada sobre una plataforma de aluminio de 20 x 20 cm asegurados por placas de enfrentamiento (**Figura 4.1**). Basándose en las medidas de las ranuras de la barra de aluminio, se diseñaron los sistemas de pasadores tipo “Dove-tail” para las piezas de impresión 3D (**Figura 4.1**), con la finalidad de lograr una interacción precisa entre las piezas impresas y la estructura de aluminio. Además, se estableció un tamaño estandarizado en función del ancho de la estructura de aluminio y el tamaño de las monturas Cages CBB1/M con sistema U-Bench, para las piezas de soporte del sistema optomecánico y las platinas. Los soportes del sistema óptico cuentan con orificios diseñados específicamente para la unión de las piezas, permitiendo una integración eficiente de los componentes (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*).



**Figura 4.1. Diseño y modelado del sistema estructural del microscopio MT con Fusion 360.** (A) Vista frontal y de perfil del diseño de la torre guía de 50 x 8 x 8 cm, montada sobre una base de aluminio de 20 x 20 cm, con ambos soportes diseñados para montar el sistema óptico. (B) Detalle del diseño de los soportes, mostrando el sistema “Dove-tail” para el encaje de las piezas de impresión 3D en la torre guía. Los soportes incluyen orificios, de los cuales tres son principalmente destinados al uso de pernos Allen M6 de 20 mm para la fijación de monturas con sistema U-Bench.

Las piezas de soporte corresponden a elementos estructurales esenciales para el establecimiento del sistema optomecánico del microscopio, siguiendo el diseño de un microscopio invertido, en donde la fuente de luz y el objetivo se ubican debajo de la muestra. Estas dos piezas de soporte tienen 130 mm de ancho y 80 mm de alto, cuenta con orificios laterales para su fijación con pernos Allen M4 de 35 mm en la torre guía de aluminio. Los pernos se manipulan mediante perillas para mayor comodidad, lo que facilitará un ajuste preciso (**Figura 4.1.1**).



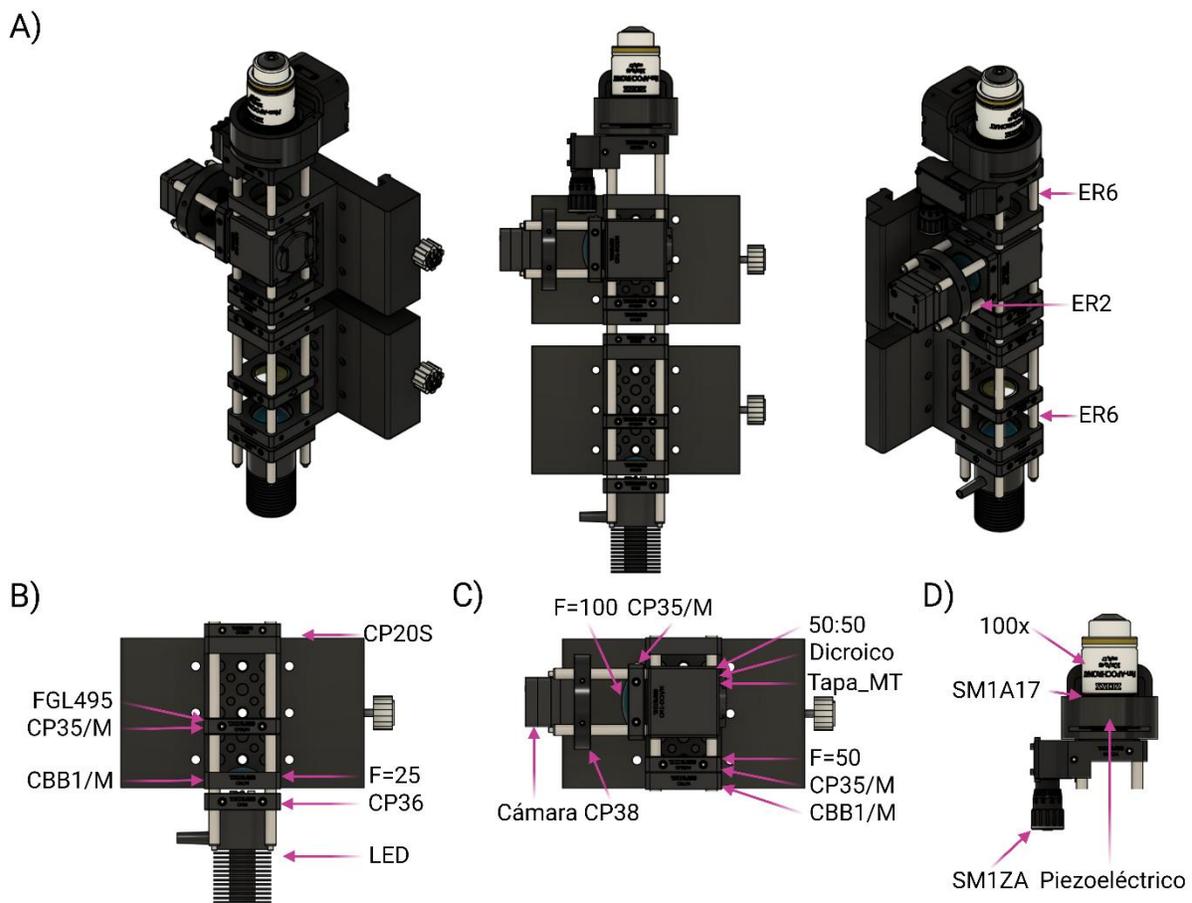
**Figura 4.1.1** Diseño y medidas generales del sistema de soporte óptico con Fusion 360. (A) Vista de perfil del diseño de uno de los soportes del sistema óptico, mostrando su estructura y puntos de fijación. (B) Medidas generales del soporte, especificando el ancho y alto, con dimensiones de 130 x 80 mm. (C) Demostración de las medidas generales utilizadas para la creación de piezas de impresión 3D que interactúan con la torre guía. Esto incluye los soportes, las platinas, entre otros componentes. (D) Medidas detalladas utilizadas para el desarrollo del sistema “Dove-tail”, que permitirá el desplazamiento de las piezas de impresión 3D en las ranuras de la torre guía, asegurando la alineación y estabilidad.

## 4.2 Montaje Digital del Sistema Optomecánico

Después de obtener el diseño digital de las piezas que brindan el soporte para el resto de los componentes, se procedió a montar digitalmente los elementos del sistema optomecánico (**Figura 4.2 A**). Como se mencionó en la metodología, los diseños de las piezas se descargaron como archivos en el formato "SolidWorks", principalmente desde la página web de Thorlabs, y se importaron a Fusion 360. En primer lugar, se incorporaron los sistemas de montura Cages CBB1/M en los soportes, con pernos Allen M6 de 20 mm. En estos soportes se dispusieron las demás monturas que contienen los lentes de tipo plano convexos y el filtro de luz. Estas monturas se unieron en una posición vertical con ocho barras lineales de aluminio largas ER6 (**Figura 4.2 A**). En el primer soporte, se integró el LED en una montura CP36, seguido por un lente plano convexo con una distancia focal de 25 mm, ubicado en el sistema CBB1/M, un filtro de luz azul de banda de paso alto FGL495 en una montura CP35/M y, por último, el diafragma que permite controlar la luz transmitida a la muestra (**Figura 4.2 B**).

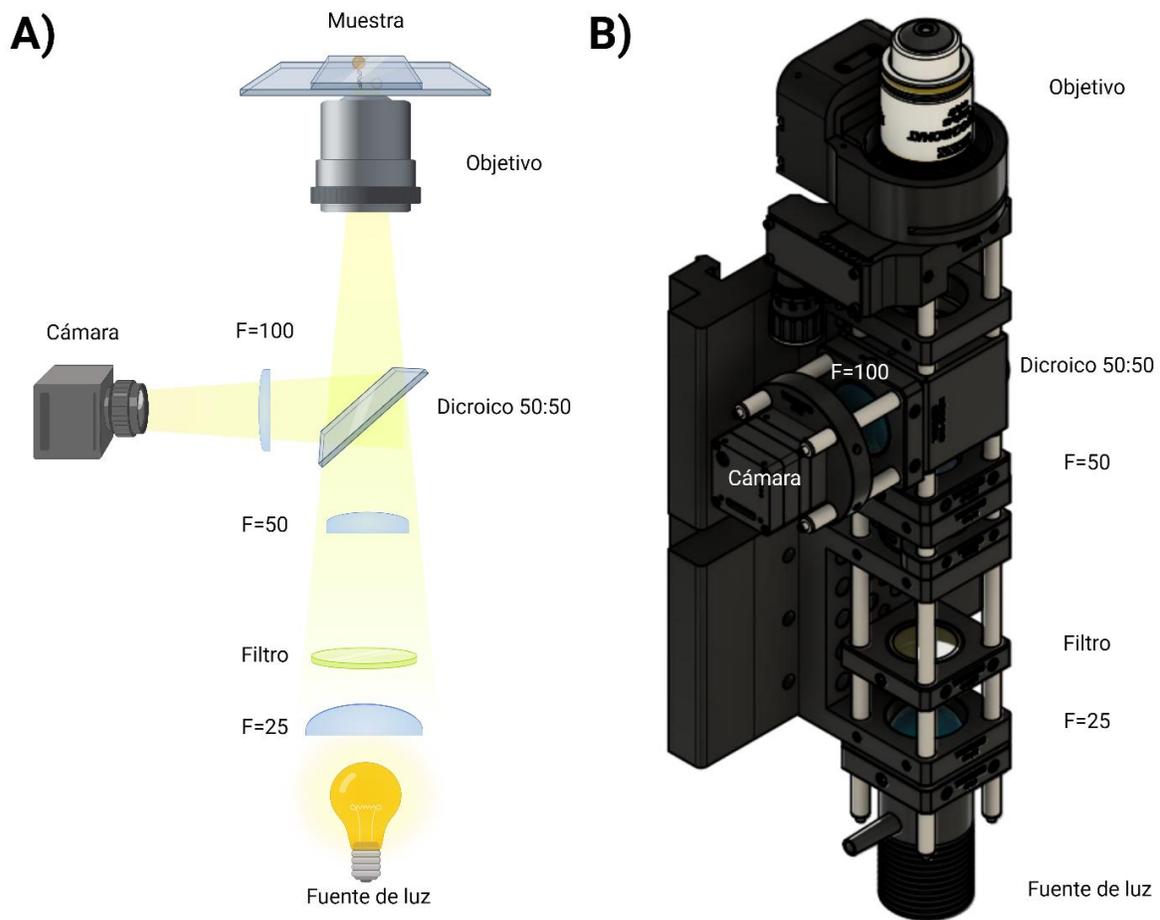
En el siguiente soporte con el sistema CBB1/M, se incorporó el lente plano convexo con una distancia focal de 50 mm en una montura CP35/M, seguido por un cubo con un espejo dicroico 50:50 (**Figura 4.2 C**). A la izquierda del cubo, se dispusieron cuatro barras lineales de aluminio cortas ER2 (**Figura 4.2 A**), en las que se fijó una montura CP35/M para el último lente de tipo plano convexo con una distancia focal de 100 mm, y la cámara Ximea, montada en una montura CP38. Además, se diseñó una tapa para evitar la entrada o salida de luz por la sección derecha del cubo dicroico, reduciendo la interferencia de luz externa (**Figura 4.2 C**) (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*).

Continuando con la distribución de los componentes del sistema optomecánico, después de incorporar los elementos adecuados en ambos soportes, se procedió a montar un actuador lineal manual SM1ZA, que cuenta con un rango de viaje de 2mm. Sobre este actuador, se instaló el piezoeléctrico, mediante un adaptador SM1A17 (adaptador con un hilo externo SM1 e interno M27), seguido por el objetivo de inmersión 100x (**Figura 4.2 D**).



**Figura 4.2. Sistema optomecánico del microscopio.** (A) Vista general del sistema optomecánico, en donde se observa la distribución completa de las piezas. (B) Detalle de los componentes ubicados en el primer soporte, incluyendo el LED, el lente plano convexo de 25 mm, el filtro de luz azul y el diafragma. (C) Detalle de los componentes ubicados en el segundo soporte, con el lente plano convexo de 50 mm, el cubo con el espejo dicroico 50:50, y la cámara Ximea. (D) Principales elementos del sistema de enfoque del microscopio MT como el actuador lineal manual SM1ZA y el piezoeléctrico. *Preparado en con BioRender.*

La implementación del sistema óptico está basada en un diseño que permite colimar la luz, es decir, concentrar un haz de luz compuesto de rayos paralelos proveniente de una fuente, en este caso, un LED. Este diseño facilita la captura de la difracción de la luz cuando interactúa con la muestra, considerando, que la muestra está unida a una microesfera paramagnética de  $2,8 \mu\text{m}$  de diámetro (**Figura 4.2.1**), de modo que, los rayos reflejados deben ser captados por la cámara para obtener una imagen precisa. Para ello, se utilizó un LED que proyecta una luz blanca (6500 K) junto con una serie de lentes con diferentes distancias focales. El primero de los lentes utilizado para generar un haz de luz colimada, corresponde a una distancia focal de 25 mm, seguido por un filtro de luz azul de banda de paso alto, para evitar el paso de las ondas inferiores a 495 nm. El segundo lente, con una distancia focal de 50 mm, se ubica después del filtro y precede a un espejo dicroico 50:50. Este espejo permite transmitir el  $\sim 50\%$  de la luz proveniente del led y refleja el  $\sim 50\%$  de la luz que ha interactuado con la muestra, logrando que un  $\sim 25\%$  de luz inicial llegue a la cámara. Por último, entre el espejo dicroico y la cámara, se encuentra el tercer lente con una distancia focal de 100 mm (**Figura 4.2.1**).



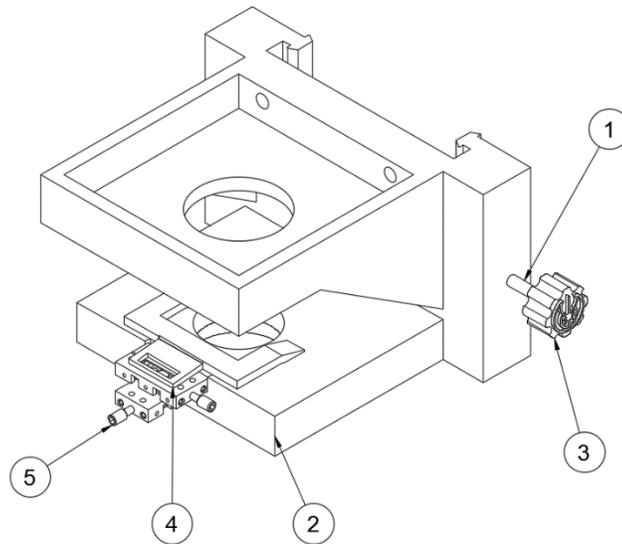
**Figura 4.2.1 Funcionamiento del sistema óptico del microscopio.** El sistema óptico del microscopio está compuesto por una serie de lentes planoconvexas de diferentes distancias focales que permiten colimar la luz a través de un objetivo de inmersión 100x. Además, incluye un filtro de luz azul y un espejo dicroico que transmite  $\sim 50\%$  de luz del LED y refleja el  $\sim 50\%$  de la luz que interactuó con la muestra, permitiendo que un  $\sim 25\%$  de la luz inicial llegue a la cámara. (A) Vista del diseño del sistema óptico, basado en un microscopio invertido, mostrando cómo los componentes ópticos están dispuestos para optimizar la colimación y captura de la luz. (B) Diseño en Fusion 360 que ilustra la distribución y ensamblaje de los diversos componentes ópticos y mecánicos que constituyen el sistema del microscopio de Pinzas Magnéticas. *Preparado en con BioRender.*

### 4.3 Diseño y Modelado del Sistema de movimiento X/Y

La exploración de la muestra está asociada a los movimientos en los ejes X e Y, y su control depende principalmente de una pieza clave: la platina. Como se mencionó anteriormente, se plantearon tres sistemas de platinas para controlar los movimientos en los ejes X e Y durante la observación de la muestra en el microscopio de Pinzas Magnéticas (MT). Estas platinas fueron diseñadas en Fusion 360, y como se mencionó en la sección de *“Diseño y Modelado de la Estructura y Soporte del Microscopio”*, todas las piezas de impresión 3D que interactúan con las ranuras de la torre guía de aluminio cuentan con medidas estandarizadas en los elementos involucrados en el sistema Dove-tail. Por ejemplo, el ancho de la cara que interactúa con la torre guía tiene una medida de 81,5 mm (**Figura 4.1.1 C**). Cabe destacar que las tres platinas comparten el diseño en la parte superior para soportar el actuador de enfoque lineal (LFA-10 +, servoamplificador SCA814, Equipment Solutions), que controla el movimiento de los magnetos. Este diseño compartido permite asegurar la compatibilidad entre los diferentes sistemas de platinas y facilitar su intercambio durante la experimentación. Al igual que el diseño del microscopio completo, las tres platinas cuentan con un diseño modular, facilitando el ajuste y el reemplazo de los componentes. Además, para el control el actuador lineal de enfoque, LFA-10 +, se diseñó una caja para almacenar tanto el circuito PID como su fuente de poder, considerando una ventilación adecuada para evitar el sobrecalentamiento y asegurar un buen rendimiento (**Figura 4.6**) (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*).

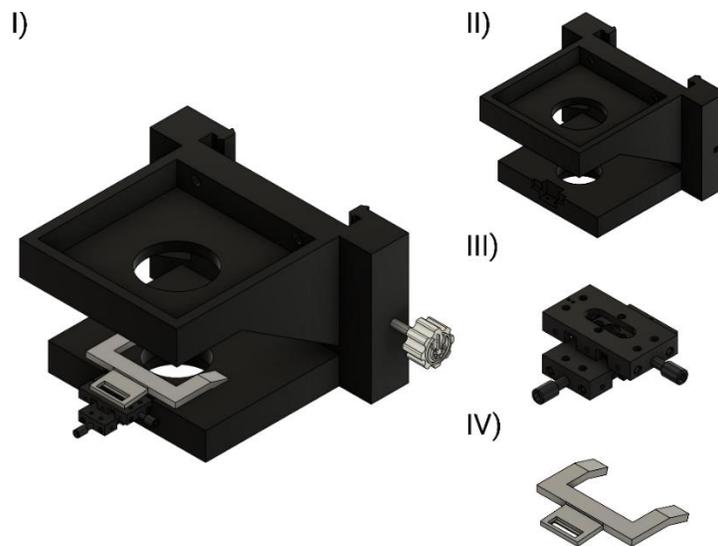
Para los movimientos en los ejes X e Y de la muestra en el MT se plantearon tres platinas. Primero, un método de movimientos manuales, denominado **“Original”** (**Figura 4.3**), que utiliza un sistema de microcontrolador comercial para su operación, permitiendo ajustes precisos. En segundo lugar, se desarrolló una alternativa completamente pensada para llevarla a cabo a través de impresión 3D, denominada **“Manual 3D”** (**Figura 4.4**). Esta opción mantiene la funcionalidad del sistema original, pero permite una mayor flexibilidad y facilidad para la personalización de la pieza. Finalmente, se diseñó una versión motorizada de la platina Manual 3D, llamada **“Motorizado”** (**Figura 4.5**). Esta creación es un paso esencial y previo a la automatización de equipos de laboratorio, ya que permite el control electrónico de los movimientos en el eje horizontal XY (*Revisar Anexo, Planos de las Platinas*).

El sistema de movimientos en el eje horizontal XY de la platina **“Original”** se acciona manualmente por un sistema comercial en miniatura (XY Linear Platina, Miniature, 0.125 in. Travel, 0.55 lb. Load, Newport) (**Figura 4.3, N°5**), cuyo valor es de aproximadamente mil dólares. Este sistema permite realizar movimientos de precisión a nivel microscópico de 0,5  $\mu\text{m}$ , con un recorrido de hasta 3 mm. El diseño de esta platina fue pensado para soportar el actuador de enfoque lineal (LFA-10 +, servoamplificador SCA814, Equipment Solutions). La platina Original se compone de cinco piezas en total, siendo el soporte estructural **“eje Z”** donde se ubican las demás piezas (**Figura 4.3, N°2**), como las pinzas que sostienen la cámara de fluidos que contiene la muestra (**Figura 4.3, N°4**). Además, incluye un perno Allen M4 de 35 mm (**Figura 4.3, N°1**) y una perilla para la fijación en la torre guía de aluminio (**Figura 4.3, N°3**).



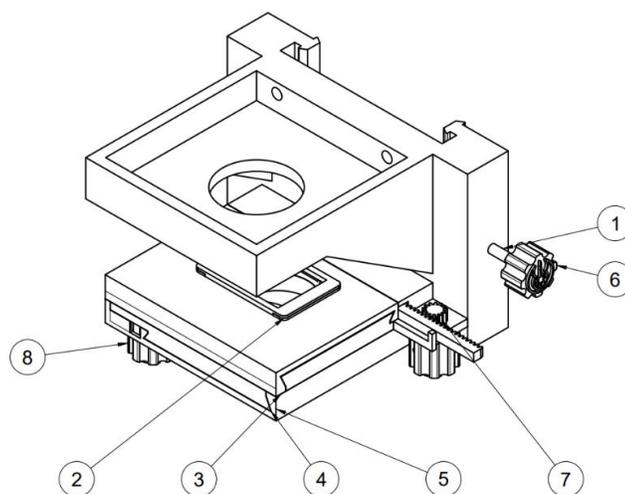
**Figura 4.3 Elementos del diseño de la platina Original para el control del microscopio de Pinzas Magnéticas.** El diseño incluye un perno Allen de cabeza hexagonal M4x35 mm (1) para fijar la platina en la torre guía de aluminio. El eje Z (2) actúa como soporte para ensamblar los demás componentes de la pieza. La perilla (3) permite ajustar la fijación en la torre guía. Las pinzas (4) para la sujeción de la cámara de fluidos permiten que esta sea arrastrada durante el movimiento de la platina lineal miniatura de Newport (5).

El diseño simple de la platina Original facilita la precisión y estabilidad necesarias para la observación y manipulación de la muestra, asegurando un rendimiento óptimo del sistema optomecánico en su conjunto. El microcontrolador XY de Newport facilita la exploración de la muestra hasta 3 mm, tanto en el eje X como en el eje Y. El viaje limitado del instrumento y el diseño específico de las pinzas de sujeción de la muestra permite explorar el centro de la cámara de fluidos. Estas pinzas están diseñadas para mantener la cámara de fluidos en una posición horizontal, debido al tamaño del cubreobjetos más largo, de 24 x 40 mm (Figura 4.2.).



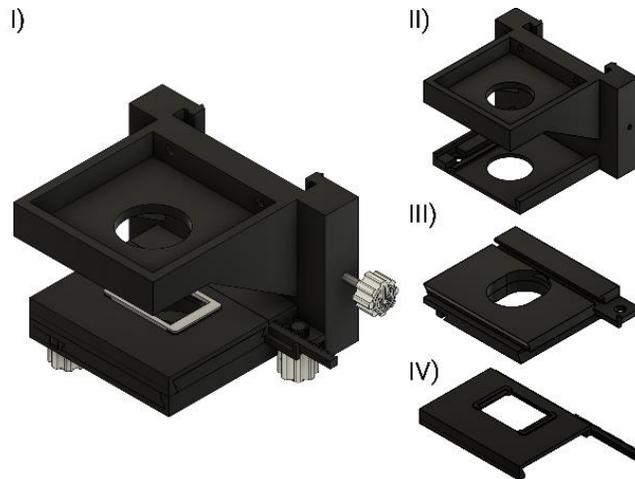
**Figura 4.3.1 Elementos principales de la platina Original.** (I) Vista completa de la platina. (II) Eje Z, que sirve como soporte estructural. (III) Microcontrolador lineal XY comprado. (IV) Pinzas de sujeción de la muestra.

Por otro lado, el sistema de movimientos en el eje horizontal XY de la platina “Manual 3D”, está diseñado para innovar y reemplazar la platina Original, con el objetivo de ofrecer un solución más accesible y versatil. Esta platina fue pensada para realizarla practicamente en su totalidad mediante impresión 3D, exceptuando los pernos de sujeción, siguiendo un diseño modular que disminuye el costo de fabricación y facilita la personalización. Esta platina está conformada por un soporte estructural “eje Z” (**Figura 4.4, N°5**), sobre el cual se ubican los componentes necesarios que facilitan los movimientos de la muestra, como el eje Y (**Figura 4.4, N°3**) y el eje X (**Figura 4.4, N°4**), donde la cámara de fluidos queda embebida. También se incluye un retenedor específico para asegura la cámara de fluidos en su lugar (**Figura 4.4, N°2**). Además, la platina dispone de un perno Allen (**Figura 4.4, N°1**) y una perilla para la fijación en la torre guía (**Figura 4.4, N°6**). El movimiento de ambos ejes de la platina se acciona con un engranaje (**Figura 4.4, N°7**) y una perilla larga que facilita el ajuste (**Figura 4.4, N°8**).



**Figura 4.4 Elementos del diseño de la platina Manual 3D para el control del microscopio Pinzas Magnéticas.** (1) Perno Allen cabeza hexagonal M4x35mm; (2) retenedor de la muestra; (3) eje Y; (4) eje X; (5) eje Z; (6) perilla; (7) engranaje del sistema manual 3D; (8) perilla\_1 para el movimiento y control de la platina Manual 3D.

El sistema de movimientos XY de la platina Manual 3D, compuesto por dos etapas (eje Y y eje X) (**Figura 4.4.1**), amplía significativamente el recorrido en comparación con el sistema comercial en miniatura (XY Linear Platina, Miniature, 0.125 in. Travel, 0.55 lb. Load, Newport) de la platina Original. Mientras que la platina Original ofrece un recorrido de 3 x 3 mm, la platina Manual 3D aumenta este rango a 22 x 22 mm, lo que coincide con el tamaño total del cubreobjetos superior. Esta ampliación en el diseño no solo mejorará la capacidad de encontrar mayor cantidad de microesferas paramagnéticas con un movimiento pendular adecuado para la experimentación, sino que también permitirá explorar un mayor número de cuadrantes de la cámara de fluidos. La versatilidad de la platina Manual 3D proporciona una mayor oportunidad para la obtención de datos y una exploración más exhaustiva de la muestra.

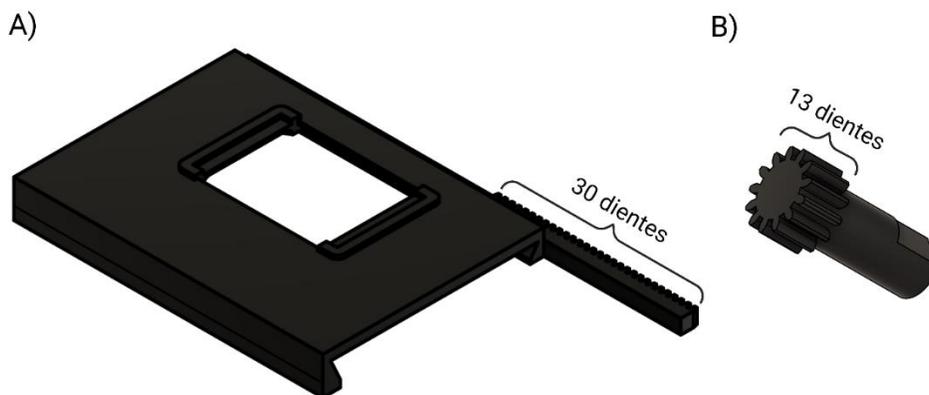


**Figura 4.4.1 Elementos principales de la platina Manual 3D.** (I) Vista completa de la platina. (II) Eje Z, que sirve como soporte estructural para los demás componentes. Además, se observan las etapas que permiten los movimientos de la muestra, (III) eje X; (IV) eje Y.

El movimiento de los ejes X e Y es controlado mediante un sistema de engranajes diseñado para que la relación de la transmisión del movimiento entre el engranaje y la cremallera sea mayor a 1, para así reducir el movimiento y aumentar el torque de la cremallera, resultando en una velocidad de salida menor que la de entrada (86). De esta manera, se diseñó un engranaje y una cremallera con un módulo de 0,6 mm (tamaño de los dientes) (**Figura 4.4.3**) para realizar movimientos en el eje X e Y inferiores a 1 mm (1000  $\mu$ m). Esto fue pensado por el nivel de resolución de la impresora 3D que se utilizará para fabricar las piezas de impresión 3D (0,1-0,35 mm) y considerando que ambas microesferas que se utilizarán para la experimentación tienen un diámetro menor a 3  $\mu$ m. La relación de la transmisión de energía ( $i$ ) está dada por el número de revoluciones del engranaje y el desplazamiento lineal de la cremallera, calculándose según la relación de la cantidad de dientes de cada componente, con trece dientes para el engranaje ( $Z_e$ ) y treinta para la cremallera ( $Z_s$ ) ( $13/30 = \sim 0,43$ , sistema reductor) (**Figura 4.4.2**) (86–88).

$$i = Z_e/Z_s$$

(Ecuación 4)



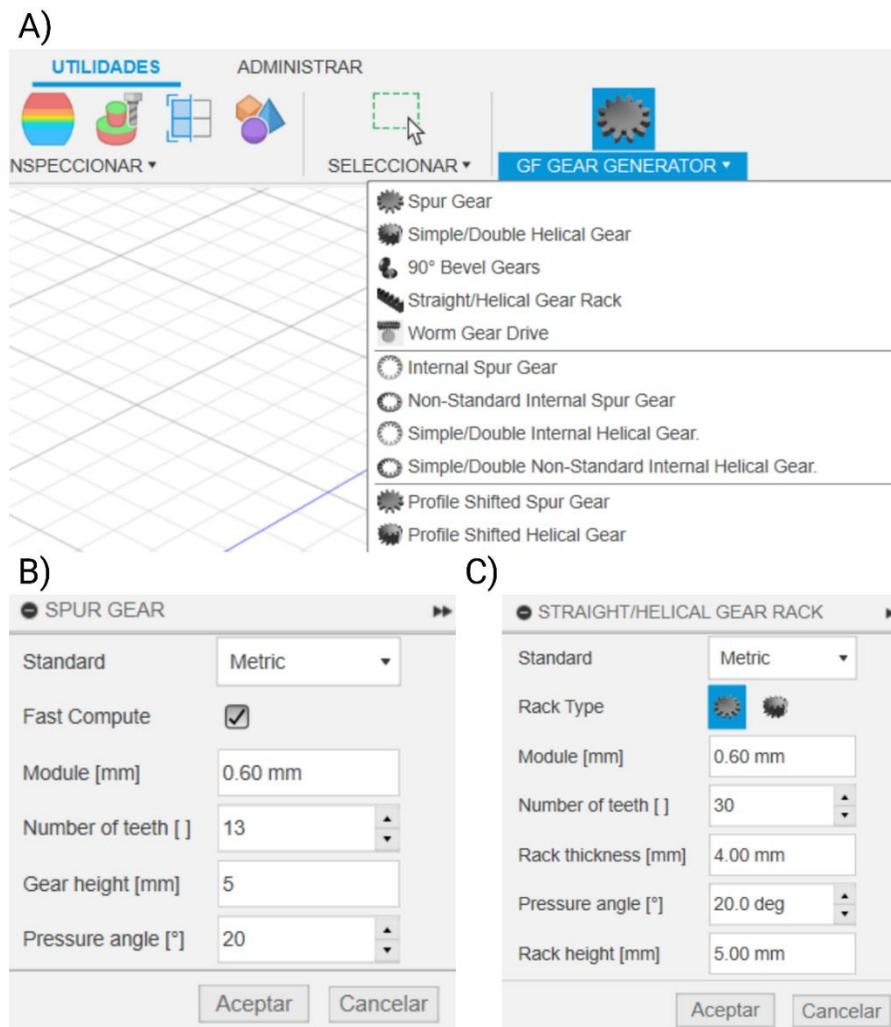
**Figura 4.4.2. Elementos del Eje Y de la platina Manual 3D.** (A) Se aprecia la cantidad de dientes del Eje Y. (B) Se detalla la cantidad de dientes del Engranaje Manual.

