



Universidad
Zaragoza



MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS PARA LA INVESTIGACIÓN EN VETERINARIA Y AGROALIMENTACIÓN



Universidad
Zaragoza



MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS PARA LA INVESTIGACIÓN EN VETERINARIA

1, Bases y fundamentos

2, Aplicaciones en investigación veterinaria

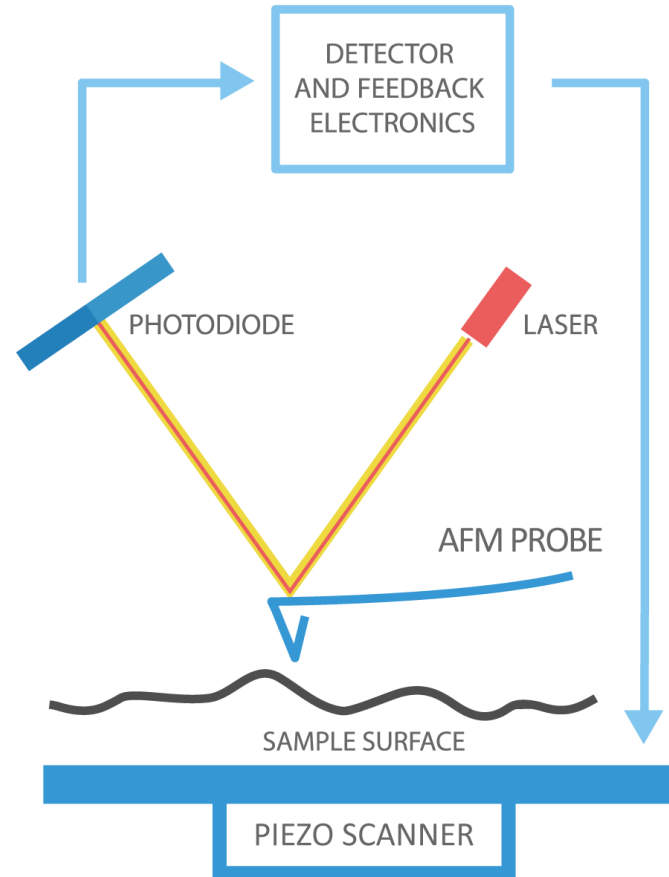
3, Ejemplos de aplicaciones

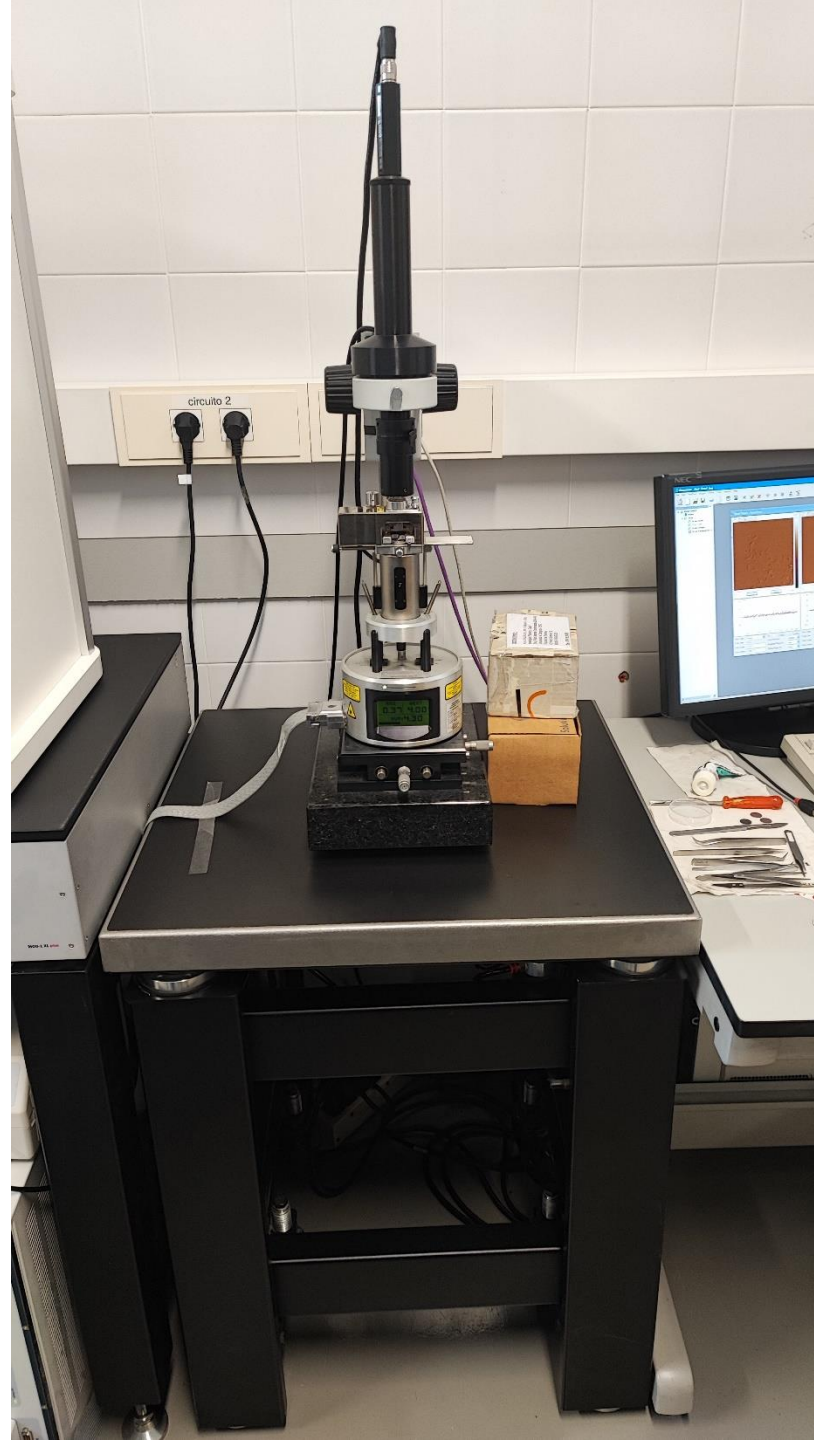
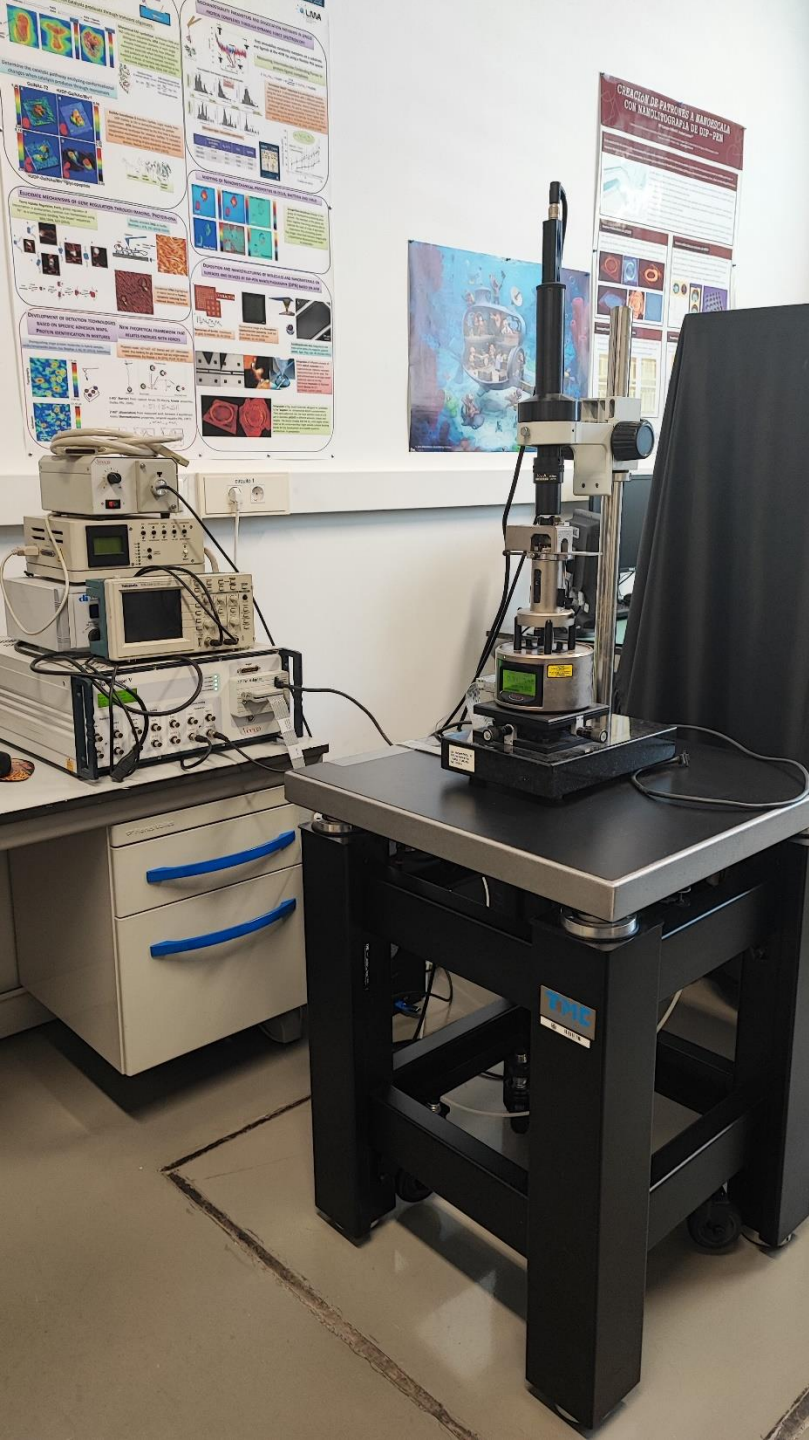
M^o CARMEN PALLARÉS MATUTE
Técnico de Microscopía de Fuerzas Atómicas del LMA