Para calcular la resolución del sistema de engranajes, primero se debe determinar el desplazamiento lineal por revolución del engranaje ( $d$ ). Como se mencionó anteriormente, el engranaje conductor cuenta con 13 dientes y un módulo de 0,6 mm (tamaño del diente) (Figura 4.4.3). Para ello se emplea la siguiente fórmula:

$$d = m \times Z$$

(Ecuación 5)

En donde el módulo ( $m$ ) se multiplica por la cantidad de dientes ( $Z$ ), obteniendo como resultado 7,8 mm. Ya que el movimiento se controlará manualmente, el nivel de precisión al ajustar la Perilla\_1 que controla al engranaje dependerá del pulso del operador. Por lo que se estima que la precisión al ajustar la perilla podría variar de ~1 a ~10 mm. De esta manera, la resolución del sistema de la platina Manual 3D se estima en un rango de 0,78 mm a 7.8 mm (86–88).



**Figura 4.4.3. Diseño del sistema de engranaje y cremallera de la platina Manual 3D.** (A) Se aprecia en el programa Fusion 360 la herramienta de Utilidades que trae posibilidad de generar engranajes “GF GEAR GENERATOR”. (B) Medidas utilizadas para la generación del engranaje. (C) Medidas para la generación de la cremallera.

Finalmente, el sistema de movimientos en el eje horizontal XY de platina “Motorizado” representa una mejora significativa respecto del diseño de la platina “Manual 3D”. La automatización de equipos de laboratorio, como se mencionó previamente, no solo optimiza el tiempo de experimentación, sino que también mejora la calidad de los resultados obtenidos. Este paso hacia la automatización ya sea total o parcial, se consolida mediante la motorización de los equipos. En esta versión, se mantuvo el enfoque de un componente realizado mediante impresión 3D con un diseño modular, con el añadido de componentes motorizados para una mayor precisión. Este diseño de platina está conformado por el soporte estructural “eje Z N8” (**Figura 4.5, N°8**), sobre el cual se disponen los elementos que permiten movimientos en el eje Y (**Figura 4.5, N°6**) y en el eje X N8 (**Figura 4.5, N°7**), donde la cámara de fluidos queda embebida. Un retenedor (**Figura 4.5, N°5**), asegura la cámara en su lugar. La platina Motorizado también incluye un perno Allen (**Figura 4.5, N°3**) y una perilla para la fijación en la torre guía (**Figura 4.5, N°9**). El movimiento en ambos ejes (X e Y) se controla mediante el uso de engranajes (**Figura 4.5, N°2**) y dos motores paso a paso NEMA8 (**Figura 4.5, N°1**), que proporcionan un control mucho más preciso y fiable en comparación con el ajuste manual, minimizando los errores asociados al pulso humano. Para asegurar la correcta instalación y funcionamiento del motor NEMA8 en el soporte eje Z N8, se diseñó un adaptador específico (**Figura 4.5, N°4**).

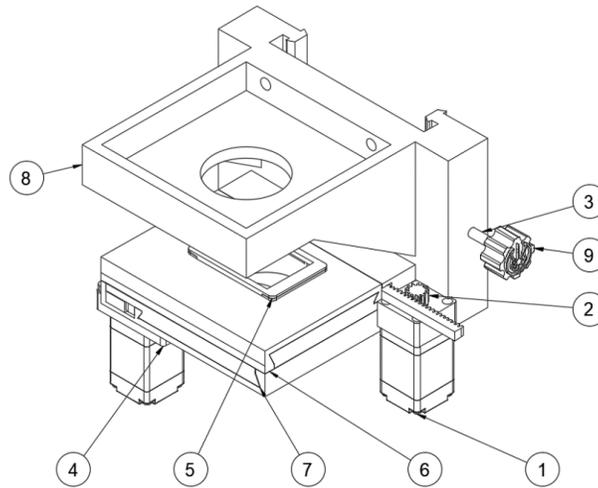
El diseño del sistema de la platina “Motorizado” mantiene una similitud con el de la platina “Manual 3D”, conservando las mismas medidas generales, de modo que ciertas piezas son intercambiables, como el eje Y, junto con el retenedor de la muestra (**Figura 4.5.1**). Y que además cuenta con las mismas medidas del sistema de engranajes de la platina anterior. Las principales diferencias en el diseño se encuentran en los ejes Z y X. En el eje Z N8 se incorporó un adaptador removible, mientras que en el eje X N8 se incluyó un adaptador fijo, ambos diseños fueron pensados específicamente para el acople de los motores paso a paso NEMA8. Esta adaptación no solo asegura el ajuste estable de los motores, sino que también facilitan una integración sin interrupciones con los demás componentes del sistema optomecánico del microscopio. Sin embargo, debido al largo de los motores, es necesario emplear un extensor parafocal en el objetivo de inmersión 100x.

Dado que el sistema de engranajes de la platina Motorizado comparte las mismas medidas que el de la platina Manual 3D, con un engranaje conductor de trece dientes y un módulo de 0,6 mm, y una cremallera de treinta dientes con el mismo módulo, el desplazamiento lineal por revolución del engranaje (**d**) es de 7,8 mm. Para determinar la resolución del sistema (**R**), se considera que el control de los movimientos de la platina Motorizado se realizará mediante un motor paso a paso NEMA8 de 1,8° (como se mencionó en la sección de Metodología “Componentes Electrónicos”), lo que implica que por cada rotación de 360° el motor realiza 200. Utilizando la siguiente fórmula:

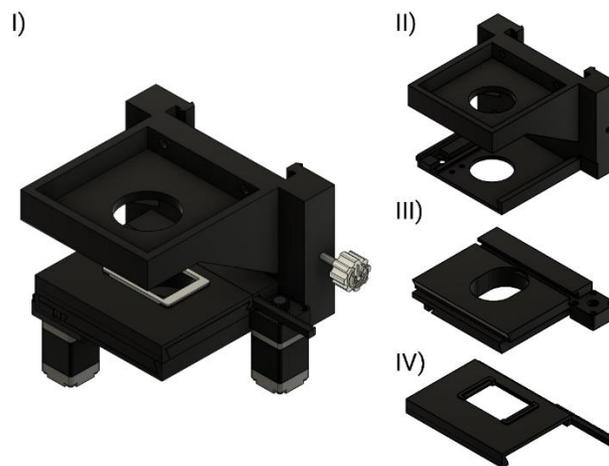
$$R = \frac{d}{N^{\circ} \text{ de pasos por revolución}}$$

(Ecuación 6)

Se obtiene que la resolución del sistema Motorizado será de 0,039 mm o 39 μm (86–88).

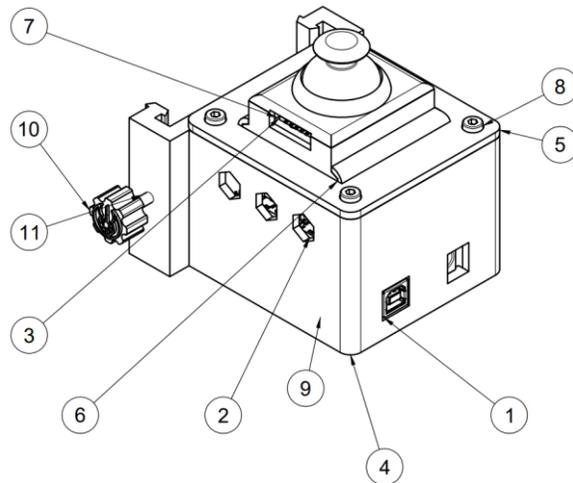


**Figura 4.5 Elementos del diseño de la platina Motorizado para el control del Espectrómetro de Fuerza.** (1) motor paso a paso NEMA8; (2) engranaje del sistema Motorizado; (3) Perno Allen cabeza hexagonal M4x35mm; (4) adaptador del motor NEMA8; (5) retenedor de la muestra; (6) eje Y; (7) eje X N8; (8) eje Z N8; (9) perilla.



**Figura 4.5.1 Elementos principales de la platina Motorizado.** Esta platina presenta un diseño muy similar al de la platina Manual 3D, a excepción de las adaptaciones realizadas para integrar el sistema motorizado en lugar de las perillas manuales. (I) Vista completa de la platina, destacando la disposición de los motores. (II) Eje Z N8, que sirve como soporte estructural para los demás componentes. (III) Eje X N8, que facilita los movimientos horizontales de la muestra. (IV) Eje Y, cuya configuración es idéntica a la de la platina Manual 3D.

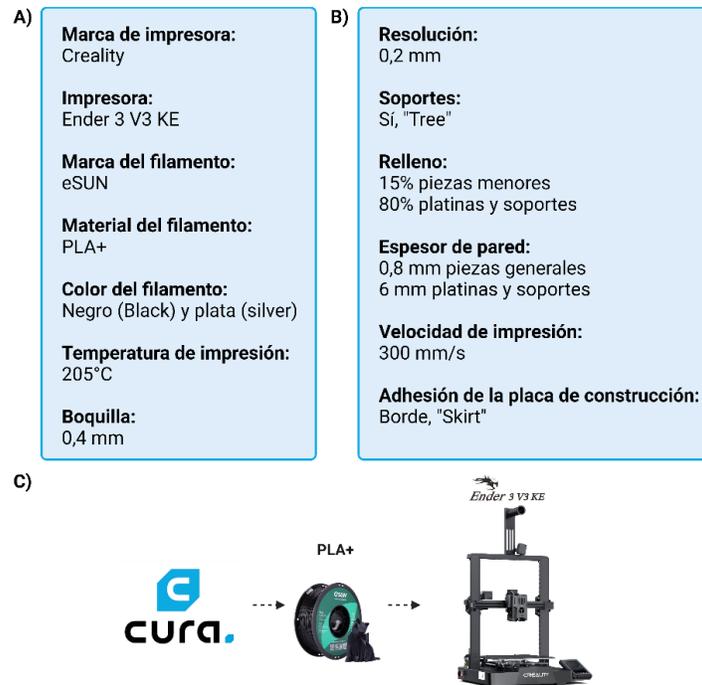
Como agregado, para el control de los movimientos del sistema Motorizado, se diseñó una caja para almacenar los componentes electrónicos, incluyendo las tarjetas Arduino UNO, CNC Shield, y los controladores A4988; proporcionando además un acceso cómodo al joystick (**Figura 4.6.1**). Esta caja no solo protege los componentes de daños externos, sino que también permite organizar los cables y conexiones, facilitando el acceso y mantenimiento del sistema de control. Esta configuración considera una ventilación adecuada para evitar el sobrecalentamiento y asegurar un buen rendimiento; también cuenta con el acceso para los puertos de programación y alimentación, lo que facilita las actualizaciones del código sin la necesidad de desmantelar la caja (**Figura 4.6.1**) (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*).



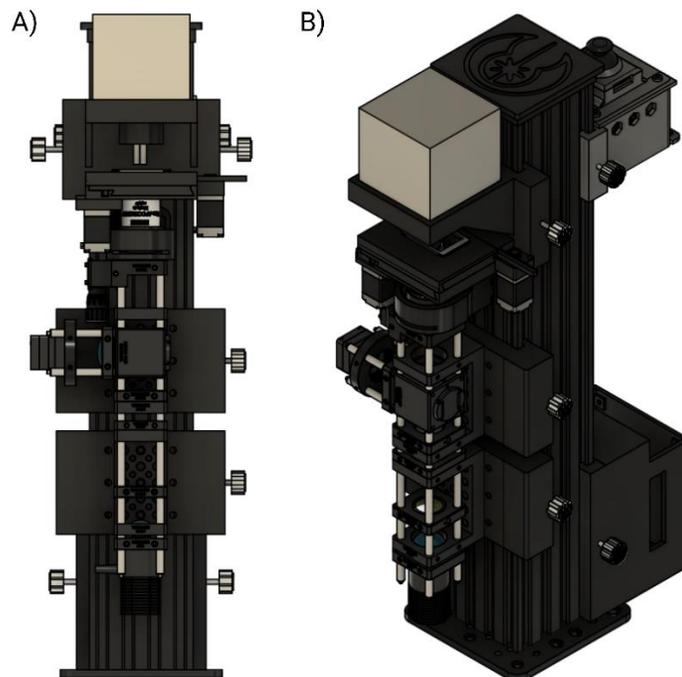
**Figura 4.6.1 Componentes del Control del Sistema Motorizado.** (1) Tarjeta Arduino UNO R3 SMD; (2) CNC Shield y controladores A4988; (3) Módulo joystick; (4) MT Arduino base; (5) MT Arduino tapa; (6) Joystick base; (7) Joystick tapa; (8) Pernos Allen M4 x 6 mm; (9) Pernos Allen M2 x 5 mm; (10) Perilla; (11) Perno Allen M4 x 35 mm.

#### 4.4 Impresión 3D

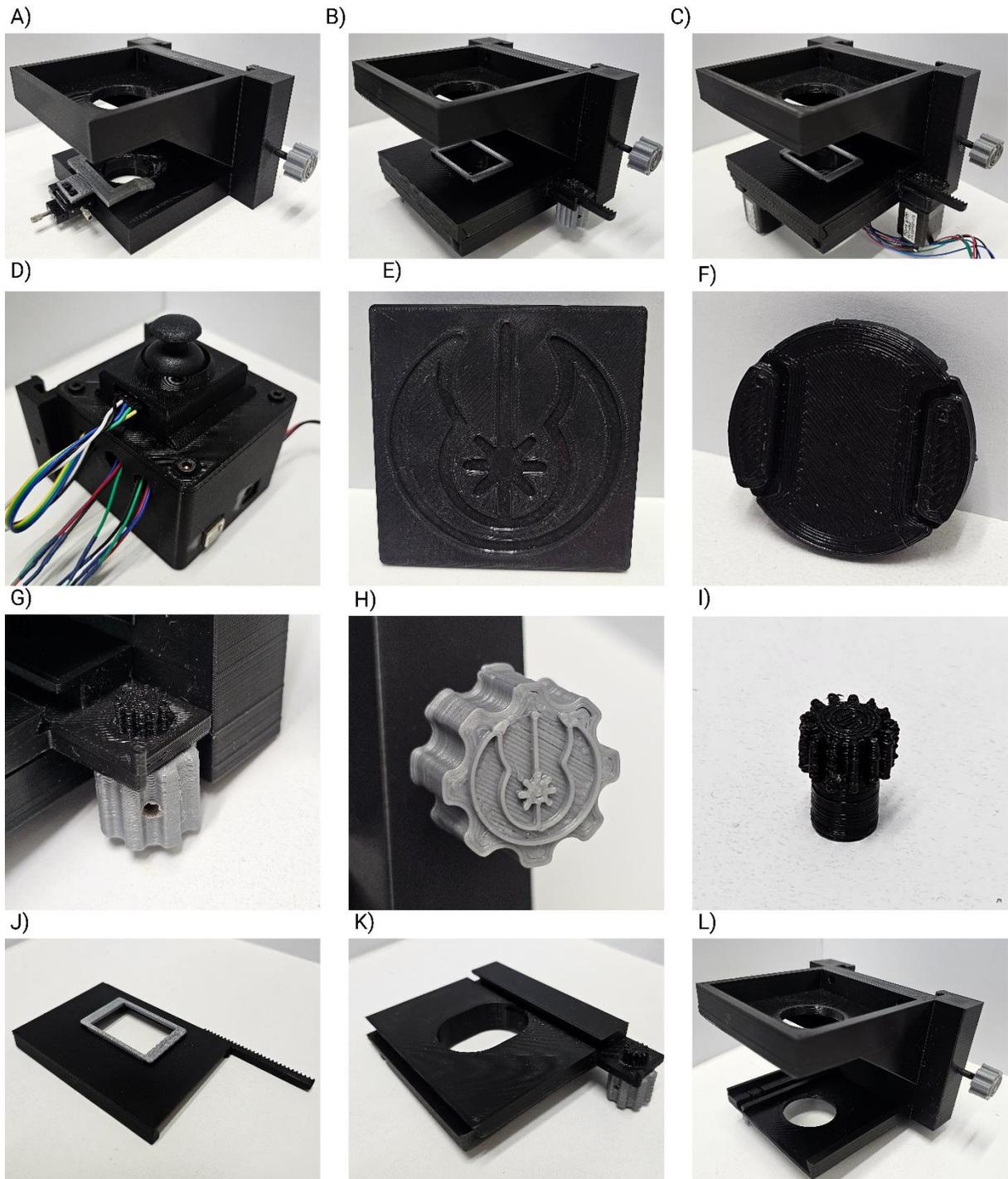
Después de haber realizado el diseño y modelado completo del espectrómetro de fuerza, es decir, el microscopio de Pinzas Magnéticas (MT), en el programa de modelamiento y diseño Fusion 360 (**Figura 4.7.1**), se procedió a la impresión de las piezas de soporte general, las diferentes opciones de platinas y otros elementos esenciales del instrumento (**Figura 4.7.2**). Para asegurar la calidad de las piezas y optimizar la interacción entre los componentes impresos y las piezas compradas, se establecieron ciertos parámetros en el programa UltiMaker Cura. Estos ajustes incluyeron la densidad de relleno, la temperatura de impresión, la velocidad, entre otros parámetros relevantes que influyen en la calidad y resistencia de las piezas impresas (**Figura 4.7**). Posteriormente, los componentes de impresión 3D se imprimieron utilizando la impresora 3D “Ender 3 V3 KE” de Creality, empleando filamentos Black PLA+ y Silver PLA+ de la marca eSUN (**Figura 4.7 C**). La elección de estos filamentos se basó en su durabilidad y la calidad del acabado, lo cual asegura un rendimiento óptimo y una apariencia profesional de las piezas finales. El tiempo de impresión de cada elemento o conjunto de elementos varía dependiendo de su tamaño y características específicas, lo que determina su complejidad y la cantidad de filamento que se utilizará. Esta información es útil para calcular los costos de cada pieza. Por ejemplo, las partes más pequeñas y menos complejas pueden tardar menos de una hora o unas pocas horas en imprimirse, mientras que las estructuras más grandes y detalladas pueden requerir más de un día de impresión. Así, el tiempo necesario para imprimir una pieza o un conjunto de estas depende de la complejidad del diseño, el tamaño y la cantidad de filamento utilizado (**Tabla 1**) (*Revisa Anexo, Planos de Componentes Varios*).



**Figura 4.7. Configuraciones generales de impresión 3D.** Creado con *BioRender.com*. (A) Se definió el criterio de configuración a utilizar, incluyendo el tipo de impresora, el tipo de filamento y el tamaño de la boquilla. (B) Se establecieron los parámetros necesarios para perfeccionar las diversas piezas a imprimir; entre estos, el relleno y el espesor de la pared son los más relevantes en cuanto a la estabilidad de los componentes. (C) Esquema ilustrativo simple del programa empleado para ajustar los parámetros de impresión, el filamento utilizado y la impresora seleccionada.



**Figura 4.7.1. Diseño y modelado completo del microscopio de Pinzas Magnéticas.** (A) Vista frontal del microscopio. (B) Vista de perfil del microscopio, con los elementos necesarios para el control y funcionamiento.



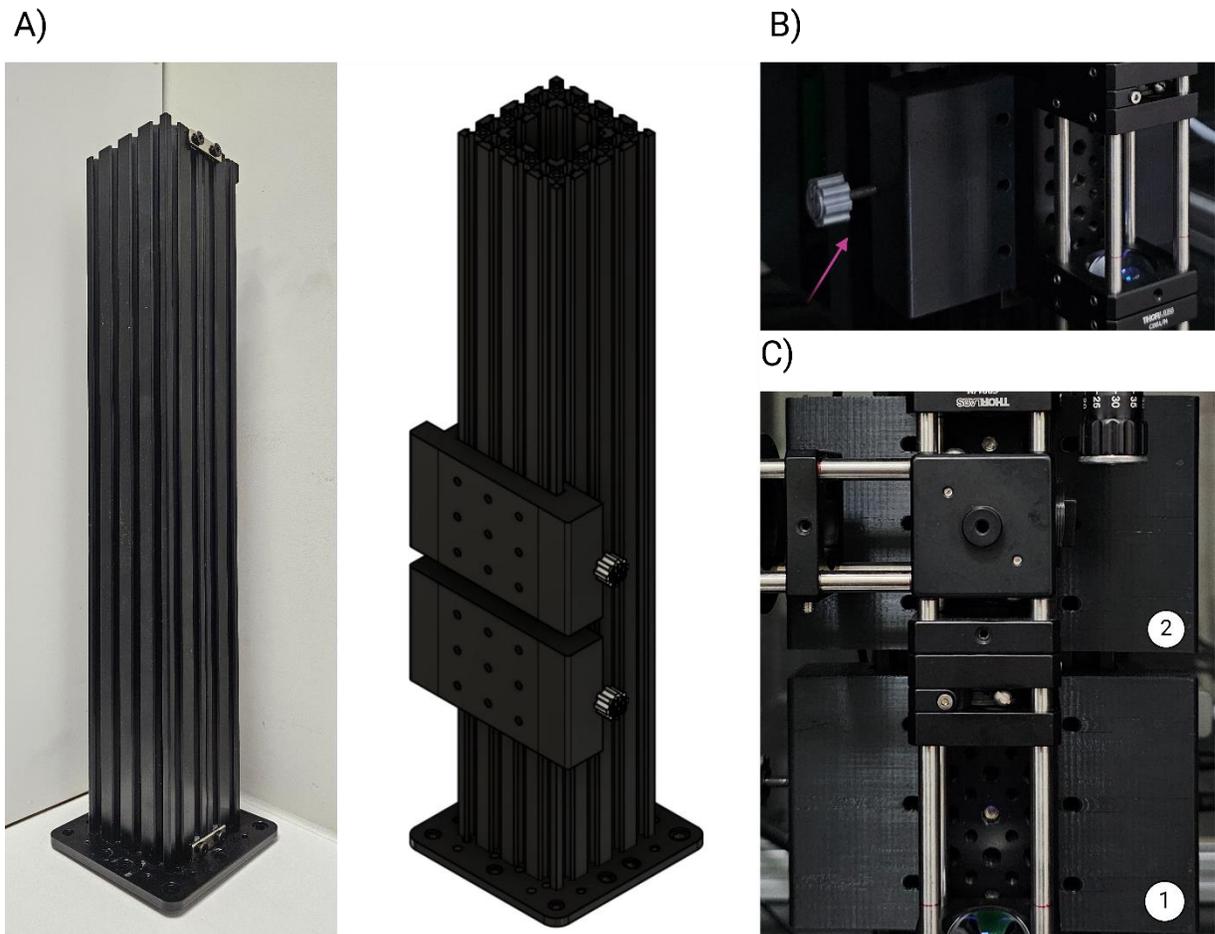
**Figura 4.7.2. Ejemplo de algunos conjuntos de piezas y piezas individuales generadas con impresión 3D para el microscopio de Pinzas Magnéticas.** (A) Platina Original; (B) Platina Manual 3D; (C) Platina Motorizado; (D) Control del Sistema Motorizado; (E) Tapa para la Torre Guía; (F) Tapa para el Cubo Dicroico; (G) Vista del sistema del Engranaje Manual y Perilla\_1 de la platina Manual 3D; (H) Detalle de la Perilla que permite la fijación de los soportes y platinas a la torre guía de aluminio; (I) Vista del Engranaje NEMA8 de la platina Motorizado; (J) Eje Y, pieza compatible tanto para la platina Manual 3D como para el sistema de platina Motorizado; (K) Eje X de la platina Manual 3D; (L) Eje Z de la platina Manual 3D.

**Tabla 1. Propiedades y características de las piezas de impresión 3D del microscopio de Pinzas Magnéticas.** En la tabla adjunta, se detallan los componentes de cada conjunto de piezas de impresión 3D del microscopio MT, incluyendo sus respectivos nombres. Además, se especifica la cantidad de piezas, la cantidad de filamento aproximado utilizado para cada una y el tiempo necesario para imprimirlas. Esta información proporciona una visión que integra el proceso de impresión y ayuda a calcular los costos y planificación del tiempo de producción, tomando en cuenta que el valor aproximado de 1kg de filamento de PLA+ de la marca eSUN cuesta \$15.000.

Conjunto de piezas	Pieza de impresión 3D	Cantidad de filamento (g)	Tiempo de impresión	Cantidad de piezas	Costo de elaboración x pieza (CLP)
<b>Platina Original</b>	Eje Z Original	282	1 día 1 h 55 min	1	4.230
	Pinzas	3	37 min	1	45
	Perilla	2	16 min	2	30
<b>Platina Manual 3D</b>	Eje Z	237	1 día 1 h 42 min	1	3.555
	Eje Y	22	3 h 35 min	1	330
	Eje X	39	4 h 40 min	1	585
	Retenedor Muestra	1	9 min	1	15
	Engranaje Manual	1	11 min	2	15
	Perilla_1	3	24 min	2	45
	Perilla	2	16 min	2	30
<b>Platina Motorizado</b>	Eje Z N8	236	1 día 1 h 23 min	1	3.540
	Eje Y	22	3 h 35 min	1	330
	Eje X N8	41	4 h 47 min	1	615
	Retenedor Muestra	1	9 min	1	15
	Engranaje NEMA8	0,4	9 min	2	6
	NEMA8 adaptador	4	39 min	1	60
	Perilla	2	16 min	2	30
<b>Control del Sistema Motorizado</b>	MT Arduino base	88	11 h 17 min	1	1.320
	MT Arduino tapa	16	1 h 48 min	1	240
	Joystick tapa	2	16 min	1	30
	Joystick base	12	1 h 53 min	1	180
	Perilla	2	16 min	1	30
<b>Caja de Circuitos</b>	Componente 1	300	1 día 15 h 9 min	1	4.500
	Componente 2	28	3 h 3 min	1	420
<b>Tapa para Cubo Dicroico</b>	Cara 1	1	7 min	1	15
	Cara 2	1	10 min	1	15
	Pulsador	1	16 min	1	15
<b>Soporte del Sistema Óptico</b>	Soporte	206	16 h 49 min	2	3.090
	Perilla	2	16 min	2	30
<b>Tapa para Torre Guía</b>	Tapa_MT	48	7 h 48 min	1	720
<b>Cubierta para Sistema Óptico</b>	Cubierta	65	7 h 7 min	1	975

#### 4.5 Ensamblado del Microscopio Invertido

Una vez completado el proceso de impresión 3D, se procedió a ensamblar el espectrómetro de fuerza. Como se mencionó anteriormente, el diseño del MT está basado en un microscopio invertido, es decir, que tanto el objetivo como la fuente de luz están ubicados debajo de la platina donde se coloca la muestra. Este instrumento se ensambló siguiendo el orden establecido en el Diseño y Modelado implementado en Fusion 360, comenzando con la unión de las piezas de aluminio, incluyendo la torre guía constituida por dos perfiles de aluminio 6063-T5 (V-slot) tipo C de 80 x 40 mm y la plataforma de aluminio de 20 x 20 cm (**Figura 4.8 A**). En la torre guía, se dispusieron ambos soportes impresos en 3D (**Figura 4.8 C**), que, gracias al sistema Dove-tail, se desplazaron sin problemas por las ranuras de la torre. Estos soportes se fijaron con pernos Allen M4 de 35 mm y perillas para una manipulación amigable (**Figura 4.8 B**). Este paso fue crucial para montar el sistema optomecánico del microscopio, asegurando la correcta alineación y brindando estabilidad a todos los componentes necesarios para la operación del MT (**Figura 4.8 C**).

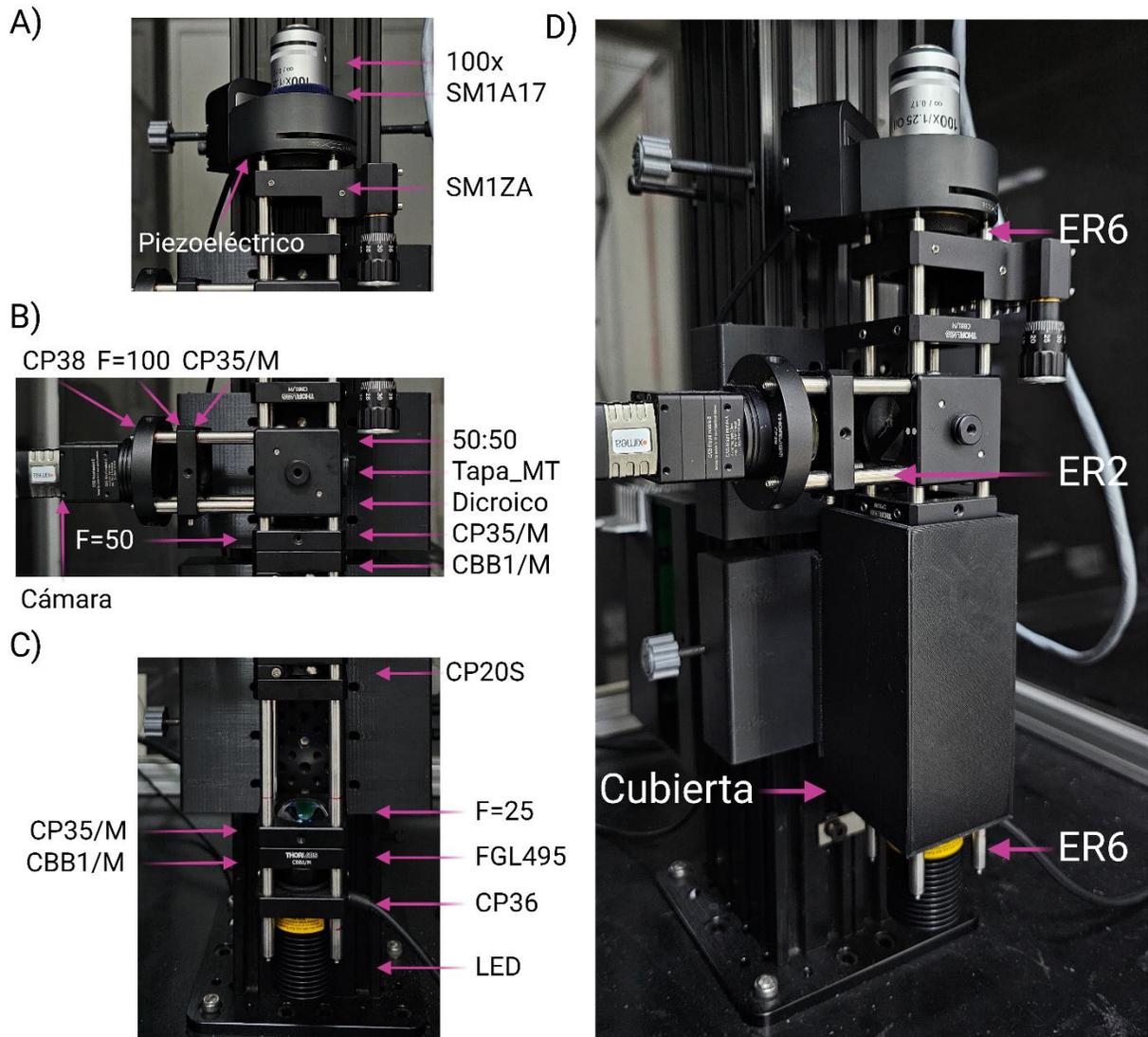


**Figura 4.8. Ensamblado del sistema de estructural del microscopio MT.** Creado con BioRender.com. (A) Vista de perfil de la torre guía de aluminio de 80 x 80 mm y la base de aluminio de 20 x 20 mm, comparada con el diseño modelado en Fusion 360. (B) Se observa en detalle los agujeros de uno de los soportes, que se encuentra fijado en la torre guía mediante un perno Allen M4 x 35 mm y una perilla, indicado por la flecha rosa. (C) Ensamblado de ambos soportes del sistema óptico.

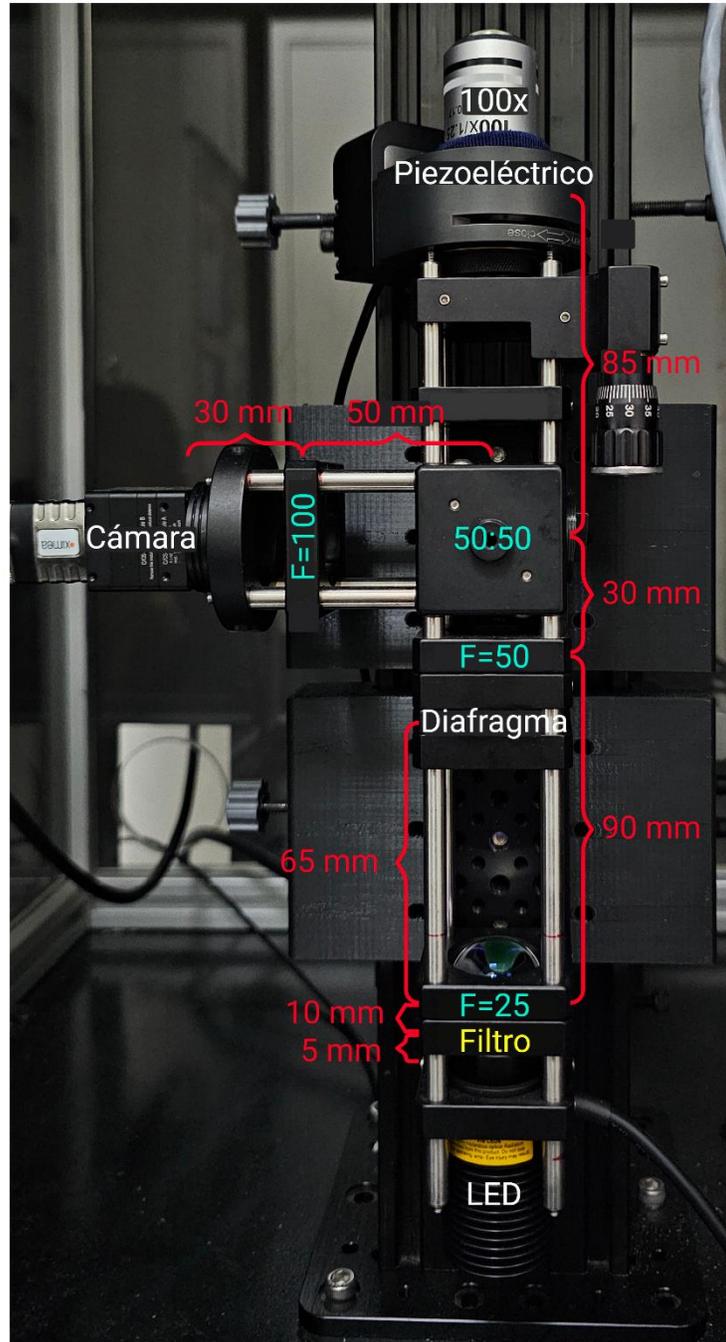
En los soportes impresos, se montaron las monturas CBB1/M de Thorlabs, fijadas con pernos Allen M6 de 20 mm. En el primer soporte, se incorporó el LED ((MCWHL6-C1 - 6500 K, 548 mW, 1200 mA) en una montura CP36, seguido por un filtro de luz azul de banda de paso alto ubicado en el sistema CBB1/M, un lente plano convexo con una distancia focal de 25 mm ( $F=25$ ) en una montura CP35/M y, finalmente, un diafragma para controlar la luz transmitida a la muestra (**Figura 4.9 C**). En el segundo soporte, se integró un lente plano convexo con una distancia focal de 50 mm ( $F=50$ ) en una montura CP35/M, seguido por un cubo con un espejo dicroico 50:50 dispuesto en un ángulo de  $45^\circ$  (**Figura 4.9 B**). A la izquierda del cubo, se fijó una montura CP35/M para el último lente de tipo plano convexo con una distancia focal de 100 mm ( $F=100$ ), y la cámara Ximea, montada en una montura CP38. Además, se diseñó una tapa para evitar la entrada o salida de luz por la sección derecha del cubo dicroico (**Figura 4.9 B**). A continuación, se procedió a montar el actuador lineal manual SM1ZA, sobre el cual se instaló el piezoeléctrico mediante un adaptador SM1A17 (adaptador con un hilo externo SM1 e interno M27), seguido por el objetivo de inmersión 100x (**Figura 4.9 A**). Para mantener un sistema controlado, se instaló una cubierta que impide la entrada y salida de luz en el sistema óptico del microscopio (**Figura 4.9 D**) (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*). Todas las monturas se unieron verticalmente con ocho barras lineales ER6 y horizontalmente con cuatro barras lineales ER2, asegurando una estructura robusta y estable capaz de soportar los componentes (**Figura 4.9 D**).

Cabe señalar, que en el montaje digital del sistema optomecánico, el lente plano convexo con una distancia focal de 25 mm y el filtro luz azul de banda de paso alto FGL495 se encontraban dispuestos en el sistema CBB1/M y en la montura CP35/M, respectivamente. Sin embargo, para asegurar que la luz no deseada sea filtrada antes de llegar al lente, reducir aberraciones y mejorar la calidad de imagen, además de disminuir la dispersión de la luz en el sistema, se decidió invertir la posición del lente con la del filtro. Así, el filtro quedó ubicado por encima del LED y por debajo del lente  $F=25$  (**Figura 4.9 C**).

Las distancias entre los diversos elementos del sistema óptico fueron establecidos con ayuda de la colaboración del investigador Rafael Tapia Rojo, de King's College London. Este proceso se llevó a cabo utilizando una cámara de fluidos con microesferas paramagnéticas y de referencia, empleando un objetivo de inmersión Motic 100x (PANTHERA OBJECTIVE - PLAN ACHROMAT UC 100X/1.25/ S-OIL (WD=0.16MM) - (1101001705251)). La intensidad del LED se fijó a 70% de su capacidad a 1A y se corrigió la distancia entre este y el primer lente de tipo plano convexo de una distancia focal de 25 mm, dejando una distancia de 15 mm entre estos elementos. A continuación, se estableció la distancia entre el primer lente y el segundo lente, con una distancia focal de 50 mm, dejando una distancia de 90 mm entre estos. La distancia entre este lente y el espejo dicroico es de 30 mm. Además, se ajustó la apertura del diafragma para garantizar que la luz transmitida hacia la muestra fuera lo más precisa posible. Finalmente, se determinó la distancia entre el espejo dicroico, el lente de tipo plano convexo de 100 mm y la cámara Ximea (que se comunica con un computador a través de una conexión USB 3.0), estableciendo una separación de 50 mm y 80 mm, respectivamente. Estos ajustes precisos aseguran una correcta colimación y transmisión de la luz a través del sistema óptico, optimizando la calidad de imagen y la eficiencia del MT (**Figura 4.10**).

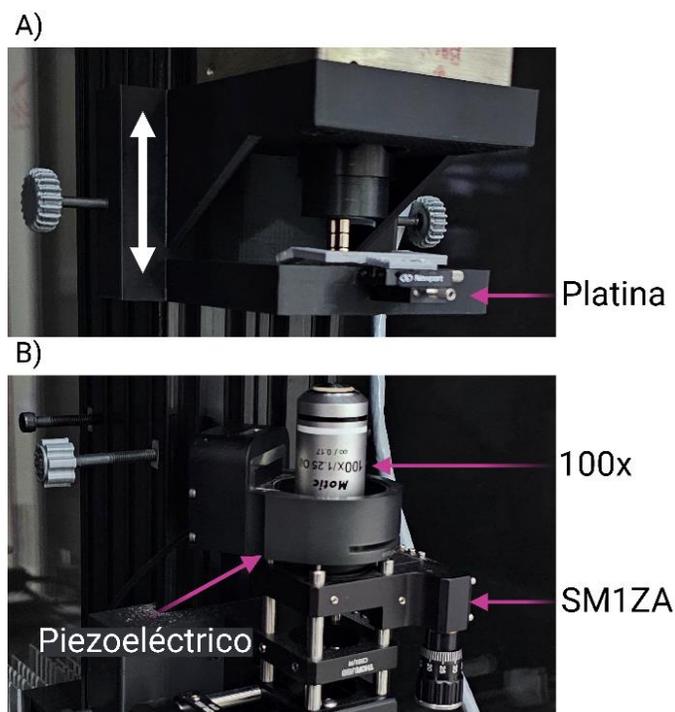


**Figura 4.9. Ensamblado del sistema optomecánico del microscopio MT.** Creado con BioRender.com. En esta figura se observa la secuencia de ensamblado del sistema óptico y mecánico del microscopio de Pinzas Magnéticas sobre los soportes estructurales impresos en 3D, que van montados sobre la torre guía de aluminio. (A) Se aprecian los componentes principales del sistema de enfoque y observación del microscopio MT como el actuador lineal manual SM1ZA, el piezoeléctrico y el objetivo de inmersión 100x. (B) Detalle de los componentes ubicados en el segundo soporte impreso en 3D, con el lente plano convexo de 50 mm (F=50), el cubo con el espejo dicroico 50:50, y la cámara Ximea. (C) Detalle de los componentes ubicados en el primer soporte, incluyendo el LED, el lente plano convexo de 25 mm (F=25), el filtro de luz azul y el diafragma. (D) Imagen del sistema optomecánico completo, destacando las barras lineales ER6 dispuestas en sentido vertical, paralelas a la torre guía, proporcionando robustez y una correcta alineación a la estructura. En el eje horizontal respecto a la torre guía, se utilizaron barras lineales de aluminio cortas ER2 para unir los componentes, asegurando estabilidad y minimizando cualquier posible desalineación. Además, se aprecia la presencia de una cubierta que evita la entrada y salida de luz del sistema.



**Figura 4.10. Distancias entre los diversos elementos del sistema óptico.** Creado con BioRender.com. En cian se aprecian los distintos lentes planos convexos de distancias focales de 25 mm ( $F=25$ ), 50 mm ( $F=50$ ) y 100 mm ( $F=100$ ), así como el espejo dicróico 50:50. En blanco se distingue la cámara, el LED y el diafragma, mientras que en amarillo se muestra el filtro de luz azul FGL495. Finalmente, en rojo se destacan las distancias entre los diversos elementos del sistema óptico. Las distancias más relevantes incluyen 120 mm entre el lente  $F=25$  y el espejo dicróico, el lente  $F=50$  situado 30 mm debajo del espejo dicróico y el lente  $F=100$  colocado a 50 mm a la izquierda del espejo dicróico, con la cámara ubicada a 80 mm del espejo dicróico.

En cuanto al enfoque de la muestra en el microscopio MT está relacionado con el ajuste de los movimientos en el eje Z de diversos componentes ópticos y estructurales. Este ajuste requiere tanto intervención manual como control mediante un software. Respecto de los elementos, el primero corresponde a la platina (**Figura 4.11 A**), una pieza diseñada en impresión 3D (de la cual se plantearon tres alternativas), que requiere de una intervención manual inicial para ajustar el enfoque en el eje Z de la muestra, desplazándola por la torre guía de aluminio. El segundo elemento con intervención manual es el actuador lineal manual SM1ZA de Thorlabs (**Figura 4.11 B**), que controla movimientos en el eje Z del objetivo de inmersión, con un recorrido de 50  $\mu\text{m}$  por revolución y un control de precisión en incrementos de 1  $\mu\text{m}$ , hasta un total de 2 mm. El tercer elemento es un piezoeléctrico (P-725.CDD, Physik Instrumente) (**Figura 4.11 B**), un instrumento electrónico proporciona el ajuste de enfoque más preciso del sistema. Este piezoeléctrico cuenta con un recorrido de 18  $\mu\text{m}$ , tiempos de respuesta de 5 ms y una súper resolución de 0,2 nm, asegurando un enfoque óptimo y altamente detallado del sistema optomecánico. Esta pieza es conectada a 220 V, y trae incluido en su diseño de fabricación un Control Proporcional Integral Derivativo (PID) y viene configurado, además está bajo el control de una tarjeta de adquisición de datos alimentada por 220 V (DAQ, NI USB-6341, National Instruments) (**Figura 4.11.1**), que actúa como un convertor de señales digitales a analógicas, se comunica a través de un canal de salida AO1 al piezoeléctrico y por un USB 3.0 a un computador, permitiendo la comunicación entre el piezoeléctrico y el computador. Así, mediante un software especializado para la medición de experimentos en el MT, se puede controlar el movimiento del piezoeléctrico para ajustar con precisión la distancia del objetivo a la muestra, logrando un enfoque muy exacto.



**Figura 4.11. Sistema de enfoque del microscopio de Pinzas Magnéticas.** El movimiento y enfoque de la muestra en el microscopio MT está relacionado con el ajuste de algunos componentes ópticos y estructurales de los en el eje Z. (A) La flecha blanca indica el movimiento del ajuste manual necesario para enfocar la platina. (B) El segundo elemento con intervención manual es el actuador lineal manual (SM1ZA, Thorlabs), que controla movimientos en el eje Z del objetivo de inmersión. Además, se observa el instrumento electrónico piezoeléctrico (P-725.CDD, Physik Instrumente) que permite el ajuste de enfoque más preciso del sistema. *Preparado en con BioRender.*



**Figura 4.11.1. Conexión del piezoeléctrico con la tarjeta de adquisición de datos (DAQ).** El piezoeléctrico está bajo el control del DAQ a través de la salida analógica AO1. A través de este canal el DAQ es capaz de enviar información desde el computador al piezoeléctrico, así es posible el control preciso de movimiento para ajustar la distancia del objetivo a la muestra, logrando un enfoque exacto. *Preparado en con BioRender.*

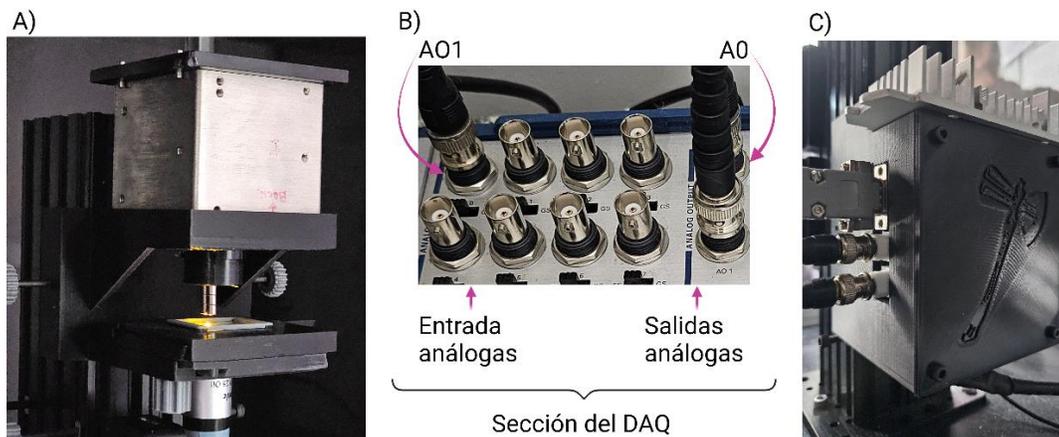
Como se mencionó anteriormente, los movimientos en los ejes X e Y de la muestra están asociados al movimiento de la platina, y en este caso, se cuenta con tres alternativas cuyo control del sistema de movimiento es diferente (**Figura 4.12**). Todas permiten la experimentación con cámaras de fluidos y están diseñadas para funcionar con la aplicación de campos magnéticos por parte de un actuador de enfoque lineal (LFA-10 +, servoamplificador SCA814, Equipment Solutions) (**Figura 4.12**). Este actuador es capaz de moverse 10 mm con un rango de resolución de 50 nm, por lo que cuenta con una gran precisión a la hora de experimentar. Además, todas las platinas cuentan con el mismo diseño en la parte superior para soportar este instrumento y comparten el mismo sistema Dove-tail. Respecto a los imanes, estos se ubicaron en dos columnas antiparalelas compuestas de tres unidades de N52, las cuales fueron centradas por medio de un objetivo 4x para asegurar su alineación correcta (**Figura 4.12.1**).



**Figura 4.12. Sistemas de movimiento XY del microscopio MT.** Comparación de las tres alternativas de platinas para el control de movimientos en los ejes horizontales de la muestra. Las tres piezas mantienen un diseño uniforme en cuanto a la ubicación del actuador lineal de enfoque, que controla los movimientos de los magnetos permanentes, y utilizan el mismo sistema Dove-tail para el desplazamiento por la torre guía de aluminio. (A) Platina Original; (B) Platina Manual 3D; (C) Platina Motorizado.

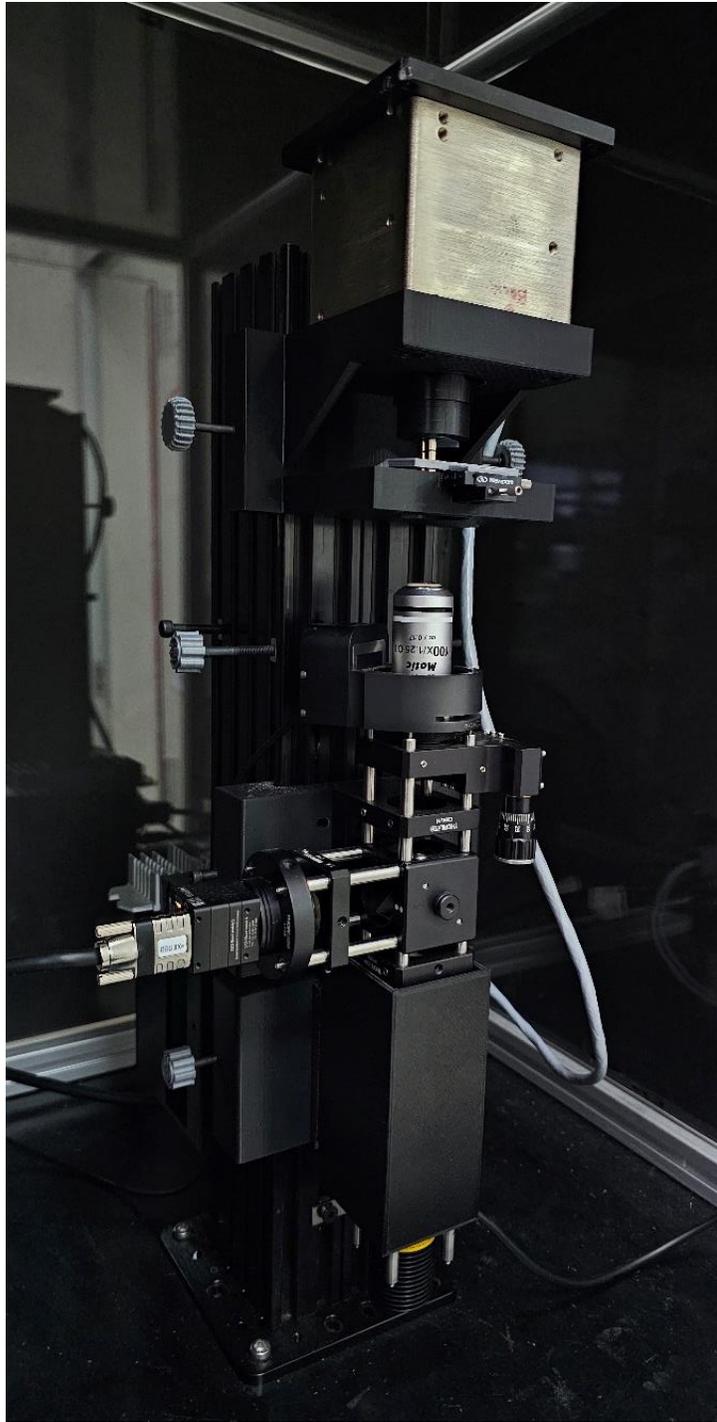
El actuador lineal de enfoque, LFA-10 +, utilizado para controlar los movimientos de los magnetos, es controlado por la misma tarjeta convertidora de datos análogo digital (DAQ) que controla al piezoeléctrico. Para ello, se empleó un circuito electrónico con un control de retroalimentación de tipo Proporcional Integral Derivativo (PID) que ajusta constantemente la posición, permitiendo acercar o alejar los magnetos de la muestra. Este circuito PID, fue perfeccionado y calibrado previamente por el Grupo de Biología Mecánica, permitiendo el control de movimientos altamente precisos  $-0,05\text{ mm}$ — con un rango de movimiento de  $8,5\text{ mm}$  y con tiempos de respuesta de  $100\text{ ms}$  (**Figura 4.12.1**).

El circuito cuenta con una resistencia de  $2\text{ k}\Omega$  y su alimentación proviene de una fuente de poder de tres salidas ( $+15\text{ V}$ ,  $-15\text{ V}$  y tierra), conectada a  $220\text{ V}$ . Para organizar todos los componentes y cables involucrados en el control de LFA-10 +, se diseñó e imprimió en 3D una Caja de Circuitos específica, que alberga todos los elementos de manera ordenada y segura. Además de la precisión del control, este sistema, que es encendido mediante un interruptor, garantiza que los movimientos de los magnetos sean suaves y controlados, mejorando la calidad y reproducibilidad e los experimentos realizados. Las comunicaciones entre el circuito y el DAQ, tanto de entrada como de salida análogas, fueron establecidas mediante el uso de cables “Bayonet Neill-Concelman” (BNC), conectados en los canales análogos A0 y AO1, entrada y salida respectivamente. Todos los elementos mencionados en conjunto permiten que la configuración sea la necesaria para poder obtener un microscopio con la habilidad de aplicar campos magnéticos de fuerza con precisión espacial en el orden los  $\text{nm}$  (**Figura 4.12.1**).



**Figura 4.12.1. Sistema electrónico de control y comunicación del LFA-10 + del MT.** El actuador lineal LFA-10 + es el responsable del movimiento preciso de los magnetos permanentes. Este instrumento a es controlado por la misma tarjeta de adquisición de datos (DAQ) que controla al piezoeléctrico. La presencia de un circuito electrónico con un Control Proporcional Integral Derivativo (PID) es indispensable para ajustar constantemente la posición de los magnetos, permitiendo alejarlos o acercarlos a la muestra. (A) Vista detalla del actuador lineal de enfoque LFA-10+ montado sobre una platina. (B) Entradas y salidas análogas que permiten la comunicación entre el DAQ, el actuador lineal, el circuito PID y el computador. (C) Se observa la caja de circuitos que alberga el circuito PID.

Como se mencionó anteriormente, el diseño del microscopio se basó en la continuación de un modelo previamente implementado en el laboratorio por el Grupo de Biología Mecánica. El desarrollo y ensamblado del microscopio de Pinzas Magnéticas (MT) por completo (**Figura 4 13**), requirió de la adquisición de una variedad de componentes optomecánicos, estructurales y electrónicos. La mayoría de estos elementos fueron adquiridos de Thorlabs. Otros componentes electrónicos provinieron de proveedores como Cimech3D, National Instruments, Physik Instrumente y Ximea (**Tabla 2**).



**Figura 4.13. Ensamblado completo del Microscopio de Pinzas Magnéticas (MT).** El espectrómetro de fuerza, MT, se basa en un diseño de microscopio invertido, donde tanto el objetivo como la fuente de luz están ubicados debajo de la platina donde se coloca la muestra. Este instrumento se ensambló siguiendo el orden establecido en el diseño y modelado implementado en Fusion 360, asegurando la correcta disposición de cada pieza y funcionalidad de cada componente.

**Tabla 2. Componentes y piezas del microscopio de Pinzas Magnéticas.** En la tabla adjunta, se detallan todas las piezas utilizadas para el ensamblado del microscopio de Pinzas Magnéticas. Se especifica el nombre de cada elemento, la cantidad de piezas, el código de identificación de cada ítem y su proveedor correspondiente.

<b>Piezas del microscopio:</b>	<b>Ítem</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Barras de aluminio largas</b>	ER6-P4	Thorlabs	1
<b>Barras de aluminio cortas</b>	ER2-P4	Thorlabs	2
<b>Monturas</b>	CP35/M	Thorlabs	3
<b>Monturas</b>	CP36	Thorlabs	1
<b>Monturas U</b>	CBB1/M	Thorlabs	2
<b>Montura redonda</b>	CP38	Thorlabs	1
<b>Anillo adaptador cámara</b>	SM1LTRR	Thorlabs	1
<b>Cubo</b>	CM1-DCH/M	Thorlabs	1
<b>LED</b>	MCWHL6-C1	Thorlabs	1
<b>Diafragma</b>	CP20S	Thorlabs	1
<b>Dicroico</b>	BSW10R	Thorlabs	1
<b>Lente 25 focal</b>	LA1951-B	Thorlabs	1
<b>Lente 75 focal</b>	LA1608-B	Thorlabs	1
<b>Lente 100 focal</b>	LA1509-B	Thorlabs	1
<b>Dial</b>	LEDD1B	Thorlabs	1
<b>Hilo 1</b>	RMSA3	Thorlabs	1
<b>Hilo 2</b>	SM1A17	Thorlabs	1
<b>Hilo 3</b>	SM1A4	Thorlabs	1
<b>Retenedor cámara</b>	CM1L03	Thorlabs	1
<b>Filtro</b>	FGL495	Thorlabs	1
<b>Fuente de poder</b>	KPS201	Thorlabs	1
<b>Perfil aluminio 6063-T5</b>	(V-slot) tipo C de 80x40 mm	Cimech 3D	2
<b>Piezoeléctrico</b>	P-725.CDD	Physik Instrumente	1
<b>CCD</b>	MQ013MG-ON	Ximea	1
<b>Actuador Lineal de Enfoque</b>	LFA10+	Equipment Solutions	1
<b>Objetivo 100X</b>	1101001705251	Motic	1
<b>Imanes de neodimio</b>	NdFeB grado N52	K&J Magnetics	2
<b>Actuador lineal manual Eje Z</b>	SM1ZA	Thorlabs	1
<b>Platina XY "Original"</b>	MS-125-XY	Newport	1
<b>Cables</b>	BNC estándar	N/A	N/A
<b>Plancha carro grande para perfiles tipo C</b>	004136C	Cimech 3D	1
<b>Pernos Allen cabeza hexagonal</b>	M6 y M4	N/A	N/A

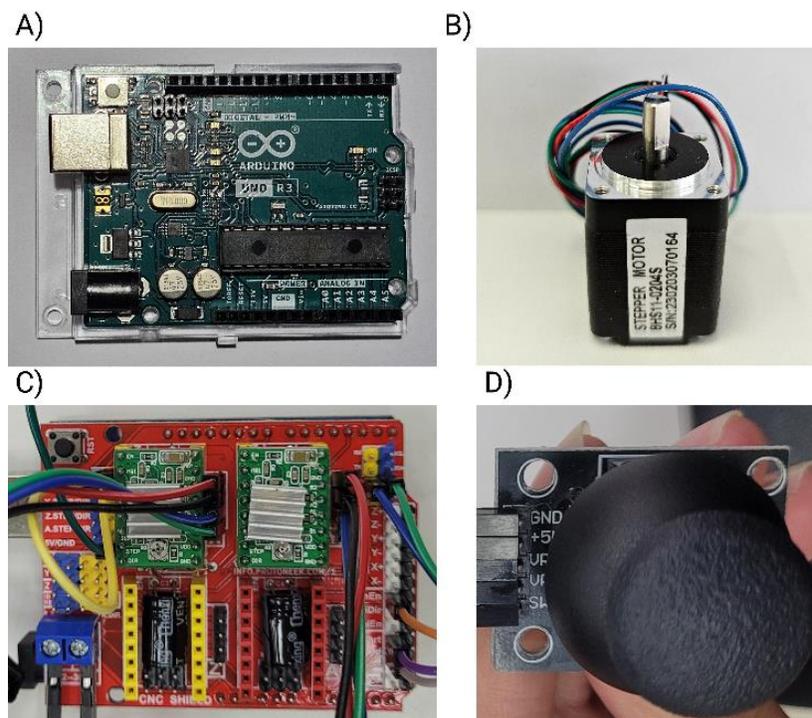
#### 4.6 Sistema Motorizado vía microcontroladores de tipo Arduino

Para el funcionamiento de la platina con el sistema “Motorizado”, se utilizaron microcontroladores de tipo Arduino, para un control preciso y la posibilidad de editar los componentes. La configuración de estos componentes electrónicos y el orden las conexiones fueron vitales para una correcta operación del sistema motorizado, para ello se utilizó una tarjeta Arduino UNO R3 SMD, sobre está se dispuso una tarjeta CNC Shield para el control de máquinas motorizadas de hasta cuatro motores y un ensamblado modular (Figura 4.14) (Tabla 3). Se utilizaron dos controladores Pololu A4988, a los cuales se les estableció un voltaje de  $\sim 0.112$  V. Este valor no es arbitrario, ya que se calcula con la fórmula de voltaje de referencia ( $V_{REF}$ ), donde el límite de la corriente máxima del motor ( $I_{MAX}$ ), en este caso un NEMA8 de 0.2 A, se multiplica por un valor constante 8 y por la resistencia de detección de corriente ( $R_{CS}$ ) del controlador A4988 ( $R_{100} = 0.1$  ohm) (89).

$$V_{REF} = I_{MAX} \times 8 \times R_{CS}$$

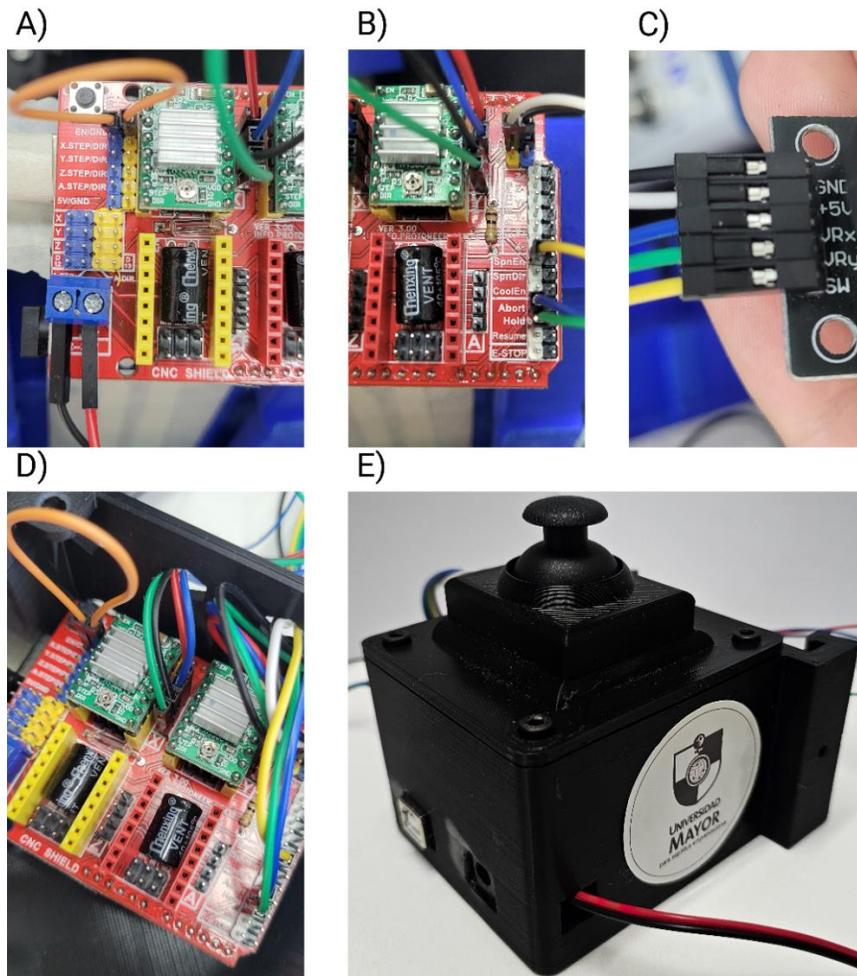
(Ecuación 7)

El resultado es 0.16 V, dado que los motores paso a paso se utilizaron en la configuración de resolución “Full Step”, se multiplicó el valor final por 0.7 con la finalidad de limitar la corriente máxima del motor NEMA8 a 0.14 A (70% del valor nominal 0.2 A) para no reducir su vida útil. Tanto los motores como el híbrido entre la tarjeta Arduino UNO y la CNC Shield fueron alimentados por una fuente de poder regulable seleccionable (BA2122A, Best America, 12VDC-2A).



**Figura 4.14. Componentes utilizados para el funcionamiento del sistema de platina Motorizado.** (A) Vista detallada de la tarjeta Arduino UNO R3 SMD. (B) Detalle del Motor NEMA8, se utilizaron dos para motorizar la platina. (C) Conjunto de la tarjeta CNC Shield y los controladores Pololu A4988. (D) Módulo de joystick para el control de los movimientos en X e Y de la platina Motorizado.

Las conexiones se realizaron interpretando el híbrido entre la tarjeta Arduino UNO y la CNC Shield, en donde todas las conexiones se realizaron en la CNC Shield. Se hizo un puente en la unidad habilitada EN/GND ubicada debajo del botón de reinicio (cable naranja) (**Figura 4.14.1 A**). Los cuatro cables (rojo, azul, negro y verde) provenientes de los motores se conectaron en los cabezales X e Y (**Figura 4.14.1 B**). Los cables del módulo de joystick se conectaron en 5V/GND (blanco y negro), en SpnEN (representado por el pin digital 12 en la tarjeta Arduino UNO) para el interruptor del joystick (cable amarillo), y en Abort y Hold, representando a los pines analógicos A0 y A1 respectivamente (cables azul y verde), controlando los movimientos de los ejes X (azul) e Y (verde) (**Figura 4.14.1 B y C**). Todos estos componentes fueron almacenados bajo la protección de una caja denominada Control del Sistema Motorizado, proporcionando un acceso simple para el mantenimiento del sistema (*Revisar Anexo, Planos de Componentes Varios*).



**Figura 4.14.1. Conexiones establecidas en los componentes electrónicos para el Control del Sistema Motorizado.** (A) Detalle del puente en la unidad habilitada EN/GND ubicada debajo del botón de reinicio (cable naranja) y la conexión a 220 V a través de los cables negro y rojo en la parte inferior. (A) y (B) Muestran los cuatro cables (rojo, azul, negro y verde) provenientes de los motores que se conectaron en los cabezales X e Y en la tarjeta CNC Shield. (B) y (C) Los cables del módulo de joystick se conectaron en 5V/GND (blanco y negro), en SpnEN para el interruptor del joystick (cable amarillo), y en Abort y Hold (cables azul y verde), controlando los movimientos de los ejes X (azul) e Y (verde). (D) Vista general de los componentes dentro de la caja de almacenamiento. (E) Vista de perfil del Control del Sistema Motorizado finalizado.

La programación del sistema se realizó con el lenguaje de programación C++ en el entorno de desarrollo Arduino IDE. En el código, se definió la configuración electrónica de los dispositivos utilizados y los componentes implementados. Se especificaron los puertos utilizados para la conexión de los dos motores paso a paso NEMA8, así como las conexiones del joystick. Primero, se declararon las variables a utilizar y se estableció la velocidad de los motores en la función “delayMicroseconds()”, siendo 16383 el valor máximo que produce un retraso preciso. A continuación, se configuró la función “void setup”, donde se establecieron algunos pines se situaron como salidas y otros como entradas. Finalmente, la función “void loop” contiene las instrucciones para el control de los motores mediante un joystick, permitiendo movimientos precisos en los ejes X e Y (**Código 1**).

```
// SPECIFICATION&CONNECTION:
// NEMA8 angle rotation 1.8°, 4.8V, current 0.2A
// Arduino UNO R3 SMD + CNC Shield + A4988
// Driver A4988 = 0.114V, formula --> Vref = Imax(0.2A NEMA8) * 8 *
Rs(Driver A4988 R100 = 0.1 ohm) * 0.7 (% use of NEMA8 for full step)
// CNC shield = autoloop EN/GND
// Cable order for CW Blue-Red-Black-Green

// Define Motors Pins Connections
const int stepPin_x = 2;
const int dirPin_x = 5;
const int stepPin_y = 3;
const int dirPin_y = 6;

// Define Joystick Pins Connections
int vrx = A0;
int vry = A1;
int vrx_data = 0;
int vry_data = 0;

// Define Variable
int x = 0;
int y = 0;

// Define Stepper Motor Speed
int SMSpeed = 16383; //16383 Max value
int YSMSpeed = 16383; //16383 Max value
void setup() {
// Sets the pins as Outputs
pinMode(stepPin_x,OUTPUT);
pinMode(dirPin_x,OUTPUT);
pinMode(stepPin_y,OUTPUT);
pinMode(dirPin_y,OUTPUT);
pinMode(vrx , INPUT);
pinMode(vry, INPUT);
}

void loop()
{
joystick();
```

```

}

void joystick()
{
vrx_data = analogRead(vrx); // Reads the value from the specified analog pin
// map input voltages between 0 and 5 volts into integer values between 0 and
1023
Serial.print("Vrx:");
Serial.println(vrx_data);

vry_data = analogRead(vry);
Serial.print("Vry:");
Serial.println(vry_data);

// To Stop the Stepper Motor
if ( (vrx_data > 490) && (vrx_data < 510) )
{
;
}

if ( vrx_data > 700 )
{
digitalWrite(dirPin_x,HIGH); // Direction movement HIGH = cw / LOW =
counter cw
x = x + 1;
digitalWrite(stepPin_x,HIGH); // HIGH, the configured pin as an OUTPUT will
receive 5V
delayMicroseconds(SMSpeed); // Time between each pulse
digitalWrite(stepPin_x,LOW); // LOW, the configured pin as an OUTPUT will
receive 0V
delayMicroseconds(SMSpeed); // Time between each pulse 20000 = 0.02S
}

if ( vrx_data < 300 )
{
digitalWrite(dirPin_x,LOW);
x = x - 1;

digitalWrite(stepPin_x,HIGH);
delayMicroseconds(SMSpeed);
digitalWrite(stepPin_x,LOW);
delayMicroseconds(SMSpeed);
}
}

```

```

if ( vry_data > 700 )
{
digitalWrite(dirPin_y,HIGH);
y = y + 1;
digitalWrite(stepPin_y,HIGH);
delayMicroseconds(YSMSpeed);
digitalWrite(stepPin_y,LOW);
delayMicroseconds(YSMSpeed);
}

if ( vry_data < 300 )
{
digitalWrite(dirPin_y,LOW);
y = y - 1;

digitalWrite(stepPin_y,HIGH);
delayMicroseconds(YSMSpeed);
digitalWrite(stepPin_y,LOW);
delayMicroseconds(YSMSpeed);
}
}

```

(Código 1)

**Tabla 3. Componentes del sistema Motorizado vía microcontroladores de tipo Arduino.** En la tabla adjunta, se detallan todas las piezas utilizadas para la confección de la platina Motorizado. Se especifica el nombre de cada elemento, la cantidad de piezas, el código de identificación de cada ítem y su proveedor correspondiente.

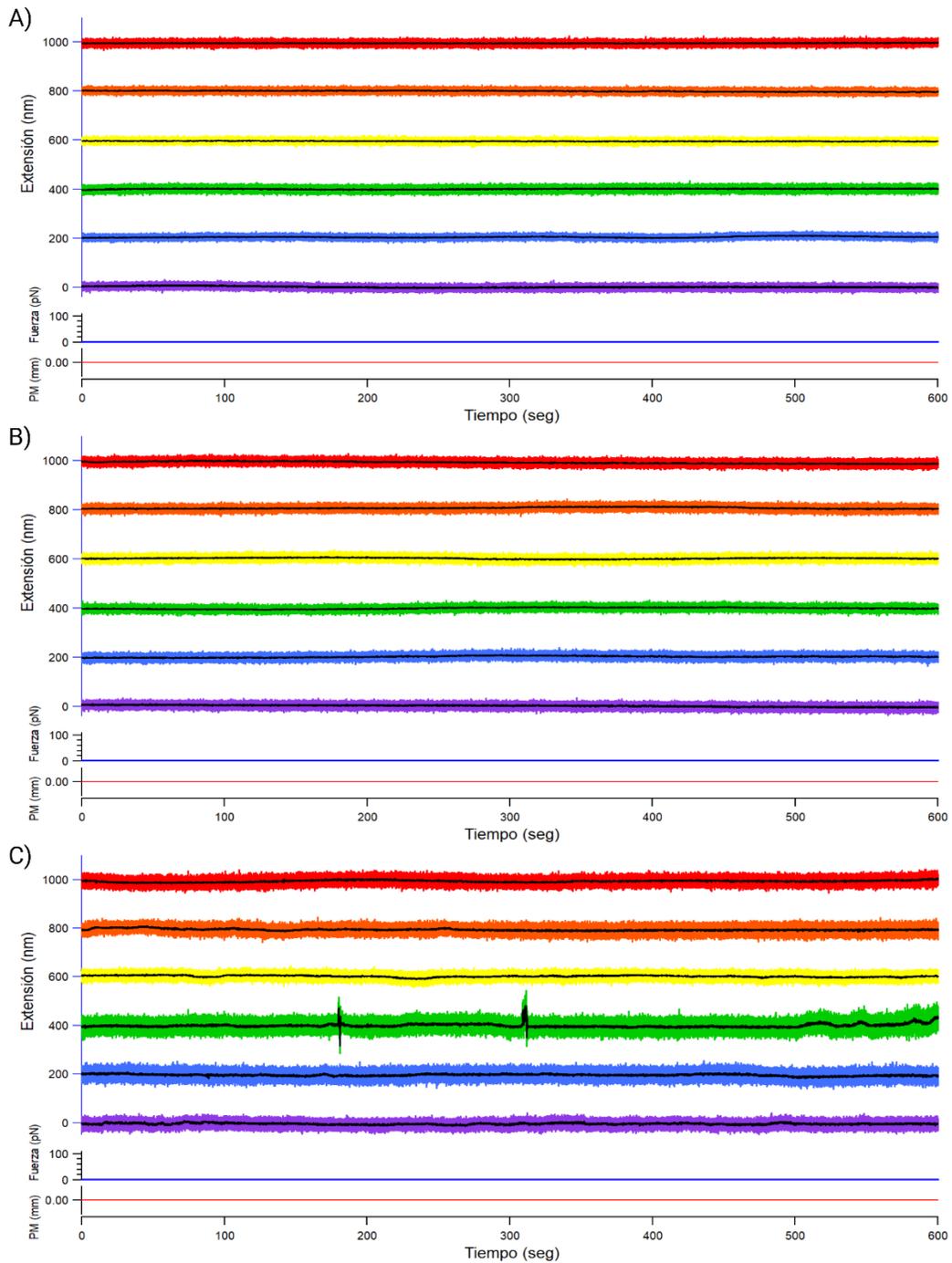
Piezas del Sistema Motorizado	Ítem	Proveedor	Cantidad
<b>Motor paso a paso NEMA8</b>	8HS11-0204S	StepperOnline	2
<b>Tarjeta de Adquisición de Datos (DAQ)</b>	USB-6341	National Instruments	1
<b>Tarjeta Arduino</b>	Arduino UNO R3 SMD	Arduino	1
<b>Módulo de expansión</b>	CNC Shield	Cimech 3D	1
<b>Controlador motores</b>	Driver A4988	Pololu	2
<b>Cables Dupont (MM, MH, HH)</b>	MM, MH, HH	N/A	N/A
<b>Fuente de poder regulable 12VDC-2A</b>	BA2122A	Best America	1
<b>Pernos Allen cabeza hexagonal</b>	M4 y M2	N/A	N/A

#### 4.7 Ensayos de estabilidad de los sistemas de movimiento XY

Luego de completar el ensamblado del espectrómetro de fuerza y corroborar la comunicación entre los elementos y el software, se procedió a realizar ensayos. Como se mencionó anteriormente, el programa utilizado para la experimentación en el Magnetic Tweezer (MT), corresponde al software "MT\_Optimus" que fue previamente adaptado por el Grupo de Biología Mecánica. El primer paso fue ubicar un par de microesferas de referencia de poliestireno de 2,5  $\mu\text{m}$  funcionalizadas en su superficie con grupos aminos (Amino-polystyrene Beads 2.5-2.9  $\mu\text{m}$ , Spherotech, AP-25-10), para realizar ensayos de estabilidad en los diferentes sistemas de movimiento XY de las platinas. Se utilizaron cámaras de micro fluidos pre y post tratadas sin microesferas paramagnéticas ni proteínas. Se seleccionó la región de interés (ROI) y se realizó una librería de 125 imágenes por microesfera; esto quiere decir que el programa capturó una serie de fotografías, cada una de ellas espaciadas 20 nm en el eje vertical, posición Z, comenzando 1000 nm por debajo de la mitad de las microesferas, o de la posición de mejor resolución del objeto (Stack).

Durante la generación de la librería de imágenes, el piezoeléctrico realizó un recorrido de 20 nm por imágenes mientras acercaba el objetivo a la muestra. Este proceso permite comparar la posición de ambas microesferas y contemplar la posible deriva mecánica del instrumento, así como otros factores externos que pueden afectar las mediciones, como cambios de temperatura o vibraciones. Así la posición de las microesferas es comparada con las imágenes de la librería, permitiendo rastrear la posición de estas durante la experimentación e incluso fijar el foco. La Transformación Rápida de Fourier (FFT) permite ajustar el foco deseado al fijar un valor respecto de la posición de la microesfera de referencia, y lo mantiene durante el ensayo. Esto permite generar una compensación para evitar deriva y es realizada por el piezoeléctrico, que ajusta la posición cada 10 nm para adecuarla al foco establecido y mantener un patrón de difracción constante. Al finalizar la generación de la librería de imágenes, la posición de las microesferas es calculada en tiempo real con la FFT, obteniendo un análisis de la concentración de halos de difracción de luz alrededor de las microesferas, lo que es apreciado como anillos de diferentes intensidades. Posteriormente, se ajustó la correlación para comparar la posición de ambas microesferas, con la posición óptica (OP), manteniendo los magnetos (MP) en reposo, ya que al no realizar un experimento con microesferas paramagnéticas no fue necesaria la aplicación de campos magnéticos.

Se realizaron dos tipos de ensayos de estabilidad para evaluar la deriva en los tres sistemas de platinas: Original, Manual 3D y Motorizado. Se llevaron a cabo seis ensayos de 10 minutos (**Figura 4.15**) y un ensayo de 1 hora para cada sistema (**Figura 4.16**). Debido a la presencia de deriva mecánica instrumental, completar los experimentos de 1 hora con éxito resultó desafiante. Estos experimentos permitieron evaluar la posibilidad de realizar experimentos consecutivos con diferentes microesferas y analizar la estabilidad durante experimentaciones prologadas con un mismo par de microesferas durante una hora. De esta forma, se comparó la estabilidad de los tres sistemas de platinas, identificando la incidencia de la deriva mecánica, entendida como un desplazamiento sistemático no deseado que puede afectar las mediciones y que debería de ser cerca a cero. Además, se consideró cómo el incremento de componentes en las platinas influye en la estabilidad experimental.



**Figura 4.15. Ensayos de estabilidad repetidos en el tiempo para los tres sistemas de platinas.** Se realizaron seis ensayos de 10 minutos utilizando microesferas de referencia de poliestireno de 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el eje X se observa el tiempo en segundos, con una duración máxima de 600 segundos por experimento, y en el eje Y se muestra la extensión en nanómetros. Comparar la estabilidad de cada sistema, donde la señal en bruto de los datos está representada en diferentes colores, y en una versión suavizada (sin ruido) se aprecia en negro para facilitar un análisis más claro. Cabe destacar que, al no utilizar microesferas paramagnéticas ni proteínas, la posición de los magnetos (PM) y la fuerza se mantuvieron en cero durante los ensayos. Además, los datos en el eje Y están desplazados (offset) para facilitar la comparación visual. (A) Ensayos de estabilidad de la platina Original, (B) ensayos de estabilidad de la platina Manual 3D y (C) ensayos de estabilidad de la platina Motorizado.

Para determinar la variación en la estabilidad de las diferentes platinas, se generaron histogramas y se ajustaron los datos experimentales a una distribución normal (gaussiana) utilizando el programa Igor Pro-8. En particular, se empleó la función QuickFit Gauss, una versión de la fórmula, que permitió ajustar los datos experimentales con la siguiente ecuación:

$$y(x) = y_0 + A \times e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2w^2}}$$

(Ecuación 8)

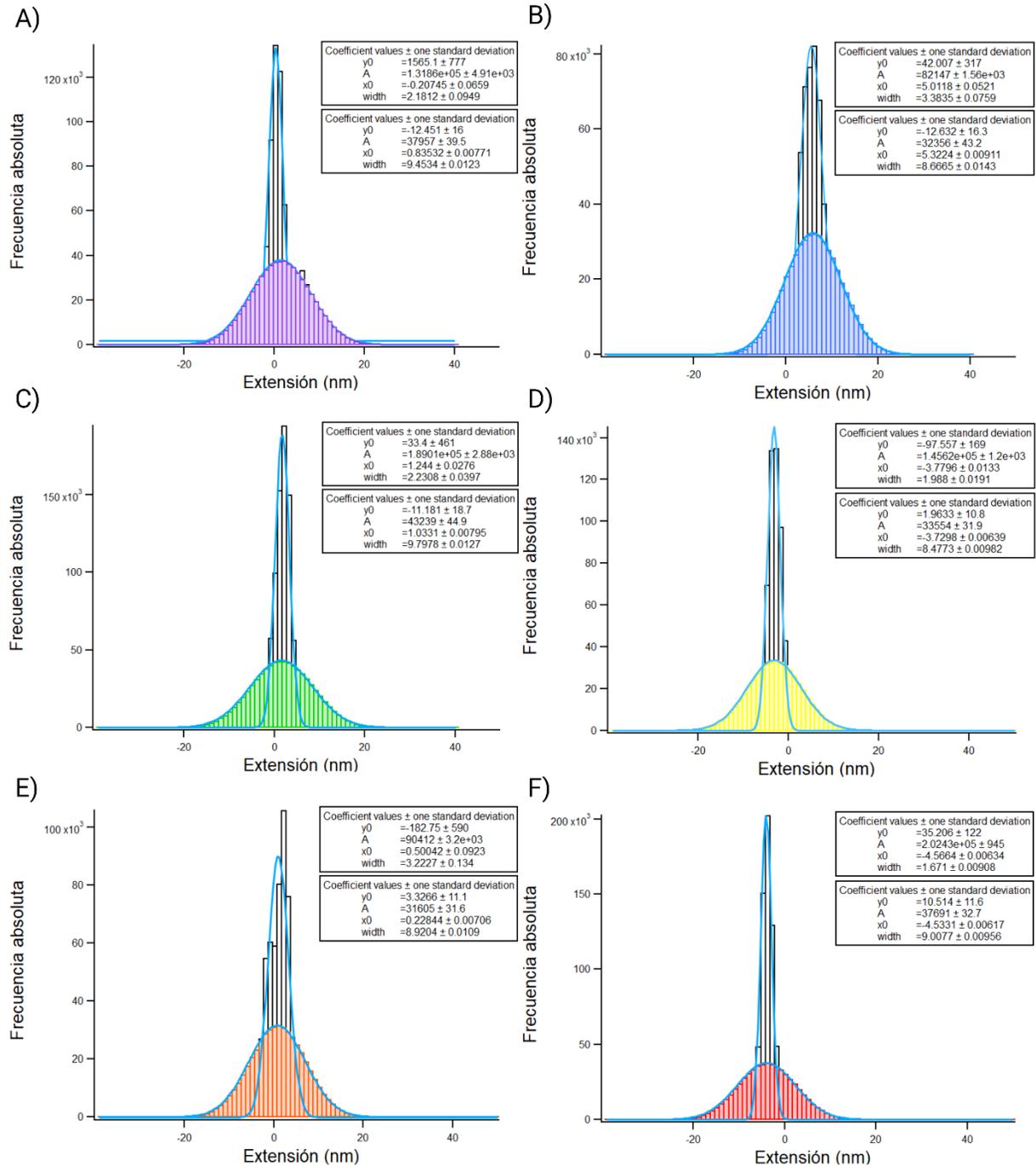
Donde  $Y(x)$  corresponde al valor ajustado de la función en el punto  $x$ ,  $y_0$  es el valor base que indica el desplazamiento vertical de la curva en el eje Y,  $A$  es la amplitud y representa la altura máxima de la curva, y  $x_0$  es la posición del centro de la curva de distribución, equivalente a la media. El ancho de la curva está representado por  $w$ , el cual es proporcional a la desviación estándar, mientras que el exponente  $e$  determina la forma de la campana.

En los ensayos de estabilidad de 10 minutos, se observaron variaciones en los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  entre experimentos, lo cual indica una deriva considerable en el sistema de medición (**Tabla 4**). En el caso de las señales brutas, el ruido presente en los datos afecta la estimación del valor promedio de la extensión, por lo que se comparó con los datos de la señal suavizada para obtener resultados más precisos.

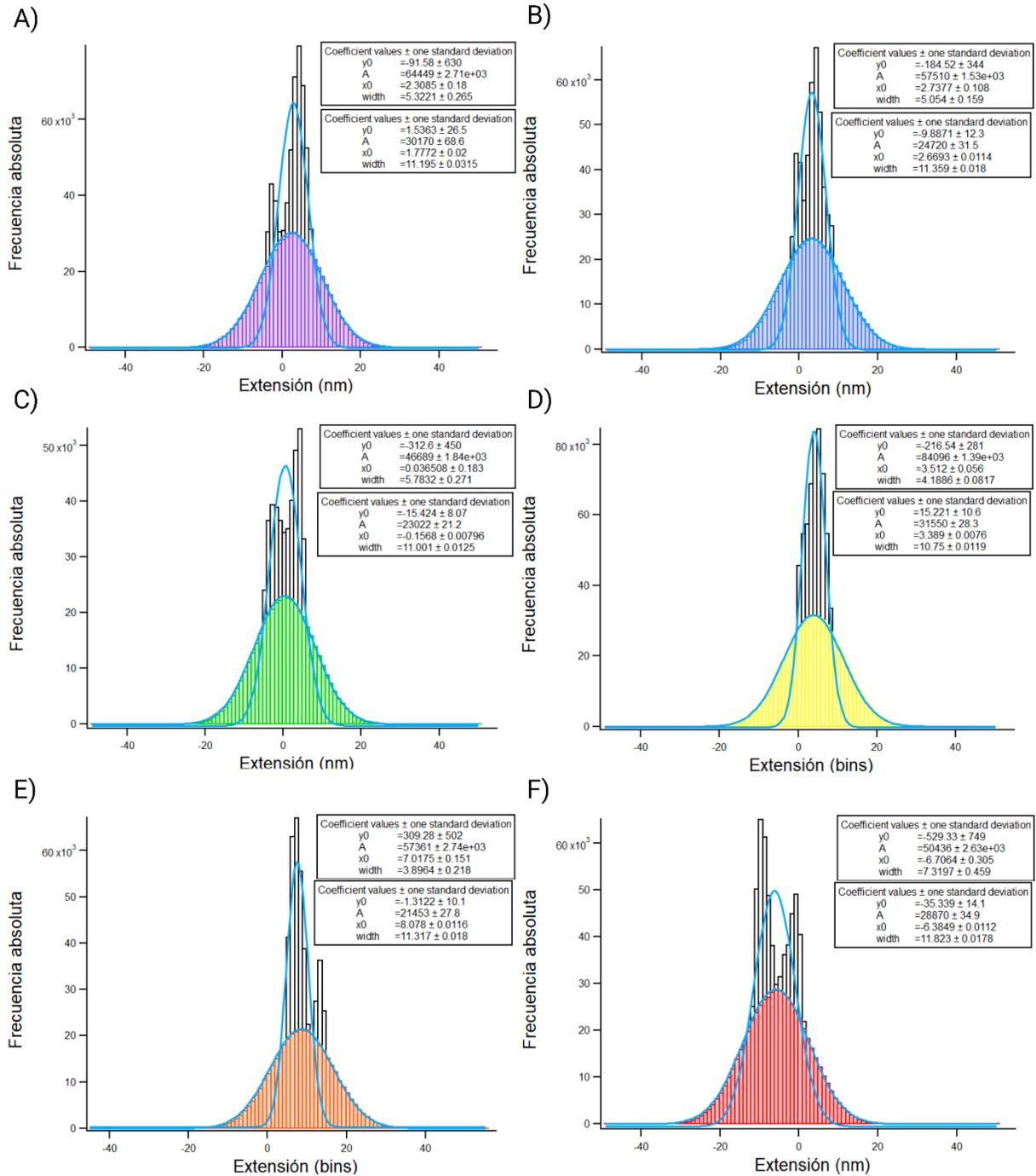
**Tabla 4. Comparación del valor  $x_0$  de las curvas de distribución normal en los ensayos de estabilidad de 10 minutos.** En la tabla adjunta, se detallan los valores del centro de las curvas de distribución normal obtenidas en cada uno de los seis experimentos de 10 minutos para los sistemas de platinas: Original, Manual 3D y Motorizado. Se incluyen tanto los valores de las señales brutas como de las suavizadas, y se presentan parámetros estadísticos como el promedio y la mediana de los seis experimentos.

Experimentos	Platina Original		Platina Manual 3D		Platina Motorizado	
	Posición del centro de la curva " $x_0$ " (nm)					
	Suavizado	Bruto	Suavizado	Bruto	Suavizado	Bruto
1	-0,20745	0,83532	2,3085	1,7772	-5,829	-5,5792
2	5,0118	5,3224	2,7377	2,6693	-3,5362	-3,8624
3	1,244	1,0331	0,036508	-0,1568	-2,5351	-1,1822
4	-3,7796	-3,7298	3,512	3,389	2,8678	2,6075
5	0,50042	0,22844	7,0175	8,078	-7,2301	-6,0658
6	-4,5664	-4,5331	-6,7064	-6,3849	-6,6409	-6,8376
<b>Promedio</b>	<b>-0,230</b>	<b>-0,141</b>	<b>1,48</b>	<b>1,562</b>	<b>-3,817</b>	<b>-3,487</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,354</b>	<b>0,532</b>	<b>2,523</b>	<b>2,223</b>	<b>-4,683</b>	<b>-4,721</b>

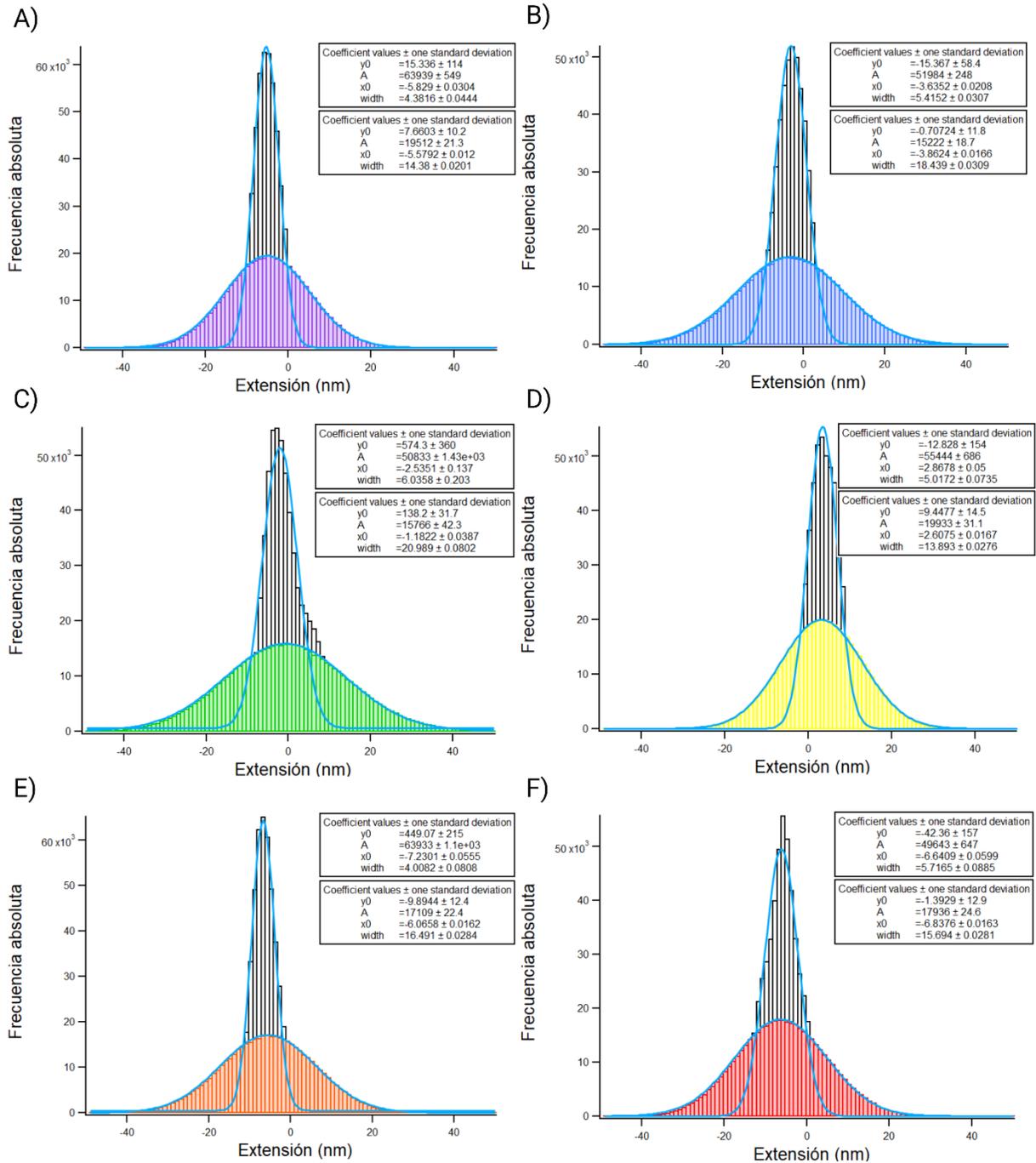
En los histogramas generados, el eje X representa los valores de extensión en nanómetros. Esto permite organizar los datos según la frecuencia absoluta, es decir, el número de ocurrencias dentro de un determinado rango de nanómetros, representado en el eje Y. La curva de distribución normal superpuesta (QuickFit Gauss de Igor Pro-8) describe matemáticamente la distribución normal de los datos, proporcionando la media y la desviación estándar de los resultados de experimentación (**Figura 4.15.1 – 4.15.3**).



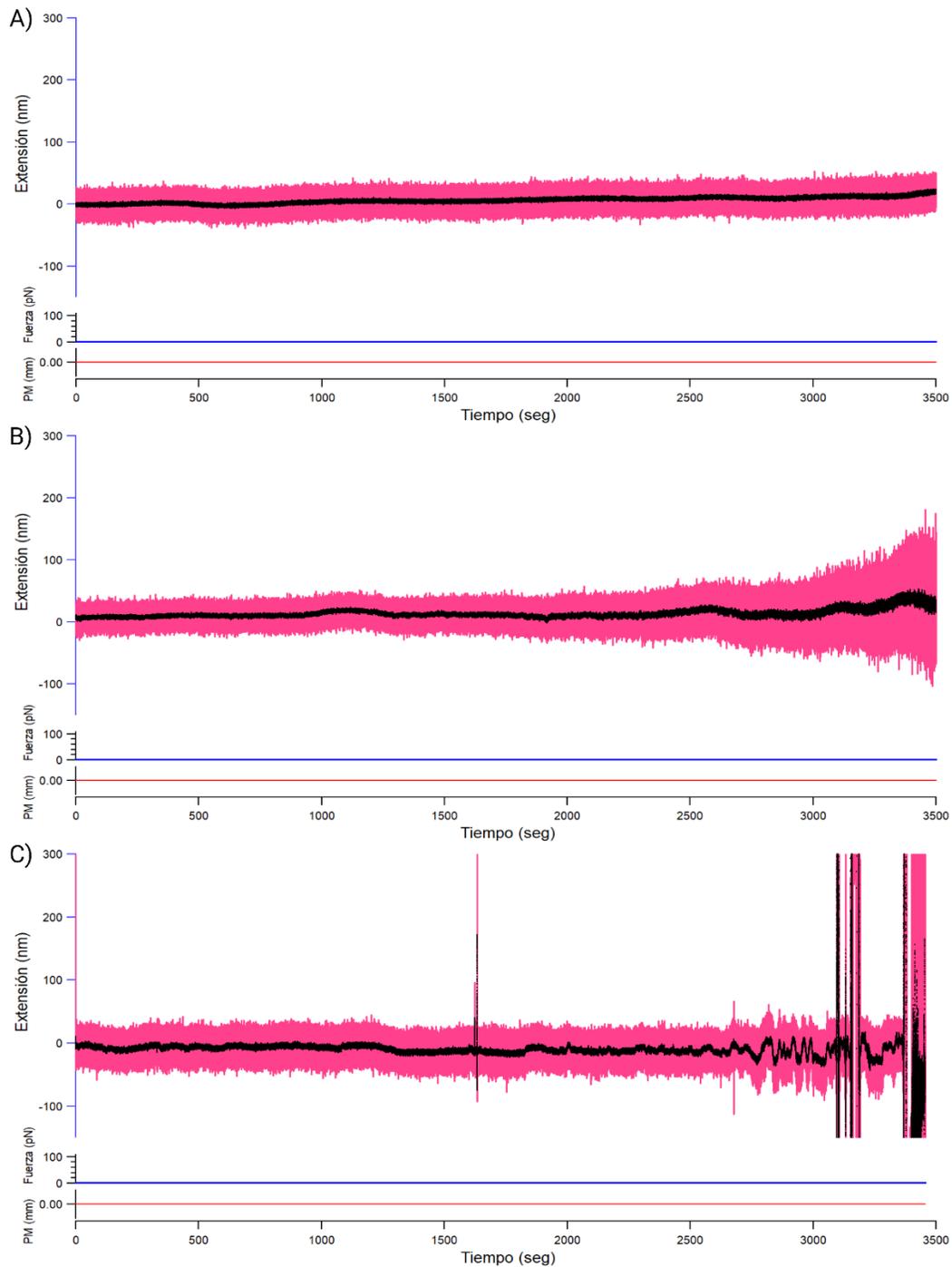
**Figura 4.15.1. Histogramas de los ensayos de estabilidad repetidos en el tiempo para la platina Original.** Cada gráfico (A-F) representa un ensayo de estabilidad de 10 minutos, en colores (morado, azul, verde, amarillo, naranja y rojo) se observa la señal en bruto, y en negro la señal suavizada. En celeste se aprecia la curva de la dispersión normal de los datos, tanto para la señal en bruto como para la señal suavizada. En el eje X de cada gráfico se observa la extensión en nanómetros, y en el eje Y se muestra la frecuencia absoluta. En la leyenda de cada gráfico, ubicada en la esquina superior derecha, se presentan los valores de los coeficientes y la desviación estándar, que acompaña a cada valor, permitiendo conocer la incertidumbre en la estimación de cada parámetro; primero para las señales suavizadas y luego para las señales brutas, de arriba hacia abajo, respectivamente.



**Figura 4.15.2. Histogramas de los ensayos de estabilidad repetidos en el tiempo para la platina Manual 3D.** Cada gráfico (A-F) representa un ensayo de estabilidad de 10 minutos, en colores (morado, azul, verde, amarillo, naranja y rojo) se observa la señal en bruto, y en negro la señal suavizada. En celeste se aprecia la curva de la dispersión normal de los datos, tanto para la señal en bruto como para la señal suavizada. En el eje X de cada gráfico se observa la extensión en nanómetros, y en el eje Y se muestra la frecuencia absoluta. En la leyenda de cada gráfico, ubicada en la esquina superior derecha, se presentan los valores de los coeficientes y la desviación estándar, que acompaña a cada valor, permitiendo conocer la incertidumbre en la estimación de cada parámetro; primero para las señales suavizadas y luego para las señales brutas, de arriba hacia abajo, respectivamente.

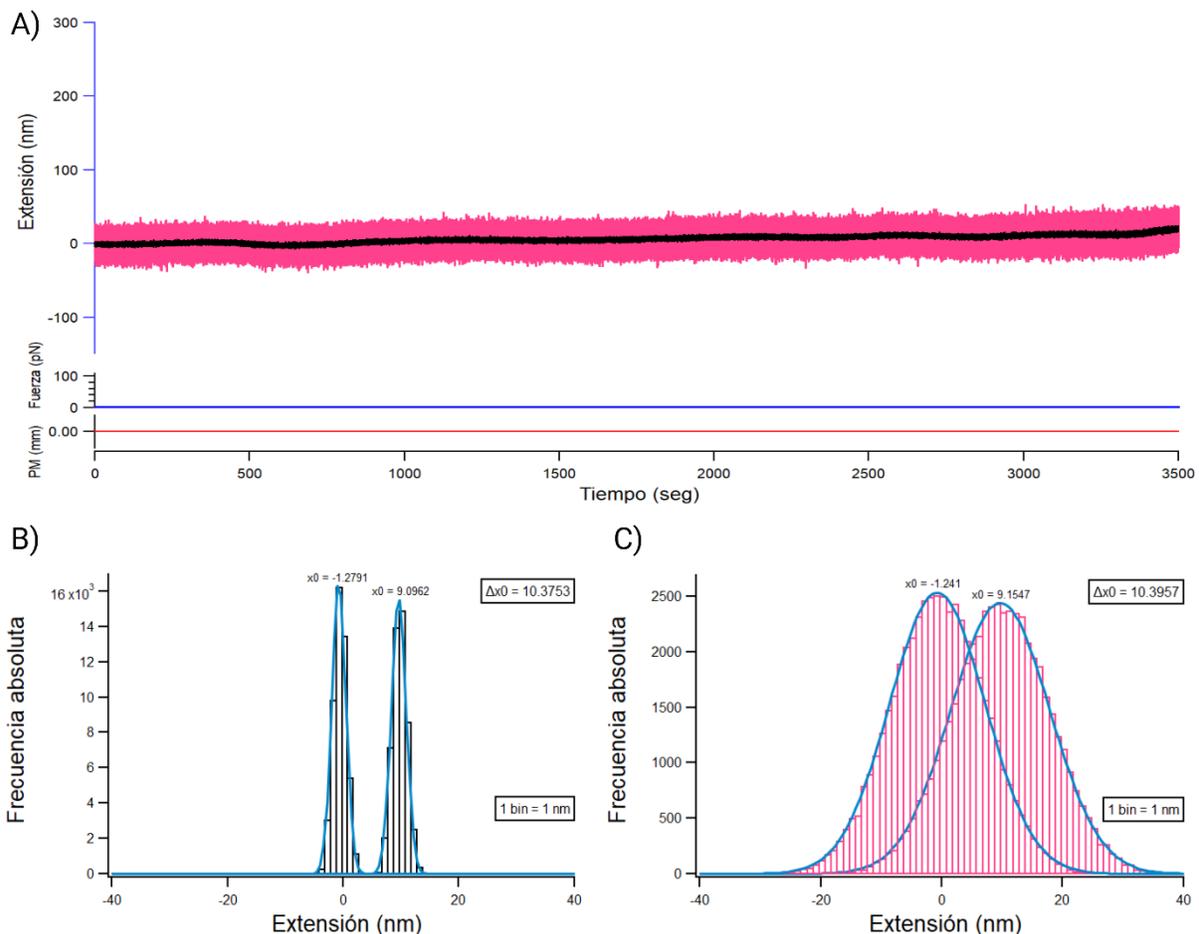


**Figura 4.15.3. Histogramas de los ensayos de estabilidad repetidos en el tiempo para la platina Motorizado.** Cada gráfico (A-F) representa un ensayo de estabilidad de 10 minutos, en colores (morado, azul, verde, amarillo, naranja y rojo) se observa la señal en bruto, y en negro la señal suavizada. En celeste se aprecia la curva de la dispersión normal de los datos, tanto para la señal en bruto como para la señal suavizada. En el eje X de cada gráfico se observa la extensión en nanómetros, y en el eje Y se muestra la frecuencia absoluta. En la leyenda de cada gráfico, ubicada en la esquina superior derecha, se presentan los valores de los coeficientes y la desviación estándar, que acompaña a cada valor, permitiendo conocer la incertidumbre en la estimación de cada parámetro; primero para las señales suavizadas y luego para las señales brutas, de arriba hacia abajo, respectivamente.

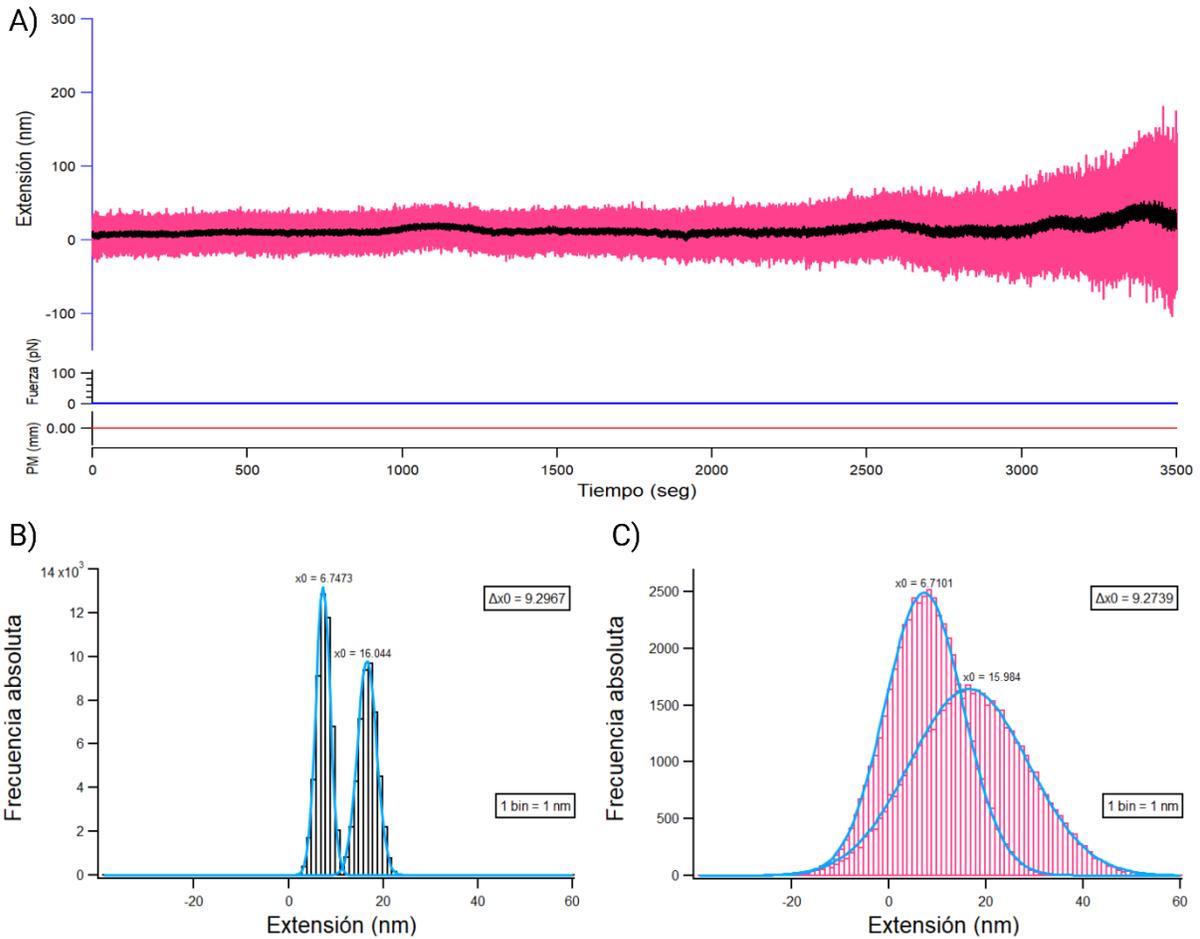


**Figura 4.16. Ensayos de estabilidad de una hora para los tres sistemas de platinas.** Se realizaron ensayos de 1 hora utilizando microesferas de referencia de poliestireno de  $2,5\ \mu\text{m}$  de diámetro. (A) Ensayo de estabilidad para la platina Original, (B) ensayo de estabilidad para la platina Manual 3D y (C) ensayo de estabilidad para la platina Motorizado. En el eje X se observa de cada gráfico se observa el tiempo en segundos, con una duración máxima de 3500 segundos por experimento, y en el eje Y se muestra la extensión en nanómetros, la fuerza y la posición de los magnetos (PM) se cero durante los ensayos. El objetivo es comparar la estabilidad de cada sistema, en rosado se encuentra representada la señal en bruto y en negro la señal suavizada.

Se generaron histogramas para comparar la variación de la estabilidad de los ensayos de 1 hora en los tres sistemas de platina, tomando en consideración el inicio de la experimentación y a los 2500 segundos. A los histogramas se les aplicó un ajuste de distribución normal (celeste) utilizando la función QuickFit Gauss de Igor Pro-8, tanto para la señal en bruto (rosado) como para la señal suavizada (negro) (Figura 4.16.1 – 4.16.3). Se observaron variaciones en los valores del centro de las curvas de distribución normal, lo cual se asocia a la deriva mecánica (Tabla 5).

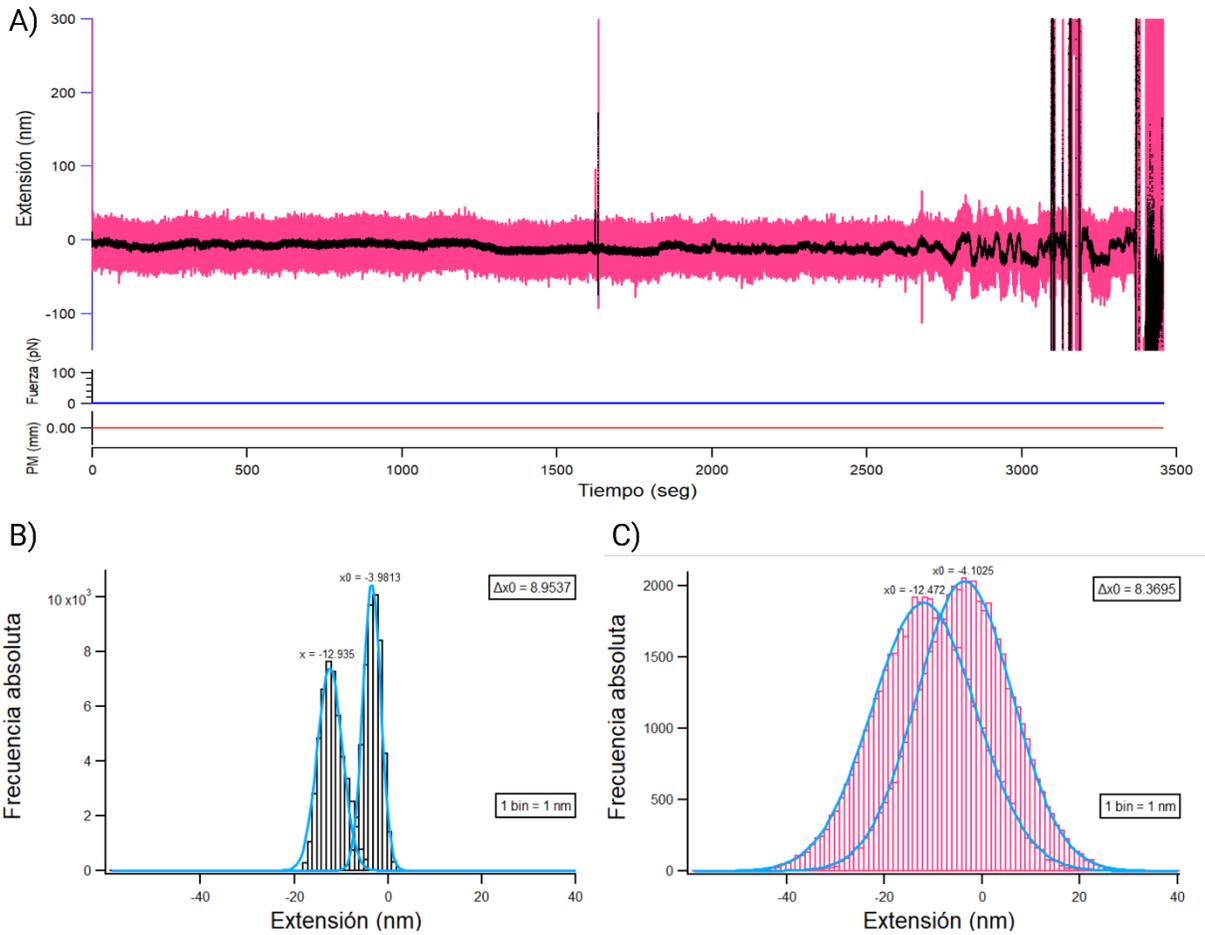


**Figura 4.16.1. Ensayo de estabilidad de una hora para la platina Original.** Se realizaron ensayos de 1 hora utilizando microesferas de referencia de poliestireno de 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En (A), se presenta el ensayo de estabilidad de 3500 segundos para la platina Original, en el eje X se encuentra el tiempo y en el eje Y la extensión en nanómetros. Durante todo el experimento, tanto la fuerza como la posición de los magnetos (PM) se mantuvieron en cero. En (B), se muestra un histograma que compara las señales suavizadas, indicando la variación de la frecuencia en relación con los nanómetros al inicio de la experimentación y a los 2500 segundos, detallando los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en ambas mediciones. En (C), se aprecia la comparación de las señales brutas al inicio del experimento y a 2500 segundos, especificando también los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en cada caso.



**Figura 4.16.2. Ensayo de estabilidad de una hora para la platina Manual 3D.** Se realizaron ensayos de 1 hora utilizando microesferas de referencia de poliestireno de 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En (A), se presenta el ensayo de estabilidad de 3500 segundos para la platina Original, en el eje X se encuentra el tiempo y en el eje Y la extensión en nanómetros. Durante todo el experimento, tanto la fuerza como la posición de los magnetos (PM) se mantuvieron en cero. En (B), se muestra un histograma que compara las señales suavizadas, indicando la variación de la frecuencia en relación con los nanómetros al inicio de la experimentación y a los 2500 segundos, detallando los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en ambas mediciones. En (C), se aprecia la comparación de las señales brutas al inicio del experimento y a 2500 segundos, especificando también los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en cada caso. Después de los 2500 segundos, las variaciones en la extensión aumentaron de manera considerable, lo que impactó significativamente el valor de  $x_0$ .

En el caso del ensayo de 1 hora para la platina Motorizado, después de los 1500 segundos, se observa en el registro de la medición una perturbación que coincide con el fuerte cierre de la puerta del laboratorio, lo que evidencia la sensibilidad el instrumento a factores externos al microscopio. Además, después de los 3000 segundos, el registro mostró grandes perturbaciones significativas, también atribuibles a factores ajenos al sistema de microscopía, por lo cual el ensayo terminó antes de completar 3500 segundos (**Figura 4.16.3**).



**Figura 4.16.3. Ensayo de estabilidad de una hora para la platina Motorizado.** Se realizaron ensayos de 1 hora utilizando microesferas de referencia de poliestireno de 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En (A), se presenta el ensayo de estabilidad de 3500 segundos para la platina Original, en el eje X se encuentra el tiempo y en el eje Y la extensión en nanómetros. Durante todo el experimento, tanto la fuerza como la posición de los magnetos (PM) se mantuvieron en cero. En (B), se muestra un histograma que compara las señales suavizadas, indicando la variación de la frecuencia en relación con los nanómetros al inicio de la experimentación y a los 2500 segundos, detallando los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en ambas mediciones. En (C), se aprecia la comparación de las señales brutas al inicio del experimento y a 2500 segundos, especificando también los valores de la posición del centro de la curva de distribución normal  $x_0$  en cada caso.

**Tabla 5. Comparación del valor  $x_0$  de las curvas de distribución normal en los ensayos de estabilidad de 1 hora.** En la tabla adjunta, se detallan los valores del centro de las curvas de distribución normal obtenidas de los experimentos de 1 hora para los sistemas de platinas: Original, Manual 3D y Motorizado. Se incluyen tanto los valores de las señales brutas como de las suavizadas, y se presentan parámetros estadísticos como el promedio.

Experimentos	Platina Original		Platina Manual 3D		Platina Motorizado	
	Suavizado	Bruto	Suavizado	Bruto	Suavizado	Bruto
<b>Inicio</b>	-1,2791	-1,241	6,7473	6,7101	-12,936	-12,472
<b>2500 seg</b>	9,0962	9,1547	16,044	15,984	-3,9813	-4,1025
<b>Promedio</b>	<b>3,909</b>	<b>3,957</b>	<b>11,396</b>	<b>11,347</b>	<b>-8,459</b>	<b>-8,287</b>

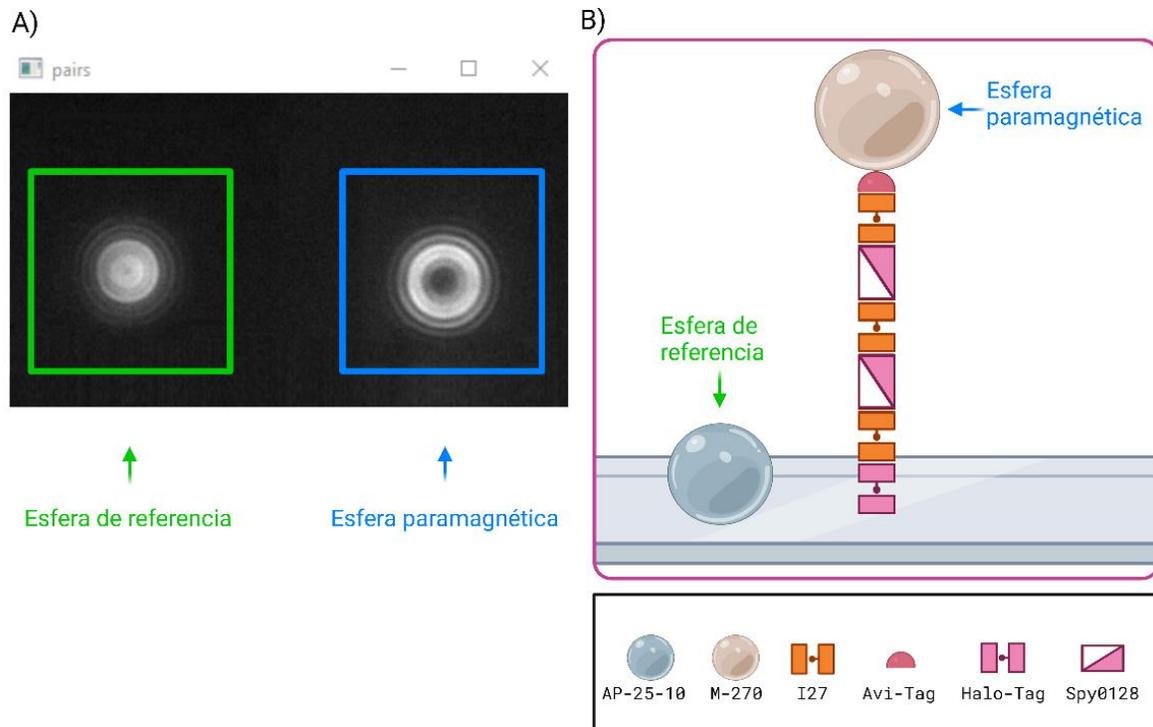
#### 4.8 Ensayos mecánicos de sistemas biológicos inmovilizados

Luego de realizar los ensayos de estabilidad, se procedió a realizar experimentos con sistemas biológicos inmovilizados. Para evaluar las fuerzas mecánicas involucradas en la adhesión bacteriana a escalas biológicas, se utilizó una proteína modificada de Spy0128, pilina principal, que juega un papel importante en la adherencia e invasión del patógeno humano *Streptococcus pyogenes* (1). Como se describió en la metodología (ver sección de Materiales, "Proteínas"), esta proteína recombinante no solo cuenta en sus extremos con una secuencia Avi-Tag y una secuencia Halo-Tag, sino que también incluye tres dominios I27 dispuestos entre dos segmentos repetidos de Spy0128. Estos dominios I27, similares a inmunoglobulinas y pertenecientes a la superfamilia "Ig-like", corresponden a estructuras robustas con una configuración beta-sándwich. Estos dominios son originarios de la proteína titina, una de las proteínas más grandes, que desempeña un papel crítico asociado a resistencia y elasticidad en el músculo esquelético y cardíaco (90).

La estructura robusta del pilus de *S. pyogenes* está dada en gran parte por los enlaces isopeptídicos de Spy0128, que le otorgan gran estabilidad y resistencia a deformaciones mecánicas, favoreciendo una adherencia firme durante la colonización y patogénesis. Como Spy0128 es naturalmente inextensible, y carece de elasticidad significativa, los dominios I27 se incorporaron para servir como modelos experimentales de elasticidad. Esto permite estudiar cómo una proteína inextensible responde a fuerzas mecánicas cuando adquiere propiedades elásticas, proporcionando información sobre su comportamiento frente a tensiones mecánicas, ya sea resistiéndolas o redistribuyéndolas. Utilizando herramientas como la espectroscopía de fuerza, es posible comprender cómo las propiedades mecánicas de Spy0128 contribuyen a la capacidad de adhesión bacteriana, un proceso clave en la colonización inicial del huésped (1,90).

Para ello, se empleó una cámara de fluidos pre y post tratada, por lo que contenía microesferas de referencia (Amino-polystyrene Beads 2.5-2.9  $\mu\text{m}$ , Spherotech, AP-25-10), y se le añadió una disolución de la proteína junto con microesferas paramagnéticas de 2,8  $\mu\text{m}$  de diámetro funcionalizadas con estreptavidina (Dynabeads M-270 Streptavidin, Invitrogen, 65305), tal como se describió en la sección de metodología. Las microesferas paramagnéticas se acoplan en el extremo libre de la proteína de interés debido a la presencia de una secuencia Avi-Tag biotinilada, la cual se une a la estreptavidina presente en las microesferas paramagnéticas. En el otro extremo, la proteína recombinante se encuentra unida de manera covalente al cubreobjetos de 24 x 40 mm, por la presencia de la secuencia Halo-Tag, que se une al ligando de Halo presente en el vidrio.

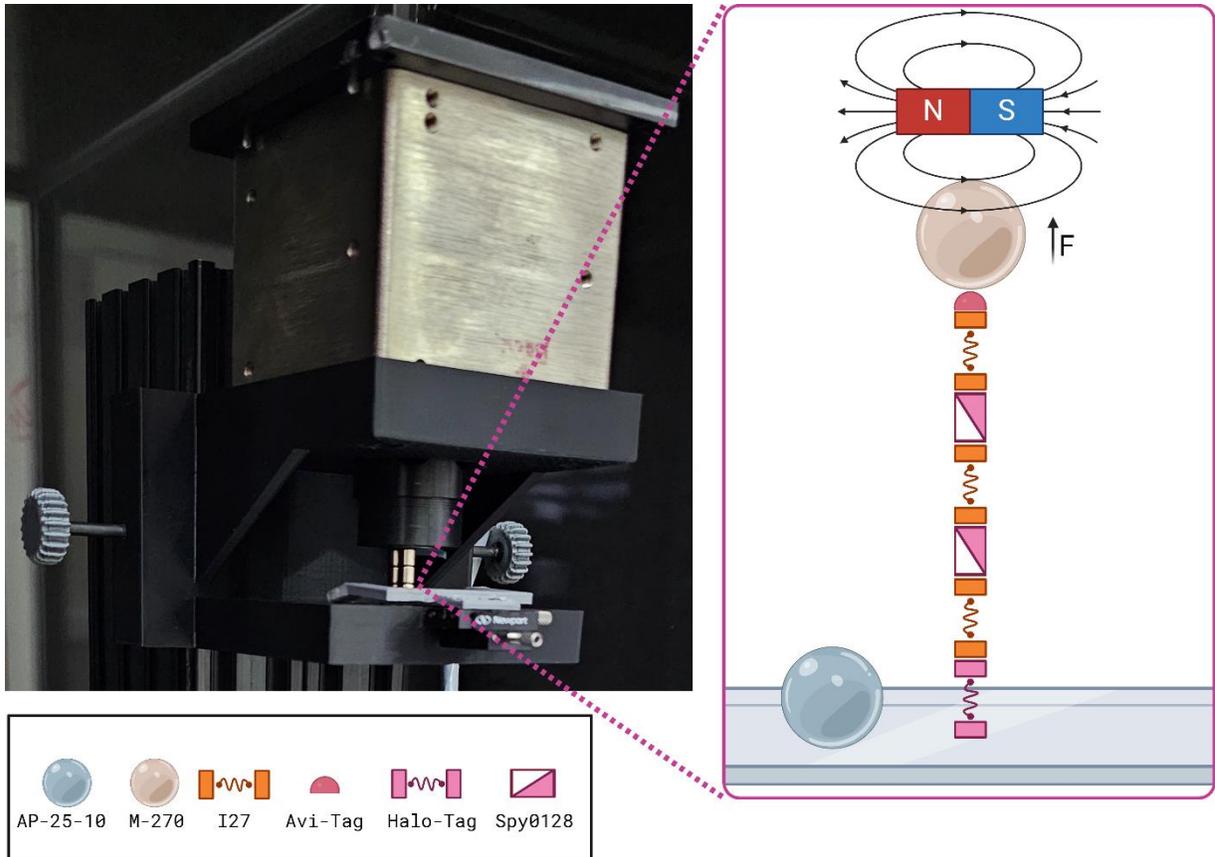
Para la experimentación con en el microscopio de pinzas magnéticas (MT), se utilizó el software "MT\_Optimus". En primer lugar, se realizó una búsqueda exhaustiva de un par de microesferas con las propiedades adecuadas para la experimentación; una microesfera paramagnética con un movimiento pendular adecuado y no exaltado, y una microesfera de referencia cercana, correctamente fijada a la superficie del cubreobjetos de 24 x 40 mm (**Figura 4.17**). Se seleccionó la región de interés (ROI) y se generó la librería de imágenes (Stack). Posteriormente, se ajustó la correlación de ambas microesferas con la posición óptica (OP) y se inició el ensayo de mecánico al establecer la posición de los magnetos (MP).



**Figura 4.17. Representación de microsferas de referencia y paramagnéticas.** (A) Visualización de las microsferas de referencia y paramagnética en la región de interés (ROI) utilizando el software MT\_Optimus. (B) Ilustración de la interacción de la proteína recombinante Spy0128, unida en un extremo a una microsfera paramagnética, sin la aplicación de un campo magnético, y anclada al cubreobjetos en el otro extremo. En contraste, la microsfera de referencia se muestra fijada al vidrio. (La ilustración no está a escala). Preparado con BioRender.

Con el objetivo de realizar ensayos de elasticidad enfocados en la detección de eventos de “despliegue” (unfolding), se configuró el software MT\_Optimus para realizar un recorrido de los magnetos, con distancias que varían entre 4,5 a 0,4 mm. Durante estos ensayos, se comparó el desempeño de las tres platinas: la Original, la Manual 3D y el sistema Motorizado, con el propósito de evaluar la precisión y eficacia de cada platina en el estudio de sistemas biológicos inmovilizados. Se realizaron aproximadamente doce ensayos por cada platina y las figuras presentadas corresponden a ensayos representativos.

Los resultados incluyen la desestabilización de los dominios I27 presentes en la proteína recombinante Spy0128, expresada en el laboratorio de Genómica Microbiana por el Grupo de Biología Mecánica en la cepa BL21 pLysS de *Escherichia coli*. Este constructo proteico contiene tres dominios estables y elásticos similares a inmunoglobulinas, conocidos como I27, los cuales están dispuestos de forma intercalada entre dos segmentos repetidos de Spy0128 (Figura 4.17.1). Los eventos de despliegue asociados a los dominios I27 se identificaron al observar incrementos de ~25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm) en las mediciones a fuerzas menores a 200 pN para Spy0128 recombinante, ya que Spy0128 nativa es inextensible a fuerzas de hasta 800 pN (19,91–93).

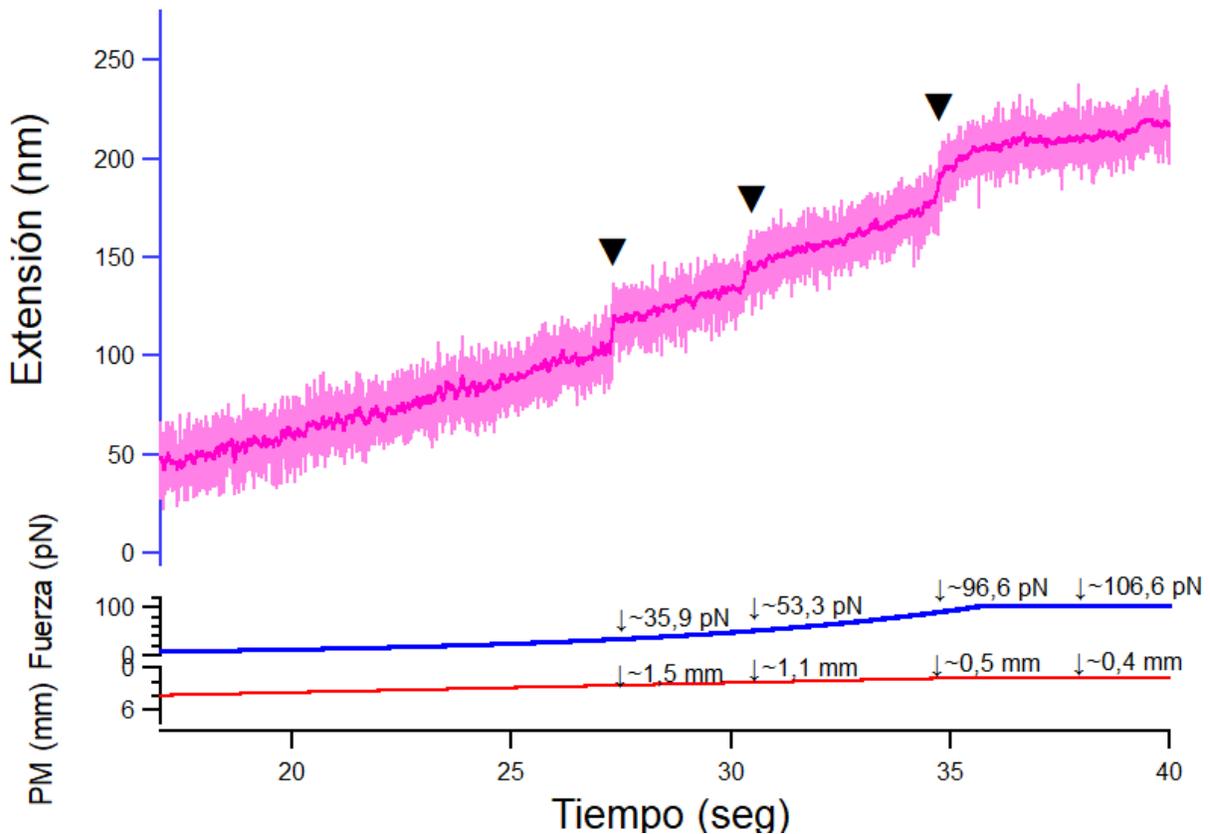


**Figura 4.17.1. Representación del despliegue de la proteína Spy0128 de *S. pyogenes* durante los ensayos de mecánicos de sistemas biológicos inmovilizados.** Al aplicar un campo magnético a la biomolécula inmovilizada, se observa el despliegue de los tres dominios elásticos, conocidos como I27, presentes en el constructo proteico recombinante de Spy0128. La proteína está anclada a la superficie del cubreobjetos por medio de la secuencia Halo-Tag, mientras que en su extremo opuesto se une a una microesfera paramagnética a través de la secuencia Avi-Tag. Además, la microesfera de referencia se muestra fijada a la superficie del vidrio. (La ilustración no está a escala). Preparado con BioRender.

La extensión de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 de *S. pyogenes* en el sistema de platina Original ocurrió a los 40 segundos. Se destaca que el primer despliegue se produjo alrededor de los 27 segundos, requiriendo de una fuerza de 35,9 pN. El segundo dominio se desplegó después de los 30 segundos, con una fuerza aproximada de 53,3 pN, y el último dominio se desplegó a los 35 segundos, necesitando una fuerza de 96,6 pN (Figura 4.18). La fuerza fue calculada por el programa Igor Pro-8 en función de la posición de los magnetos (PM) mediante la siguiente ecuación:

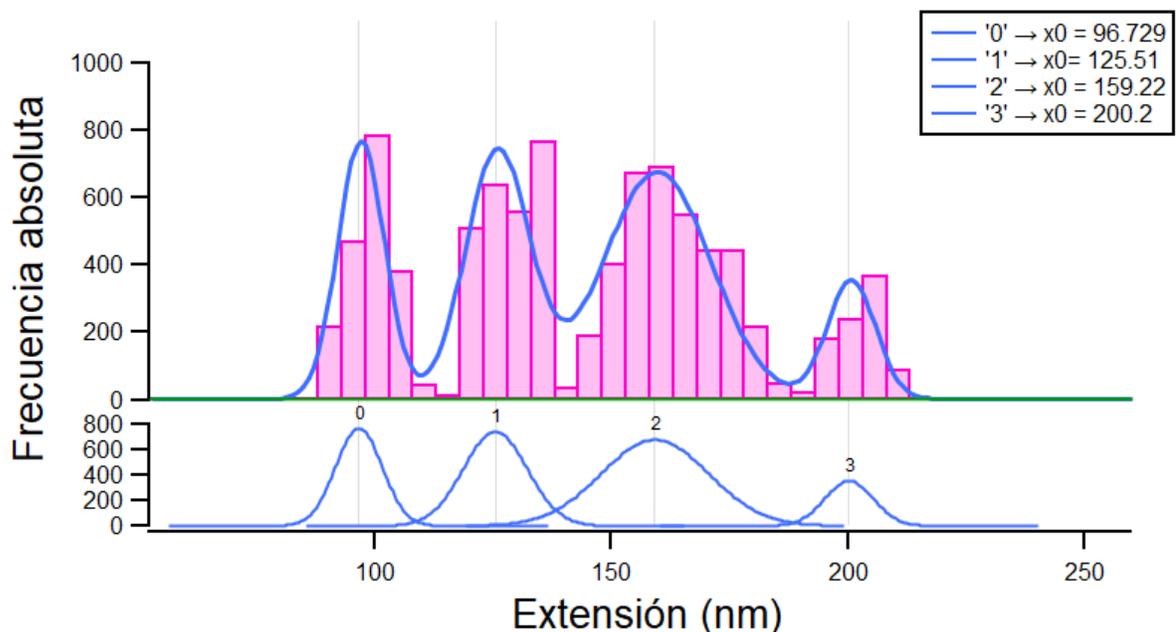
$$Fuerza = 158.4 \times EXP(-0.99 \times (PM - 1))$$

(Ecuación 9)



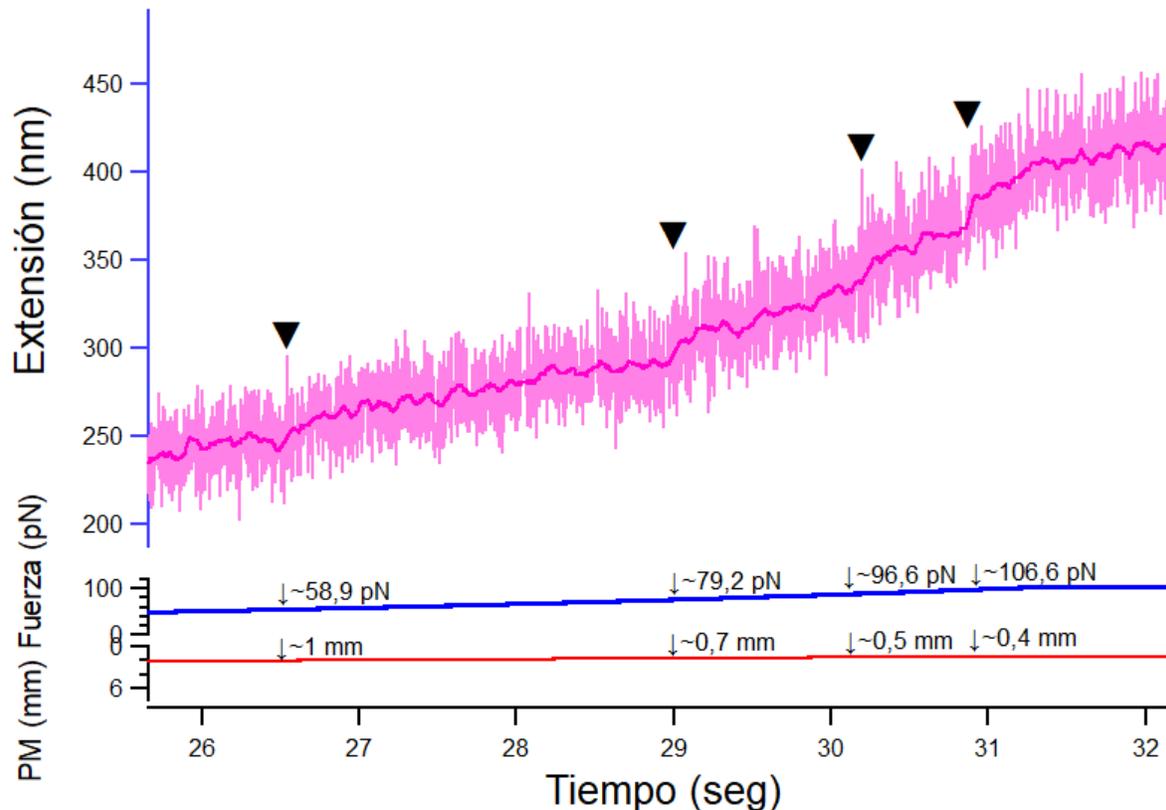
**Figura 4.18. Evento de despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Original.** El gráfico muestra en el eje X el tiempo en segundos, y en el eje Y, la extensión de la biomolécula en nanómetros, la fuerza en piconewtons y la posición de los magnetos (PM) en milímetros. La línea azul representa la fuerza aplicada, mientras que la línea roja indica la posición de los magnetos. La franja rosa claro representa a la señal en bruto del evento de despliegue de la biomolécula, y la franja de color rosa oscuro la señal suavizada. Los triángulos negros señalan los "steps" o dominios desplegados. El experimento se realizó aproximadamente doce veces.

Para confirmar que los pasos observados en el gráfico anterior de la Figura 4.18 corresponden a los dominios I27, se realizó un análisis de ajuste “Múltiple Peak Fit” en Igor Pro-8. En este análisis, los datos fueron ajustados utilizando distribuciones normales, lo que permitió obtener la posición central de las cimas de las curvas ( $x_0$ ) y comparar las distancias en nanómetros entre ellas. Esto se debe a que se sabe que la extensión de un dominio I27 es de aproximadamente 25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm), y para Halo-Tag es de  $\sim 40$  nm ( $\geq 40$  nm) (1,12,19,91–93). Así, la diferencia entre la cima “3” y “2” es de  $\sim 40,98$  nm, lo que se atribuyen a la extensión de Halo-Tag, mientras que la diferencia entre la cima “2” y “1” es de  $\sim 30,7$  nm, correspondiendo a un dominio I27, y entre la cima “1” y “0” es de  $\sim 28,8$  nm, lo que indica un segundo dominio I27 (Figura 4.18.1).



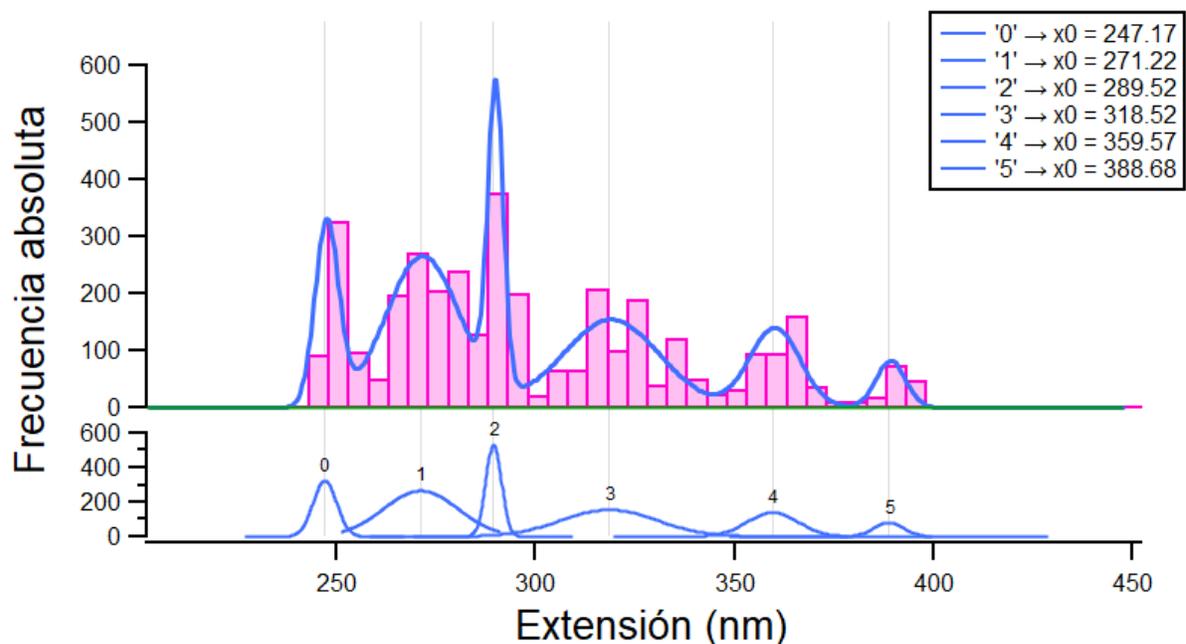
**Figura 4.18.1. Análisis del ajuste Múltiple Peak Fit para el despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Original.** En el gráfico se observa en el eje X la extensión en nanómetros y en el eje Y la frecuencia absoluta. La línea azul continua representa el ajuste de los datos mediante múltiples distribuciones aplicadas a la señal suavizada, mostrada en las barras rosadas. Los números 0, 1, 2 y 3 indican la descomposición individual de las cimas, centrándose en la información del centro de estas ( $x_0$ ), que se detalla en la leyenda de la esquina superior derecha.

La extensión de los tres dominios I27 y el Halo-Tag de la proteína recombinante Spy0128 de *S. pyogenes* en el sistema de platina Manual 3D se observó a los 32 segundos. El primer evento de despliegue ocurrió alrededor de los 26,5 segundos, requiriendo de una fuerza de 58,9 pN. El primer dominio I27 se desplegó a los 29 segundos, con una fuerza estimada de 79,2 pN; el segundo dominio se desplegó a los 30 segundos, con una fuerza de 96,6 pN; y el tercer dominio de despliegue a los 31 segundos, necesitando una fuerza de 106,6 pN (Figura 4.19).



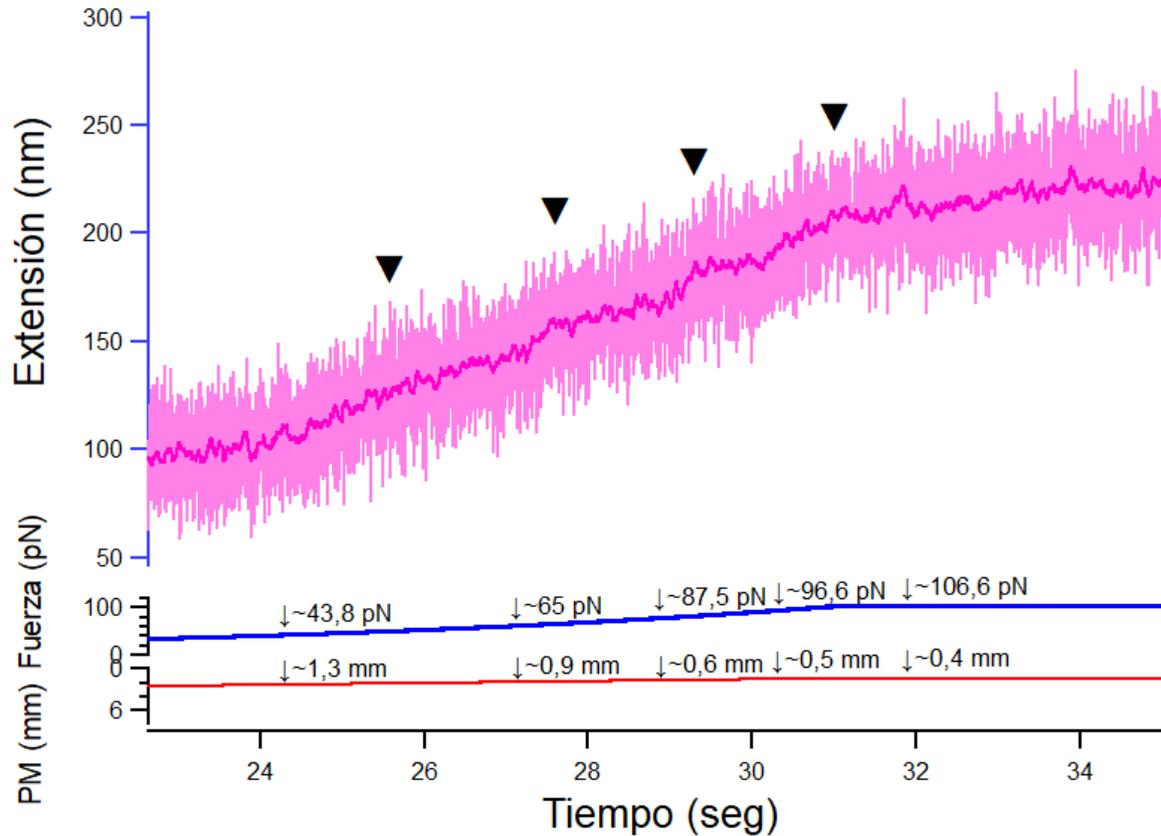
**Figura 4.19. Evento de despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Manual 3D.** El gráfico muestra en el eje X el tiempo en segundos, y en el eje Y, la extensión de la biomolécula en nanómetros, la fuerza en pico newtons y la posición de los magnetos (PM) en milímetros. La línea azul representa la fuerza aplicada, mientras que la línea roja indica la posición de los magnetos. La franja rosa claro representa a la señal en bruto del evento de despliegue de la biomolécula, y la franja de color rosa oscuro la señal suavizada. Los triángulos negros señalan los “steps” o dominios desplegados, observándose cuatro en total: uno atribuido a Halo-Tag y tres correspondientes a los dominios I27. El experimento se realizó aproximadamente doce veces.

Para verificar que los despliegues observados en el gráfico anterior de la Figura 4.19 corresponden a los dominios I27 y a Halo-Tag, se llevó a cabo un análisis de ajuste “Múltiple Peak Fit” en Igor Pro-8. Este análisis ajustó los datos mediante distribuciones normales, lo que permitió determinar la posición central de las cimas de las curvas ( $x_0$ ) y comparar las distancias entre ellas. La extensión de un dominio I27 es de aproximadamente 25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm), y para Halo-Tag es de  $\sim 40$  nm ( $\geq 40$  nm) (1,12,19,91–93). Al calcular la diferencia entre las cimas, se encontró que la diferencia entre las cimas “5” y “4” es de  $\sim 29,11$  nm, lo que se atribuye a la extensión de un dominio I27. La diferencia entre la cima “4” y “3” es de  $\sim 41,05$  nm, correspondiente a Halo-Tag. La diferencia entre la cima “3” y “2” es de  $\sim 29$  nm, indicando un segundo dominio I27. La diferencia entre la cima “2” y “1” fue menor a 20 nm, lo que no coincide con ninguna de las distancias conocidas para los dominios; sin embargo, entre la cima “1” y “0” se obtuvo una diferencia de 24,05 pN, atribuida a un tercer dominio I27 (Figura 4.19.1).



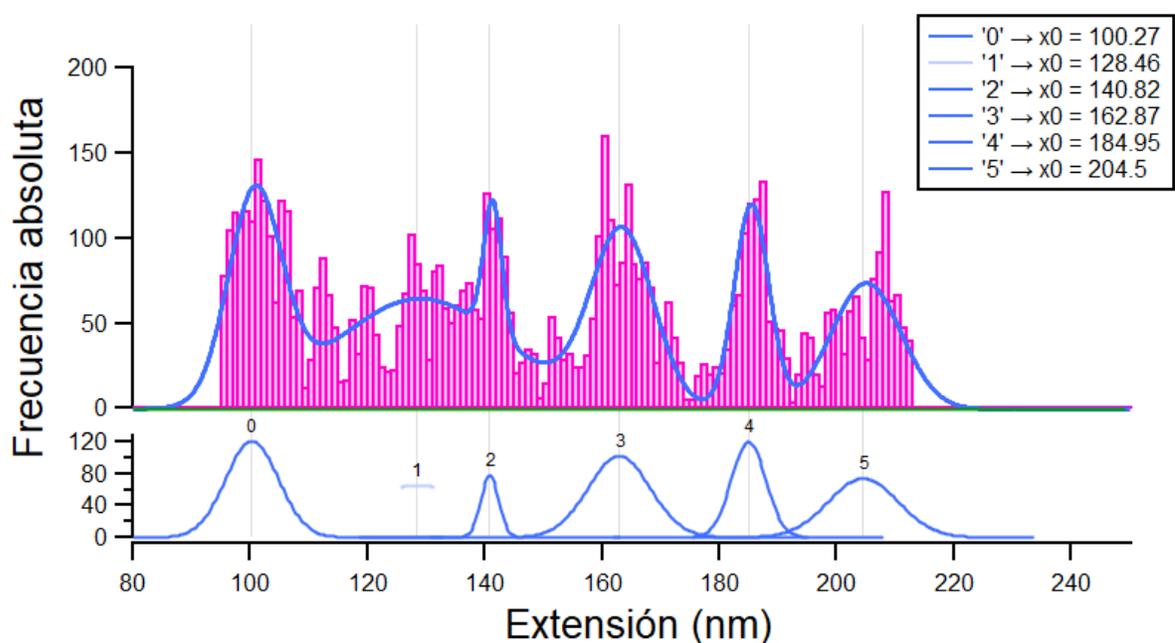
**Figura 4.19.1. Análisis del ajuste Múltiple Peak Fit para el despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Manual 3D.** En el gráfico se observa en el eje X la extensión en nanómetros y en el eje Y la frecuencia absoluta. La línea azul continua representa el ajuste de los datos mediante múltiples distribuciones aplicadas a la señal suavizada, mostrada en las barras rosadas. Los números 0, 1, 2, 3, 4 y 5 indican la descomposición individual de las cimas, centrándose en la información del centro de estas ( $x_0$ ), que se detalla en la leyenda de la esquina superior derecha.

La extensión de los tres dominios I27 y el Halo-Tag de la proteína recombinante Spy0128 de *S. pyogenes* en el sistema de platina Motorizado ocurrió a los 34 segundos. Se destaca que el primer despliegue se produjo alrededor de los 25 segundos, requiriendo de una fuerza de 43,8 pN. El primer dominio I27 se desplegó a los 27 segundos, con una fuerza aproximada de 65 pN; el segundo dominio se desplegó a los 29 segundos, necesitando una fuerza de 87,5 pN; y el último dominio de despliegó a los 30 segundos con una fuerza de 96,6 pN (Figura 4.20).



**Figura 4.20. Evento de despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Motorizado.** El gráfico muestra en el eje X el tiempo en segundos, y en el eje Y, la extensión de la biomolécula en nanómetros, la fuerza en pico newtons y la posición de los magnetos (PM) en milímetros. La línea azul representa la fuerza aplicada, mientras que la línea roja indica la posición de los magnetos. La franja rosa claro representa a la señal en bruto del evento de despliegue de la biomolécula, y la franja de color rosa oscuro la señal suavizada. Los triángulos negros marcan los “steps” o dominios desplegados; en este caso, se identifican cuatro: uno correspondiente a Halo-Tag y tres dominios I27. El experimento se realizó aproximadamente doce veces.

Para confirmar que los despliegues observados en el gráfico anterior de la Figura 4.20 corresponden a los dominios I27 y a Halo-Tag, se realizó un análisis “Multipeak Fit” en Igor Pro-8. Este análisis aplicó múltiples distribuciones normales para ajustar los datos, lo que permitió determinar la posición central de las cimas ( $x_0$ ) y medir las distancias entre ellas. La extensión de un dominio I27 es de aproximadamente 25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm), mientras que el Halo-Tag tiene una extensión de  $\sim 40$  nm ( $\geq 40$  nm) (1,12,19,91–93). Al calcular la diferencia entre las cimas, se observó que la distancia entre las cimas “5” y “4” es de  $\sim 19,55$  nm, lo que se atribuye a un dominio I27. La diferencia entre la cima “4” y “3” es de  $\sim 22,08$  nm, correspondiente a un segundo dominio I27. La diferencia entre la cima “3” y “2” es de  $\sim 22,05$  nm, indicando un tercer dominio I27. La diferencia entre la cima “2” y “1” fue menor a 20 nm (12,36 nm), lo que no coincide con las distancias conocidas para los dominios. Además, el tramo entre las cimas “2” y “0” no presenta una cima clara, por lo que el número “1” fue descartado. Sin embargo, la diferencia entre la cima “2” y “0” fue de 40,55 pN, lo que se atribuye al Halo-Tag (Figura 4.20.1).



**Figura 4.20.1. Análisis del ajuste Multipeak Fit para el despliegue de los dominios I27 de la proteína recombinante Spy0128 en la platina Motorizado.** En el gráfico se observa en el eje X la extensión en nanómetros y en el eje Y la frecuencia absoluta. La línea azul continua representa el ajuste de los datos mediante múltiples distribuciones aplicadas a la señal suavizada, mostrada en las barras rosadas. Los números 0, 1, 2, 3, 4 y 5 indican la descomposición individual de las cimas, centrándose en la información del centro de estas ( $x_0$ ), que se detalla en la leyenda de la esquina superior derecha.

#### 4.9 Prueba de Conceptos del Sistema Motorizado

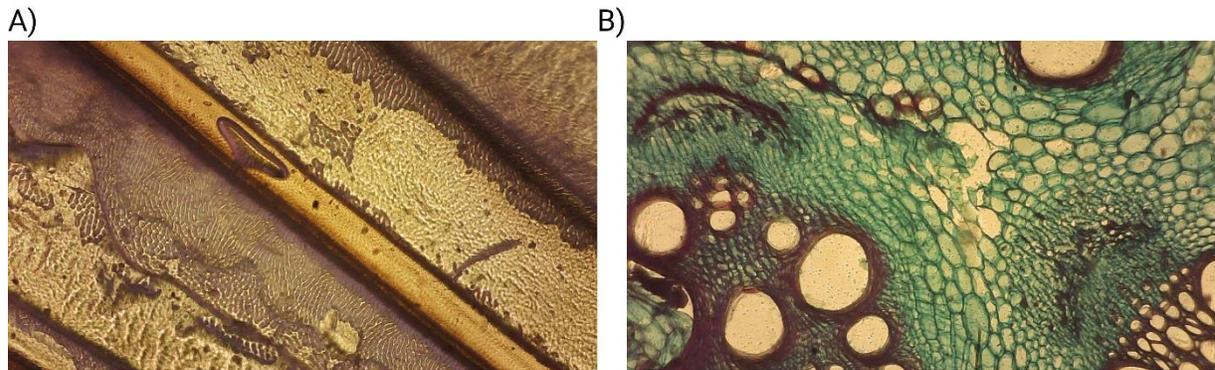
Con el objetivo de poner a prueba el desarrollo del sistema de microscopía motorizado para el estudio de sistemas biológicos inmovilizados, se llevó a cabo una prueba de conceptos del sistema de platina Motorizado del microscopio Pinzas Magnéticas (MT). Para ello, se creó una adaptación de menor tamaño del microscopio invertido, que carece de la habilidad de aplicar campos magnéticos, pero que permite realizar experimentos tanto en el laboratorio como fuera de este. El resultado de esta adaptación fue el “Micrón Loupe” (**Figura 4.21**), un microscopio de ciencia básica que utiliza la misma configuración electrónica para ejecutar movimientos precisos en los ejes X e Y de la muestra que el microscopio MT, y cuenta con un modelo simplificado del sistema óptico (*Revisar Anexo, Componentes de Loupe*).

Este enfoque responde al interés de desarrollar instrumentos con vistas a su futura automatización, con el propósito de agilizar y optimizar ciertas prácticas mediante el uso de equipos accesibles, reproducible y adaptables para laboratorios académicos. Esta adaptación en miniatura del microscopio invertido permitió poner a prueba el sistema motorizado de control de movimientos XY (**Figura 4.21**), lo que lo llevó a su participación en el Arduino Day 2024 de la Universidad Autónoma. En este evento, Loupe obtuvo el tercer lugar de prototipos tipo Arduino, lo que corroboró la funcionalidad y versatilidad del sistema de movimientos motorizado XY, además resaltar el potencial para el desarrollo de equipos accesibles y personalizados por laboratorios (*Revisar Anexo, Planos de Loupe*).



**Figura 4.21. Prueba de conceptos del sistema motorizado para microscopía, Loupe.** Se presenta una versión simplificada de un microscopio invertido motorizado, sin la habilidad de aplicar campos magnéticos, para el estudio de sistemas biológicos inmovilizados en ciencia básica, tanto en laboratorio como en campo. Este microscopio cuenta con un sistema motorizado para los movimientos en los ejes X e Y de la platina que sostiene la muestra, permitiendo un control preciso de la posición de la muestra durante la experimentación.

El nivel de resolución del sistema de engranajes de Loupe está determinado por el desplazamiento lineal por revolución del engranaje. Utilizando la Ecuación 5, se obtuvo un desplazamiento de 7,8 mm (86–88). Al dividir este valor entre el número de pasos por revolución del motor paso a paso NEMA 8 (200 pasos), de acuerdo con la Ecuación 6, se calculó un nivel de resolución de movimiento de 0,072 mm o 72  $\mu\text{m}$ . Esta precisión es adecuada para el estudio en microscopía básica y no para espectrometría de fuerza. Para contextualizar, las bacterias cuentan con un tamaño aproximado de entre 0,2 a 10  $\mu\text{m}$  (94), las células de levaduras miden entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , y las células de hongos suelen variar entre 2 a 10  $\mu\text{m}$  (94). Por otro lado, las células vegetales tienen un tamaño aproximado de entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  y las células animales de entre 10 a 30  $\mu\text{m}$  (95) (**Figura 4.22**)



**Figura 4.22. Ejemplos de imágenes capturas con el microscopio Loupe.** (A) Fragmento de un ala de mosquito observado con un objetivo 10x. (B) Corte transversal de una cucurbitácea, magnificado con un objetivo 10x, mostrando la epidermis y tejidos vasculares, incluyendo xilema y floema.

## 5. DISCUSIÓN

La motivación por desarrollar un instrumento innovador, accesible y reproducible en Chile abre la posibilidad para que los laboratorios académicos integren el estudio de la Biología Mecánica. Este MT, debía seguir el modelo de un microscopio invertido con la capacidad de aplicar campos magnéticos, como se aprecia en la **Figura 4.13**, junto con un sistema de microscopía motorizado para estudiar sistemas biológicos inmovilizados y analizar las fuerzas a escala de la fisiología celular. Las opciones consistían en adaptar un microscopio comercial que ya contara con un sistema óptico invertido para añadirle la capacidad aplicar campos magnéticos, o mejorar un diseño anterior realizado por el Grupo de Biología Mecánica. Por ejemplo, en el caso de la adaptación de microscopios comerciales, la ventaja radica en no tener que diseñar el sistema óptico desde cero; sin embargo, las limitaciones incluyen la incapacidad de mejorar o corregir ciertas deficiencias del diseño que interfieran en la medición (96). Estas limitaciones incluyen problemas mecánicos como la deriva, el reemplazo de lentes y filtros, y la interferencia de piezas al añadir un sistema capaz de aplicar campos magnéticos. Por estas razones, se decidió mejorar un diseño anterior, aprovechando la versatilidad de poder adaptar y complejizar un MT ya desarrollado (1,68,96,97), en lugar de adaptar uno comercial.

El diseño completo del microscopio se realizó utilizando el software Fusion 360, lo que facilitó el proceso de modelado y diseño al permitir la visualización y ajuste de cada componente en un entorno tridimensional. Aprovechando la renderización en la nube para previsualizar la interacción de todos los componentes, tanto las piezas personalizadas como los componentes adquiridos, resultando en un microscopio con una estructura robusta y altamente funcional, como se aprecia en la **Figura 4.2** y **Figura 4.13**. Varios componentes estructurales y de soporte se fabricaron mediante impresión 3D utilizando filamentos de ácido poliláctico (PLA+), material conocido por ser utilizado en diversas aplicaciones industriales (98,99) y en el campo de la biomedicina (100–102), debido a sus propiedades de flexibilidad, resistencia, biocompatibilidad y biodegradación. La tecnología de la impresión 3D está en auge, y gracias a los avances tecnológicos, ha sido más accesible adquirir impresoras 3D capaces de producir piezas de alto rendimiento y calidad. Llegando a ser una tecnología presente en diversas áreas, desde aplicaciones industriales hasta ciencias biológicas, como en aplicaciones médicas creando prótesis y el en el desarrollo de componentes biológicos tridimensionales (103,104). En nuestro caso, aprovechamos el uso de un bioplástico de bajo costo para desarrollar componentes económicos y versátiles que se adaptaran al diseño del MT (**Tabla 1**).

Los resultados de las piezas diseñadas e impresas en 3D fueron de alta calidad y rendimiento, lo que permitió desarrollar componentes para microscopía a bajo costo. El diseño y modelado en Fusion 360 fue vital para crear elementos que interactuaran adecuadamente con los componentes comprados. Para ello, se calculó un error asociado de  $\sim 0,15$  mm a  $\sim 0,3$  mm en el tamaño de las piezas impresas en 3D, lo que, junto con la adaptación de los parámetros de impresión, permitió obtener piezas con un acabado más que aceptable (**Figura 4.7**). Este resultado también estuvo influenciado por el nivel de resolución de la impresora utilizada y factores ambientales como la temperatura y humedad de la habitación destinada para la impresión. Debido a los buenos resultados de la impresión 3D, no fue necesario reemplazar estos componentes por alternativas comerciales, destacando que de igual manera se podría mejorar aún más las piezas probando otras configuraciones de impresión u otro tipo de filamentos.

Como se mencionó anteriormente, en el extremo superior del MT se ubica el sistema encargado de generar los campos magnéticos, ya que el diseño se basó en un microscopio invertido, en el cual la fuente de luz y el objetivo se ubicaron debajo de la muestra, como se aprecia en la **Figura 4.2.1** del

diseño planteado en Fusion 360. Lo que permitió una correcta ubicación de los elementos involucrados en el sistema optomecánico de manera correcta durante el ensamblado, lo que facilitó la colimación y transmisión de la luz a través del sistema, optimizando la imagen y la eficiencia del microscopio, como se observa en la sección del Ensamblado del Microscopio Invertido, **Figura 4.9** y **Figura 4.10**. Si bien este recorrido de la luz no es único diseño posible para el MT, dado que algunos microscopios de Pinzas Magnéticas cuentan con un diseño horizontal (105,106), donde la fuente de luz proviene de la parte superior y los magnetos está ubicados en el costado, implementar un diseño de este tipo habría requerido de la adquisición de más lentes, monturas y otros elementos, lo que incrementaría el costo del desarrollo.

El enfoque de la muestra en el microscopio MT está relacionado con el ajuste de los movimientos en el eje Z de varios componentes ópticos y estructurales, como se aprecia en la **Figura 4.11**. El componente más relevante en este contexto es el piezoeléctrico, que ofrece una resolución de 0,2 nm. Comparado con el sistema de ajuste manual, el actuador lineal manual SM1ZA, que proporciona un control de precisión de 1  $\mu\text{m}$ , la diferencia en resolución es notable, alcanzando una mejora cien mil veces mayor por parte del componente electrónico. Sin embargo, el ajuste inicial de enfoque depende del desplazamiento manual de la platina a través de las ranuras de la torre guía, lo cual es realizado según la percepción del operador, introduciendo un margen de error considerable.

Asimismo, es posible comparar el movimiento de las tres alternativas de platinas. La platina Original cuenta con un sistema comercial con un nivel de resolución de 0,5  $\mu\text{m}$  y un recorrido de hasta 3 mm. En contraste, la platina Manual 3D fue diseñada para poder explorar un trayecto de hasta 22 mm en la cámara de fluidos, alcanzado un nivel de resolución que varía según el pulso del operador, con un rango oscila entre  $\sim 0,78$  mm a  $\sim 7,8$  mm, lo que la convierte en el sistema XY más propenso a errores. Pese a ser la alternativa más accesible (menos de cinco mil pesos chilenos), como se detalla en la **Tabla 1**, su resolución puede mejorarse ajustado los parámetros de impresión 3D; otra alternativa es realizarla con impresión 3D de resina, o replantear el sistema de engranajes. Por otro lado, la platina Motorizado logra una resolución de  $\sim 39$   $\mu\text{m}$ , una cifra que podría mejorarse al ajustar los parámetros de impresión 3D y optimizar el código de programación que controla los motores. Esto permitirá obtener una configuración que suavice aún más los movimientos del joystick. Además, se ha demostrado que es factible desarrollar un sistema de control de movimientos XY de bajo costo (menos de sesenta mil pesos chilenos) con un nivel de resolución de movimientos motorizado que puede ser perfeccionado para un sistema automatizado en el futuro.

Así mismo, el sistema de engranajes del microscopio Loupe, diseñado como una prueba de conceptos del sistema de platina Motorizado, es adecuado para estudios en microscopía básica. Esto se debe a que la espectrometría de fuerza estudia las fuerzas mecánicas a nivel biológico en biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, que tienen dimensiones en la escala de nanómetros (95,107). El sistema de engranajes de Loupe, con una resolución de movimiento de 72  $\mu\text{m}$ , es útil para observar muestras de bacterias, levaduras, hongos y células vegetales o animales, ya que se encuentran en el orden de los micrómetros (94,95). No obstante, este sistema podría perfeccionarse al añadir un engranaje extra, que permita un control más preciso en el sistema macrométrico, pero en específico del micrométrico.

Respecto a la fabricación de las cámaras de fluidos para experimentación en las Pinzas Magnéticas, el pre y postratamiento adecuado, junto con el correcto ensamblado, son esenciales para asegurar resultados experimentales óptimos. Para ello, se estandarizó la metodología de fabricación de cámaras de fluidos (*Revisar Anexo, Glass Coverslips Preparation for Magnetic Tweezers*). Ya que el MT no

interactúa directamente con la muestra, las cámaras de fluidos proporcionan una interfaz líquida que permite mantener una hidratación constante de la muestra. El diseño de las cámaras facilita el rellenar del dispositivo sin perturbar en gran medida la experimentación, al mismo tiempo que protege la muestra de daños causados por factores ambientales. Sin embargo, el sistema de hidratación podría mejorarse para minimizar cualquier perturbación durante la medición (91). En el caso de la experimentación con proteínas, la solución tampón utilizada en la cámara previene la desnaturalización de estas, permitiendo ensayar por horas, días y e incluso semanas con una misma cámara, siempre que se trate adecuadamente. No obstante, el nivel de compromiso y cuidado durante la manufacturación de las cámaras es demasiado laborioso y delicado. E la contaminación es crucial para no desperdiciar materiales y para no dañar las cámaras. Una solución a este desafío podría ser la utilización de nanopartículas en uno de los pasos de la preparación, lo que podría prolongar la vida útil de las cámaras al mantenerlas en un estado esterilizado por más tiempo (108).

Los ensayos de estabilidad realizados para evaluar la deriva de los tres sistemas de platinas Original, Manual 3D y Motorizado, revelaron que la platina Original mostró una mayor estabilidad en experimentos los experimentos consecutivos de 600 segundos. Esto se evidencia en el cálculo de la distribución normal, donde la platina Original presentó un promedio de promedio de -0,230 nm y -0,141 nm, y una mediana de 0,354 y 0,532 para la señal suavizada y bruta, respectivamente. Estos valores, al permanecer cerca de cero, sugieren una estabilidad relativa. Sin embargo, la variación observada entre los experimentos, como se muestra en la **Tabla 4**, indica que el sistema no es tan estable como se podría haber asumido inicialmente. En contraste, la platina Manual 3D presentó un promedio de 1,48 y 1,562, con una mediana de 2,523 y 2,223 para la señal suavizada y bruta, respectivamente. Estos resultados evidencian una deriva considerable, ya que los valores se alejan significativamente de cero, reflejando inestabilidad mecánica. Por su parte, la platina Motorizado mostró la mayor deriva entre los tres sistemas, con un promedio de -3,817 y -3,487 y una mediana de -4,683 y -4,721, para la señal suavizada y bruta, respectivamente. Esto confirma que, a pesar de la funcionalidad del instrumento, los resultados obtenidos de los ensayos de estabilidad consecutivos de 10 minutos (600 segundos) se ven significativamente afectados por la deriva mecánica. Es probable esta deriva tenga su origen en los componentes funcionales del instrumento como en el diseño y los elementos que componen las platinas. Asimismo, factores externos podrían contribuir al ruido observado. Por lo tanto, es fundamental realizar un estudio más exhaustivo para identificar las fuentes de ruido o deriva de base provenientes del espectrómetro y evaluar posibles mejoras. Estás podrían incluir el diseño de un modelo alternativo de platina, así como optimizar el entorno experimental, por ejemplo, posicionando el instrumento en una mesa antivibración de aire pasivo.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales ventajas del sistema de pinzas magnéticas (MT) por sobre el microscopio de fuerza atómica (AFM) y las pinzas ópticas (OT) es la posibilidad de experimentar por periodos prolongados con una misma biomolécula sin dañarla. Esto es posible porque el MT no interactúa directamente con la muestra, permitiendo experimentar con una misma molécula. Sin embargo, los ensayos de estabilidad realizados durante una hora (3600 segundos) mostraron diferencias notables en los valores de la posición del centro de las curvas ( $x_0$ ) en los análisis de distribución normal, al inicio y a los 2500 segundos, como se detalla en la **Tabla 5**. Esto sugiere que los tres sistemas de platinas experimentaron una deriva irregular, atribuible tanto al diseño y componentes de las mismas platinas como a factores externos, tales como fluctuaciones de temperatura, vibraciones del edificio, entre otros. Dado que el promedio no es el parámetro estadístico más adecuada para datos con distribuciones asimétricas, se utilizó la mediana, que refleja de manera más fiel los valores sesgados asociados a la deriva. La incidencia de la deriva mecánica, entendida como un desplazamiento sistemático no deseado que idealmente debiese ser cercano a cero, fue significativa. Además, el

incremento en el número de componentes de las platinas influyó negativamente en la estabilidad experimental, ya que el aumento en los parámetros a controlar dificultó filtrar la deriva. La dispersión significativa entre los valores de los experimentos indica que los sistemas sufren desplazamientos importantes de un ensayo a otro. Sumado el efecto de la deriva en los resultados obtenidos de los ensayos de estabilidad consecutivos de diez minutos, esto se exacerbó en los ensayos de una hora, lo que hizo particularmente desafiante completar estos experimentos. No se logró reproducir los ensayos de una hora con éxito en su totalidad, obteniendo reproducciones vagas que no superaron los 1800 – 2400 segundos. Por lo tanto, no solo se debe considerar la deriva del sistema mismo, sino también la mejora de las condiciones ambientales. Esto incluye, controlar las fluctuaciones de temperatura mediante la incorporación de sensores y sistemas de control basados en Internet de las Cosas (IoT), que minimicen los componentes adicionales en el entorno del microscopio(109); También sería útil reducir el número de componentes de las platinas o diseñar un sistema motorizado que sea más simple (110,111), así como minimizar el ruido ambiental para obtener resultados más consistentes (12,24,112,113).

Entender las fuerzas involucradas en el plegamiento de las proteínas que conforman el pili de patógenos es fundamental para el desarrollo de alternativas al uso de antibióticos, ya que la resistencia a estos constituye una amenaza latente. Este fenómeno natural que se ha visto incrementado y acelerado por el uso indiscriminado de antibióticos, lo que genera cepas resistentes o multirresistentes. Como resultado, las enfermedades producidas por patógenos bacterianos se prolongan, los tratamientos se vuelven más complejos y costosos, y a menudo es necesario el uso combinado de fármacos (114–116). *S. pyogenes*, una de las bacterias Gram positivas más virulentas y de gran potencial patogénico. Aunque comúnmente se trata con antibióticos como betalactámicos, a los cuales no ha desarrollado resistencia (14,18), en ciertos casos es necesario combinar varios antibióticos para lograr un tratamiento efectivo.

Los estudios sobre la adhesión bacteriana se realizaron utilizando la proteína Spy0128 como modelo sencillo para experimentación. Esta proteína, que forma parte del pili de *Streptococcus pyogenes*, fue expresada en el laboratorio de Genómica Microbiana por el Grupo de Biología Mecánica en la cepa BL21 pLysS de *Escherichia coli*. Esta proteína recombinante cuenta en su secuencia con ciertos dominios de interés para ensayos de despliegue (unfolding), entre ellos tres dominios I27, que son estables y elásticos, similares a inmunoglobulinas, dispuestos entre segmentos repetidos de Spy0128, como se aprecia en la **Figura 4.17 y 4.17.1**. Además, la proteína cuenta con una secuencia Halo-Tag que facilita su anclaje a la superficie del cubreobjetos, y una secuencia Avi-Tag que permite su unión en el extremo opuesto a una microesfera paramagnética. Los eventos de despliegue asociados a los dominios I27 se identificaron al observar incrementos de ~25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm) en las mediciones (19,91–93). En los ensayos mecánicos realizados con sistemas biológicos inmovilizados, las fuerzas registradas oscilaron entre ~35 pN y ~106,6 pN. En este rango de fuerzas, se esperaba el despliegue de los tres dominios I27, identificados por los incrementos de ~25 nm (rango de  $\geq 20$  nm a  $\leq 30$  nm) en las mediciones a fuerzas menores a 200 pN (19,91–93). Esto es coherente con la naturaleza inextensible de la proteína Spy0128, que resiste fuerzas de hasta ~800 pN sin desplegarse (19).

Modificar Spy0128, que naturalmente es inextensible tiene varias implicancias importantes para el estudio de la adhesión bacteriana. Añadir dominios I27 permite incorporar propiedades elásticas y obtener una resistencia controlada por la capacidad de estos dominios de volver a su forma plegada luego de soportar fuerzas mecánicas al desplegarse. Esta elasticidad añadida además permite modelar y comprender cómo los pili de las bacterias responden a fuerzas mecánicas durante la adhesión, pues las proteínas de los pili, como Spy0128, están sometidas a fuerzas mecánicas generadas por los fluidos y los movimientos de las células del huésped. Al simular tensiones mecánicas en adhesión podemos comprender cómo la proteína recombinante podría resistir o redistribuir esas fuerzas, además, este comportamiento elástico adquirido permite analizar cómo una proteína puede soportar tensiones mecánicas repetitivas sin perder su capacidad adhesiva. Experimentalmente, el uso de dominios I27 en un constructo proteico de Spy0128 permite estudiar la fuerza necesaria para romper dicha adhesión, además, se puede contrastar la estabilidad mecánica frente a fuerzas al comparar Spy0128 recombinante con Spy0128 nativa. Pese a que Spy0128 es inextensible, el uso de estos dominios elásticos proporciona un modelo para estudiar si la adhesión depende únicamente de fuerzas estáticas o si pudiera estar influenciada por dinámicas mecánicas de tensión y relajación.

## 6. CONCLUSIONES

1. En este proyecto de tesis se desarrolló un sistema motorizado para microscopia de fuerza, para el estudio de la adhesión bacteriana, con especial énfasis en la comprensión de las propiedades mecánicas de proteínas elásticas, mediante la adaptación de un instrumento basado en Pinzas Magnéticas (MT). El sistema motorizado implementado, denominado Platina Motorizado, fue comparado con dos sistemas manuales: la Platina Original, equipada con un sistema de movimientos XY comercial y la Platina Manual 3D, completamente realizada en impresión 3D para el movimiento y control de la posición de la muestra. El sistema motorizado demostró ser una herramienta útil e innovadora, permitiendo un control de movimientos con una resolución de  $\sim 39 \mu\text{m}$ , lo cual es notable considerando que las microesferas empleadas en los experimentos tienen un diámetro inferior a  $\sim 3 \mu\text{m}$ .
2. Si bien se realizaron ensayos a corto y largo plazo para evaluar la estabilidad de los tres sistemas de movimientos XY desarrollados —la Platina Original, la Platina Manual 3D y la Platina Motorizado—, los resultados mostraron diferencias notables en los valores de la posición del centro de las curvas ( $x_0$ ) en los análisis de distribución normal. Esto sugiere que los tres sistemas experimentaron una deriva irregular, posiblemente atribuible al diseño y componentes de las platinas, así como a factores externos como fluctuaciones de temperatura, vibraciones del edificio, entre otras. Por lo tanto, los ensayos con sistemas biológicos inmovilizados se realizaron reiteradas veces por periodos cortos, y los eventos de desplegamiento se observaron en menos de un minuto. A pesar de estas limitaciones, la experimentación como tal permitió la exploración por horas, lo que corroboró la hipótesis.
3. En cuanto al microscopio como instrumento, se logró ensamblar exitosamente un espectrómetro de fuerza basado en Pinzas Magnéticas, capaz de aplicar campos magnéticos controlados con alta precisión. La funcionalidad del sistema fue validada mediante la operación, permitiendo la realización de experimentos biológicos. El sistema fue probado utilizando microesferas paramagnéticas, las cuales se unieron a la proteína recombinante Spy0128 de *Streptococcus pyogenes*. Estos ensayos permitieron estudiar las propiedades mecánicas y elásticas de la proteína recombinante bajo la influencia de fuerzas magnéticas controladas, confirmando la capacidad del espectrómetro de fuerza para investigar las fuerzas a escala biológica. El montaje y su correcto funcionamiento proporcionan una herramienta robusta y versátil para la investigación de interacciones proteína-sustrato, así como para el análisis de las respuestas mecánicas de biomoléculas sometidas a diferentes rangos de fuerza, contribuyendo a estudios en biología molecular, biofísica y biotecnología.
4. La modificación de SPy0128, una proteína naturalmente inextensible, al incorporar dominios I27, representa una estrategia clave para el estudio de la adhesión bacteriana y las respuestas mecánicas de los pili. Esta integración permite dotar a la proteína de propiedades elásticas, permitiendo simular tensiones mecánicas y analizar cómo las proteínas bacterianas pueden resistir o redistribuir fuerzas repetitivas mientras mantienen su funcionalidad adhesiva. Además, los resultados obtenidos proporcionan información clave sobre cómo las proteínas que conforman los pili de las bacterias podrían evolucionar para resistir o aprovechar tensiones mecánicas, contribuyendo significativamente a nuestra comprensión de los mecanismos biomecánicos de la adhesión bacteriana y sus implicaciones biológicas.

5. Finalmente, se logró detectar y analizar con éxito microesferas durante la experimentación utilizando el sistema motorizado para microscopia controlado por microcontroladores de tipo Arduino. Este sistema fue comparado con los sistemas de platinas manuales y validado al realizar experimentos con sistemas biológicos inmovilizados, utilizando la proteína modificada Spy0128. Los resultados experimentales mostraron eventos de desplegamiento de los dominios elásticos I27 de la proteína, lo que no solo confirma el funcionamiento del sistema, sino también su utilidad como herramienta innovadora para estudios de microscopia. La implementación del sistema motorizado demostró ser una mejora significativa en términos de control y precisión, proporcionando una base para futuras investigaciones de factores biomecánicos involucrados en la adhesión bacteriana como para el desarrollo de nuevas mejoras en el microscopio.

## 7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

1. Resolver la deriva mecánica presente en el instrumento es vital para la obtención de resultados libres de ruido. Como se mencionó anteriormente, en los ensayos realizados para evaluar la estabilidad de los tres sistemas de movimiento XY, las platinas Original, Manual 3D y Motorizado, presentaron en los resultados una deriva considerable que afecta tanto el tiempo de experimentación como los resultados. Identificar claramente cuáles son los factores claves que inciden en la deriva es vital, posiblemente son los componentes que son parte del diseño de las platinas, sin embargo, también influyen factores externos como la temperatura y las vibraciones del edificio donde se encuentra ubicado el equipo. De esta manera, plantear un sistema de movimientos XY simplificado podría ayudar a disminuir la deriva, como por ejemplo un sistema controlado por un sistema Arduino inalámbrico, también añadir un termostato que utilice internet de las cosas (IoT) para censar y controlar la temperatura en el entorno inmediato del microscopio (109–111).
2. La implementación del sistema motorizado en el espectrómetro de fuerza basado en Pinzas Magnéticas ha abierto nuevas oportunidades de innovación dentro de las áreas de ciencias, tecnologías, ingenierías, artes y matemáticas (STEAM). Este sistema, controlado mediante microcontroladores de tipo Arduino, representa un avance crucial en la automatización de equipos de laboratorio, lo que permitirá optimizar tanto los procesos como la eficiencia en la experimentación. En el entorno académico, donde los estudios experimentales requieren una considerable inversión de tiempo y recursos, la automatización total o parcial de ciertas prácticas disminuirá la carga de trabajo y acelerará la obtención de resultados, mejorando la productividad sin comprometer la calidad de los datos (79). Los laboratorios académicos pueden beneficiarse enormemente de la creación de dispositivos asequibles y adaptados a sus necesidades específicas.
3. Durante el desarrollo del sistema motorizado inicialmente diseñado para el para el microscopio de Pinzas Magnéticas, se llevó a cabo una prueba de concepto que resultó en la creación de un microscopio destinado a la ciencia básica, utilizando el mismo innovador sistema motorizado controlado mediante microcontroladores de tipo Arduino para el control de los movimientos XY de la muestra. Este pequeño microscopio, denominado Loupe, tiene un impacto significativo en el ámbito científico, ya que ofrece oportunidades para la divulgación científica y la promoción de un instrumento patentable. Su diseño es simple, práctico y de bajo costo, y gran parte del instrumento ha sido desarrollado mediante impresión 3D, lo que no solo facilita su ensamblaje, sino que también optimiza su funcionamiento y versatilidad para plantear ajustes y mejoras. Este enfoque accesible plantea una herramienta científica en entornos educativos, pero también fomenta la curiosidad y el interés por la investigación científica en una audiencia más amplia.
4. Las oportunidades biotecnológicas de este proyecto de tesis se centran en la posibilidad de investigar, con precisión, las fuerzas involucradas en las interacciones biomoleculares a escala nanométrica, como las fuerzas mecánicas que intervienen en la adhesión bacteriana. En particular, el microscopio de Pinzas Magnéticas (MT) ofrece la capacidad de cuantificar las propiedades mecánicas y elásticas de proteínas, como las que componen los pili bacterianos, que juegan un papel fundamental en el anclaje de las bacterias a sustratos bióticos, como las células del huésped. La caracterización de estas fuerzas es clave para comprender los mecanismos que están involucrados en el establecimiento de infecciones, ya que el éxito de la adhesión bacteriana puede determinar si una bacteria patógena inicia un proceso infeccioso o no. Este conocimiento abre nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias dirigidas a interrumpir las interacciones

moleculares que facilitan la colonización bacteriana, actuando específicamente sobre los mecanismos de adhesión (1). De esta manera, se podrían diseñar estrategias de intervención molecular para prevenir la adherencia y el desarrollo de infecciones, con un impacto significativo en la creación de nuevas herramientas terapéuticas y de prevención en la lucha contra bacterias patógenas. Este enfoque podría incluso extenderse en el diseño de biomateriales antibacterianos y a la creación de fármacos más eficaces o distintos al uso de antibióticos.

## 8. REFERENCIAS

1. Rivas-Pardo JA, Badilla CL, Tapia-Rojo R, Alonso-Caballero Á, Fernández JM. Molecular strategy for blocking isopeptide bond formation in nascent pilin proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2018 Sep 11;115(37):9222–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30150415/>
2. Shanmugasundarasamy T, Karaiyagowder Govindarajan D, Kandaswamy K. A review on pilus assembly mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Cell Surf* [Internet]. 2022 Dec 1;8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35493982/>
3. Danne C, Dramsi S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol* [Internet]. 2012 Nov;163(9–10):645–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116627/>
4. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun Y V. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2015 Jul 2;3(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26350310/>
5. Epler Barbercheck CR, Bullitt E, Andersson M. Bacterial Adhesion Pili. *Subcell Biochem* [Internet]. 2018; 87:1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29464555/>
6. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* [Internet]. 2001;76(3):111–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/bih.76.3.111.118>
7. Kang HJ, Baker EN. Intramolecular isopeptide bonds: protein crosslinks built for stress? *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2011 Apr;36(4):229–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21055949/>
8. Chatterjee S, Basak AJ, Nair A V., Duraivelan K, Samanta D. Immunoglobulin-fold containing bacterial adhesins: molecular and structural perspectives in host tissue colonization and infection. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2021 Jan 1;368(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33355339/>
9. Patel S, Mathivanan N, Goyal A. Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017 Sep 1; 93:763–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28709130/>
10. Kemper L, Hensel A. *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2023 May 1;107(9):2725–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36941439/>
11. Hu X, Hu H, Melvin JA, Clancy KW, McCafferty DG, Yang W. Autocatalytic intramolecular isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili: a QM/MM simulation. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2011 Jan 26;133(3):478–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21142157/>
12. Popa I, Rivas-Pardo JA, Eckels EC, Echelman DJ, Badilla CL, Valle-Orero J, et al. A HaloTag Anchored Ruler for Week-Long Studies of Protein Dynamics. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2016 Aug 24;138(33):10546–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27409974/>
13. Facklam R. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2002 Oct;15(4):613–30. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.15.4.613-630.2002>
14. *Streptococcus pyogenes* – SOCHINF [Internet]. Available from: <https://sochinf.cl/streptococcus-pyogenes/>
15. Nakata M, Kreikemeyer B. Genetics, Structure, and Function of Group A Streptococcal Pili. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Feb 9;12. Available from: [/pmc/articles/PMC7900414/](https://pmc/articles/PMC7900414/)
16. Lineamientos Técnicos de Manejo Clínico de Enfermedad Invasora por *Streptococcus*

- pyogenes.
17. The Current Evidence for the Burden of Group A Streptococcal Diseases Department of Child and Adolescent Health and Development World Health Organization. 2005;
  18. Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. 2019.
  19. Wang B, Xiao S, Edwards SA, Gräter F. Isopeptide Bonds Mechanically Stabilize Spy0128 in Bacterial Pili. *Biophys J* [Internet]. 2013 May 5;104(9):2051. Available from: [/pmc/articles/PMC3647160/](#)
  20. Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE. Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science* [Internet]. 1997 Feb 28;275(5304):1295–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9036852/>
  21. Strunz T, Oroszlan K, Schäfer R, Güntherodt HJ. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Sep 28;96(20):11277–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10500167/>
  22. Yang B, Liu Z, Liu H, Nash MA. Next Generation Methods for Single-Molecule Force Spectroscopy on Polyproteins and Receptor-Ligand Complexes. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 May 19;7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32509800/>
  23. Bustamante C, Yan S. The development of single molecule force spectroscopy: from polymer biophysics to molecular machines. *Q Rev Biophys* [Internet]. 2022 Aug 2;55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35916314/>
  24. Yu Z, Dulin D, Cnossen J, Köber M, Van Oene MM, Ordu O, et al. A force calibration standard for magnetic tweezers. *Rev Sci Instrum* [Internet]. 2014 Dec 1;85(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25554279/>
  25. Nicodemi M, Gamba A, Stasiak A, Cajal Neuman K, Rybenkov V V, Sarkar R. Article 48 Citation: Sarkar R and Rybenkov VV (2016) A Guide to Magnetic Tweezers and Their Applications. *Front Phys* [Internet]. 2016; 4:48. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  26. Main KHS, Provan JI, Haynes PJ, Wells G, Hartley JA, Pyne ALB. Atomic force microscopy—A tool for structural and translational DNA research. *APL Bioeng* [Internet]. 2021 Sep 1;5(3):31504. Available from: [/pmc/articles/PMC8272649/](#)
  27. Svoboda K, Block SM. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* [Internet]. 1994 Jun 3;77(5):773–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8205624/>
  28. Block SM, Goldstein LSB, Schnapp BJ. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* [Internet]. 1990 ;348(6299):348–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2174512/>
  29. Guo B, Guilford WH. Mechanics of actomyosin bonds in different nucleotide states are tuned to muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Jun 6 ;103(26):9844. Available from: [/pmc/articles/PMC1502541/](#)
  30. Rivas-Pardo JA, Eckels EC, Popa I, Kosuri P, Linke WA, Fernández JM. Work done by titin protein folding assists muscle contraction. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Feb 2;14(6):1339. Available from: [/pmc/articles/PMC4865255/](#)
  31. Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* [Internet]. 2008 Jun;5(6):491–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18511917/>
  32. Choi HK, Kim HG, Shon MJ, Yoon TY. High-Resolution Single-Molecule Magnetic Tweezers. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2022; 91:33–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35287472/>
  33. Kim K, Saleh OA. A high-resolution magnetic tweezer for single-molecule measurements. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 Sep 3;37(20): e136. Available from:

- /pmc/articles/PMC2777445/
34. Brockwell DJ, Beddard GS, Paci E, West DK, Olmsted PD, Smith DA, et al. Mechanically Unfolding the Small, Topologically Simple Protein L. *Biophys J* [Internet]. 2005;89(1):506. Available from: /pmc/articles/PMC1366550/
  35. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* [Internet]. 1986;56(9):930–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10033323/>
  36. Sinha Ray S. Structure and Morphology Characterization Techniques. *Clay-Containing Polymer Nanocomposites*. 2013 Jan 1;39–66.
  37. Williams MC, Rouzina I. Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2002 Jun 1;12(3):330–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12127451/>
  38. Cheirdaris DG. Force Spectroscopy in Mechanical Protein Domains Unfolding. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2021; 1339:187–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35023106/>
  39. Seo Y, Jhe W. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics* [Internet]. 2007 Dec 17;71(1):016101. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/71/1/016101>
  40. Parot P, Dufrêne YF, Hinterdorfer P, Le Grimellec C, Navajas D, Pellequer JL, et al. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J Mol Recognit* [Internet]. 2007 Nov;20(6):418–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18080995/>
  41. Nathwani B, Shih WM, Wong WP. Force Spectroscopy and Beyond: Innovations and Opportunities. *Biophys J* [Internet]. 2018 Dec 18;115(12):2279–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30447991/>
  42. Withers JR, Aston DE. Nanomechanical measurements with AFM in the elastic limit. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006 Jun 30;120(1–3):57–67.
  43. Santos S, Lai CY, Olukan T, Chiesa M. Multifrequency AFM: from origins to convergence. *Nanoscale* [Internet]. 2017 Apr 28;9(16):5038–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28394393/>
  44. Wijesinghe WCB, Min D. Single-Molecule Force Spectroscopy of Membrane Protein Folding. *J Mol Biol* [Internet]. 2023 Jun 1;435(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37330286/>
  45. Carvalho FA, Martins IC, Santos NC. Atomic force microscopy and force spectroscopy on the assessment of protein folding and functionality. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013;531(1–2):116–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23228596/>
  46. Mou J, Czajkowsky DM, Zhang Y, Shao Z. High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. *FEBS Lett* [Internet]. 1995 Sep 11;371(3):279–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7556610/>
  47. Xiao P, Gu J, Chen J, Zhang J, Xing R, Han Y, et al. Micro-contact printing of graphene oxide nanosheets for fabricating patterned polymer brushes. *Chem Commun (Camb)* [Internet]. 2014 Jun 10;50(54):7103–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24836977/>
  48. Ashkin A, Dziedzic JM. Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria. *Science* (1979) [Internet]. 1987;235(4795):1517–20. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3547653>
  49. Favre-Bulle IA, Scott EK. Optical tweezers across scales in cell biology. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2022 Nov 1;32(11):932–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35672197/>
  50. Zhang X, Ma L, Zhang Y. High-Resolution Optical Tweezers for Single-Molecule Manipulation. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2013 Sep;86(3):367. Available from: /pmc/articles/PMC3767221/

51. Ghislain LP, Switz NA, Webb WW. Measurement of small forces using an optical trap. *Review of Scientific Instruments* [Internet]. 1994 Sep 1;65(9):2762–8. Available from: [/aip/rsi/article/65/9/2762/440655/Measurement-of-small-forces-using-an-optical](https://pubs.aip.org/article/65/9/2762/440655/Measurement-of-small-forces-using-an-optical)
52. Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett* [Internet]. 1986 Apr 19;11(5):196–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19730608/>
53. Bustamante CJ, Chemla YR, Liu S, Wang MD. Optical tweezers in single-molecule biophysics. *Nature reviews Methods primers* [Internet]. 2021 Dec 1;1(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34849486/>
54. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.
55. Ashkin A, Dziedzic JM. Radiation Pressure on a Free Liquid Surface. 30.
56. Wright WH, Sonek GJ, Berns MW. Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. *Appl Opt* [Internet]. 1994 Mar 20;33(9):1735. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20885501/>
57. Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* [Internet]. 1994;368(6467):113–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8139653/>
58. Block SM, Goldstein LSB, Schnapp BJ. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* [Internet]. 1990;348(6299):348–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2174512/>
59. Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL, Bustamante C. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* [Internet]. 2001 Oct 18;413(6857):748–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11607035/>
60. Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, Bensimon A, Croquette V. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* [Internet]. 1996 Mar 29;271(5257):1835–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8596951/>
61. Shevkoplyas SS, Siegel AC, Westervelt RM, Prentiss MG, Whitesides GM. The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field. *Lab Chip* [Internet]. 2007 Sep 26;7(10):1294–302. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/lc/b705045c>
62. Pulido CC, Moreno-Herrero F. Magnetic Tweezers. *Encyclopedia of Life Sciences* [Internet]. 2011 Apr 15; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9780470015902.a0023173>
63. Manosas M, Meglio A, Spiering MM, Ding F, Benkovic SJ, Barre FX, et al. MAGNETIC TWEEZERS FOR THE STUDY OF DNA TRACKING MOTORS. *Methods Enzymol* [Internet]. 2010;475(C):297. Available from: [/pmc/articles/PMC3205452/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20885501/)
64. Shevkoplyas SS, Siegel AC, Westervelt RM, Prentiss MG, Whitesides GM. The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field. *Lab Chip* [Internet]. 2007;7(10):1294–302. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/5948667\\_The\\_force\\_acting\\_on\\_a\\_superparamagnetic\\_bead\\_due\\_to\\_an\\_applied\\_magnetic\\_field](https://www.researchgate.net/publication/5948667_The_force_acting_on_a_superparamagnetic_bead_due_to_an_applied_magnetic_field)
65. Zhou Z, Leake MC. Force Spectroscopy in Studying Infection. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016; 915:307–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27193551/>
66. Kollmannsberger P, Fabry B. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *Rev Sci Instrum* [Internet]. 2007;78(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18052492/>
67. Dulin D. An Introduction to Magnetic Tweezers. *Methods in Molecular Biology* [Internet].

- 2024; 2694:375–401. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3377-9\\_18](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3377-9_18)
68. Gaire S, Fabian R, Pegg I, Sarkar A. Magnetic tweezers: development and use in single-molecule research. *Biotechniques* [Internet]. 2022;72(2):65–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35037472/>
  69. Zacchia NA, Valentine MT. Design and optimization of arrays of neodymium iron boron-based magnets for magnetic tweezers applications. *Rev Sci Instrum* [Internet]. 2015 May 1;86(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026529/>
  70. Estreptavidina Dynabeads™ M-270 [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65306?SID=srch-srp-65306>
  71. Estreptavidina Dynabeads™ M-280 [Internet].. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11206D?SID=srch-srp-11206D>
  72. Bustamante C, Bustamante C, Alexander L, Macluba K, Kaiser CM. Single-Molecule Studies of Protein Folding with Optical Tweezers. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2020 Jun 6; 89:443. Available from: </pmc/articles/PMC7487275/>
  73. ¿Qué es Arduino? | Arduino.cl - Compra tu Arduino en Línea [Internet]. Available from: <https://arduino.cl/que-es-arduino/>
  74. Software | Arduino [Internet]. Available from: <https://www.arduino.cc/en/software>
  75. Getting Started with Arduino IDE 2 | Arduino Documentation [Internet]. Available from: <https://docs.arduino.cc/software/ide-v2/tutorials/getting-started-ide-v2/>
  76. Arduino / C++ | Arduino Documentation [Internet]. Available from: <https://docs.arduino.cc/arduino-cloud/guides/arduino-c/>
  77. UNO R3 | Arduino Documentation [Internet]. Available from: <https://docs.arduino.cc/hardware/uno-rev3/>
  78. Arduino Education at Bett 2024: Inspiring STEAM innovation | Arduino Blog [Internet].. Available from: [https://blog.arduino.cc/2024/01/15/arduino-education-at-bett-2024-inspiring-steam-innovation/?queryID=undefined&\\_gl=1\\*1mm1kdk\\*\\_gcl\\_au\\*MTI2NDE1NTg4Mi4xNzlwMjMzNjA4\\*FPAU\\*MTI2NDE1NTg4Mi4xNzlwMjMzNjA4\\*\\_ga\\*MTIwODk2NjEyLjE3MjAyMzM1NTE.\\*\\_ga\\_NEXN8H46L5\\*MTcyMDIzMzU0OS4xLjEuMTcyMDIzNDIxMy4wLjAuMjA2ODU3ODIyMw..\\*\\_fplc\\*dCUyRjdUQXk0UjRUVk5sanY4Zlc4ellwQU5LeEVvSHN1JTJCZIRUQXVzM1VZVTkyMzIqMmgzV Gg2elZ3MGVpRjFFa3d1MyUyRndFSW1WdHdFdXpTZ2ZjJdXhOMWw5sCVZJR0gIMkY0JTJGZHQzQ 3FjTkrMb0YySmtFVvxWaE1xR1d5d1NiMnc5dyUzRCUzRA..](https://blog.arduino.cc/2024/01/15/arduino-education-at-bett-2024-inspiring-steam-innovation/?queryID=undefined&_gl=1*1mm1kdk*_gcl_au*MTI2NDE1NTg4Mi4xNzlwMjMzNjA4*FPAU*MTI2NDE1NTg4Mi4xNzlwMjMzNjA4*_ga*MTIwODk2NjEyLjE3MjAyMzM1NTE.*_ga_NEXN8H46L5*MTcyMDIzMzU0OS4xLjEuMTcyMDIzNDIxMy4wLjAuMjA2ODU3ODIyMw..*_fplc*dCUyRjdUQXk0UjRUVk5sanY4Zlc4ellwQU5LeEVvSHN1JTJCZIRUQXVzM1VZVTkyMzIqMmgzV Gg2elZ3MGVpRjFFa3d1MyUyRndFSW1WdHdFdXpTZ2ZjJdXhOMWw5sCVZJR0gIMkY0JTJGZHQzQ 3FjTkrMb0YySmtFVvxWaE1xR1d5d1NiMnc5dyUzRCUzRA..)
  79. Holland I, Davies JA. Automation in the Life Science Research Laboratory. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Nov 13;8. Available from: </pmc/articles/PMC7691657/>
  80. Boules N. Design Optimization of Permanent Magnet DC Motors. *IEEE Trans Ind Appl*. 1990;26(4):786–92.
  81. Huang T, Mei J, Li Z, Zhao X, Chetwynd DG. A Method for Estimating Servomotor Parameters of a Parallel Robot for Rapid Pick-and-Place Operations. *Journal of Mechanical Design* [Internet]. 2005 Jul 1;127(4):596–601. Available from: <https://dx.doi.org/10.1115/1.1898343>
  82. *Stepper Motors: Fundamentals, Applications And Design* - V. V. Athani - Google Books [Internet]. Available from: [https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=0m8NTozFZL8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Stepper+motors&ots=MG9VMewIC6&sig=2YG28cgg18MvuClkvNzdcDAXbbo&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Stepper%20motors&f=false](https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=0m8NTozFZL8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Stepper+motors&ots=MG9VMewIC6&sig=2YG28cgg18MvuClkvNzdcDAXbbo&redir_esc=y#v=onepage&q=Stepper%20motors&f=false)
  83. Campbell RAA, Eifert RW, Turner GC. Openstage: A Low-Cost Motorized Microscope Stage with Sub-Micron Positioning Accuracy. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 26;9(2). Available from: </pmc/articles/PMC3935852/>

84. McLoughlin J, Mitchell A. Mechanisms of sewing machines. *Joining Textiles: Principles and Applications*. 2013 Jan 1;123–48.
85. Tomás Herмосilla. “Desarrollo de Pinzas Magnéticas de Alta Resolución Espacio-Temporal para la Identificación de Eventos Rápidos de Despliegamiento y Repliegamiento de Proteínas Elásticas.” 2022.
86. *Fundamentals of Machine Component Design*.
87. Budynas RG, Keith Nisbett J. *Diseño en ingeniería mecánica de Shigley*, 9na Edición.
88. Pasos para calcular la relación de transmisión de engranajes - Pasos para calcular la relación de - Studocu [Internet]. Available from: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-tecnologica-del-norte-de-guanajuato/mecanica-para-la-automatizacion/pasos-para-calcular-la-relacion-de-transmision-de-engranajes/7541699>
89. Pololu - A4988 Stepper Motor Driver Carrier [Internet]. Available from: <https://www.pololu.com/product/1182>
90. Eckels EC, Haldar S, Tapia-Rojo R, Rivas-Pardo JA, Fernández JM. The Mechanical Power of Titin Folding. *Cell Rep* [Internet]. 2019 May 7;27(6):1836-1847.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31067467/>
91. Park CY, Jacobson DR, Nguyen DT, Willardson S, Saleh OA. A thin permeable-membrane device for single-molecule manipulation. *Rev Sci Instrum* [Internet]. 2016 Jan 1;87(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827332/>
92. Nunes JM, Hensen U, Ge L, Lipinsky M, Helenius J, Grubmüller H, et al. A “force buffer” protecting immunoglobulin titin. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet]. 2010 May 3;49(20):3528–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20354971/>
93. Eckels EC, Haldar S, Tapia-Rojo R, Rivas-Pardo JA, Fernández JM. The Mechanical Power of Titin Folding. *Cell Rep* [Internet]. 2019 May 7;27(6):1836-1847.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31067467/>
94. Madigan M, Bender K, Buckley D, Sattley WM, Stahl D. *Brock Biology of Microorganisms 15th Edition* (2019). Beaparlant S, editor. Pearson. 2019;261–427.
95. [booksmedicosorg. Molecular Biology of the Cell. Alberts 6th Edition.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/4L8689/)
96. Timonen JVI, Grzybowski BA. Tweezing of Magnetic and Non-Magnetic Objects with Magnetic Fields. *Adv Mater* [Internet]. 2017 May 10;29(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28198579/>
97. Huhle A, Klau D, Brutzer H, Daldrop P, Joo S, Otto O, et al. Camera-based three-dimensional real-time particle tracking at kHz rates and Ångström accuracy. *Nature Communications* 2015 6:1 [Internet]. 2015 Jan 7;6(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms6885>
98. Varela-Aldás JL. Impresión 3D y COVID-19. *CienciAmérica* [Internet]. 2020 May 15;9(2):51–7. Available from: <https://www.cienciamerica.edu.ec/index.php/uti/article/view/292/440>
99. Shahrubudin N, Lee TC, Ramlan R. An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications. *Procedia Manuf*. 2019 Jan 1; 35:1286–96.
100. Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale D V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2019 Dec 1;127(6):1612–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31021482/>
101. Stefaniak K, Masek A. Green Copolymers Based on Poly (Lactic Acid)-Short Review. *Materials (Basel)* [Internet]. 2021 Sep 1;14(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576477/>
102. Murariu M, Dubois P. PLA composites: From production to properties. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016 Dec 15; 107:17–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27085468/>

103. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2016 Aug 1; 40:103–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27043763/>
104. Tian Y, Chen CX, Xu X, Wang J, Hou X, Li K, et al. A Review of 3D Printing in Dentistry: Technologies, Affecting Factors, and Applications. *Scanning* [Internet]. 2021;2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34367410/>
105. Fabian R, Gaire S, Tyson C, Adhikari R, Pegg I, Sarkar A. Horizontal Magnetic Tweezers for Studying Single DNA Molecules and DNA-Binding Proteins. *Molecules* [Internet]. 2021 Aug 2;26(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34443369/>
106. Geyer VF, Diez S. Horizontal Magnetic Tweezers to Directly Measure the Force-Velocity Relationship for Multiple Kinesin Motors. *Small* [Internet]. 2023 Jul 26;19(30). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37035988/>
107. Lodish, *Molecular Cell Biology*, 8th ed, 2016.
108. Wittenburg G, Lauer G, Oswald S, Labudde D, Franz CM. Nanoscale topographic changes on sterilized glass surfaces affect cell adhesion and spreading. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2014;102(8):2755–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24027204/>
109. Subahi AF, Bouazza KE. An Intelligent IoT-Based System Design for Controlling and Monitoring Greenhouse Temperature. *IEEE Access*. 2020; 8:125488–500.
110. Shukri NNAM, Ali AH. Development of Smart Controlled Precision Motorized Positioning System. *Enhanced Knowledge in Sciences and Technology* [Internet]. 2023 Aug 7;3(1):169–76. Available from: <https://penerbit.uthm.edu.my/periodicals/index.php/ekst/article/view/10708>
111. sanab syahmi, Ali AH. Design and Develop Wireless Control Motorized Stage using Blynk. *Enhanced Knowledge in Sciences and Technology* [Internet]. 2022 Nov 29; 2(2):302–8. Available from: <https://penerbit.uthm.edu.my/periodicals/index.php/ekst/article/view/5317>
112. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* - Google Books [Internet]. Available from: [https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=E2maxdEXFNoC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Handbook+of+Biological+Confocal+Microscopy%22+por+James+B.+Pawley&ots=blbdiEGjF2&sig=OIYw\\_Lj-ZQmMpipQxdZKKOo4wcs&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Handbook%20of%20Biological%20Confocal%20Microscopy%22%20por%20James%20B.%20Pawley&f=false](https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=E2maxdEXFNoC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Handbook+of+Biological+Confocal+Microscopy%22+por+James+B.+Pawley&ots=blbdiEGjF2&sig=OIYw_Lj-ZQmMpipQxdZKKOo4wcs&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook%20of%20Biological%20Confocal%20Microscopy%22%20por%20James%20B.%20Pawley&f=false)
113. Roysam B, Bhattacharjya AK, Srinivas C, Szarowski DH, Turner JN. Unsupervised noise removal algorithms for three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Micron and Microscopica Acta*. 1992 Jan 1;23(4):447–61.
114. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2017 Jul 1;10(4):369–78.
115. Hasan TH, Al-Harmoosh R, Al-Harmoosh RA. Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. *Systematic Review Pharmacy* [Internet].;11:2020. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/342467620>
116. Regea G. *Pharmacology & Clinical Research Review on Antibiotics Resistance and its Economic Impacts*. 2018; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/329338054>

## 9. ANEXO/MATERIAL SUPLEMENTARIO

El material suplementario que se presenta a continuación está disponible en un repositorio GitHub, el cual se puede acceder mediante en el siguiente enlace:

[https://github.com/Duchens01/Material\\_Suplementario\\_Tesis](https://github.com/Duchens01/Material_Suplementario_Tesis)

- *Planos de Componentes Varios*
- *Planos de las Platinas*
- *Componentes de Loupe*
- *Planos de Loupe*
- *Videos*
- *Glass Coverslips Preparation for Magnetic Tweezers*