Laboratorio de Microscopías Avanzadas
Edificio I+D - Campus Río Ebro
C/ Mariano Esquillor s/n 50018 Zaragoza

<https://lma.unizar.es>
Tel.: +34 976 762 980
E-mail: lma@unizar.es

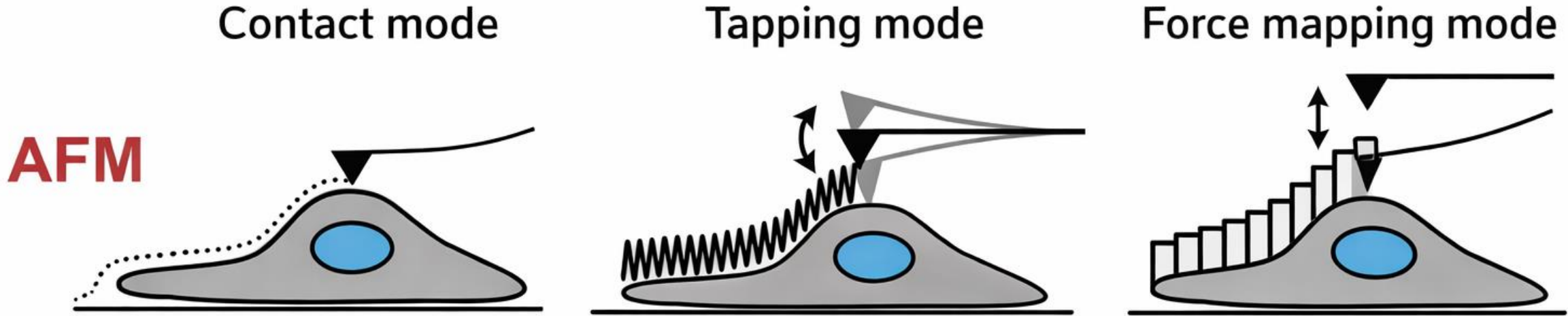
1, Bases y fundamentos del AFM





1, Bases y fundamentos del AFM

Modos de medida AFM



1, Bases y fundamentos del AFM

Ventajas

TOPOGRAFIA 3D

PROPIEDADES NANOMECÁNICAS

AIRE O LÍQUIDO

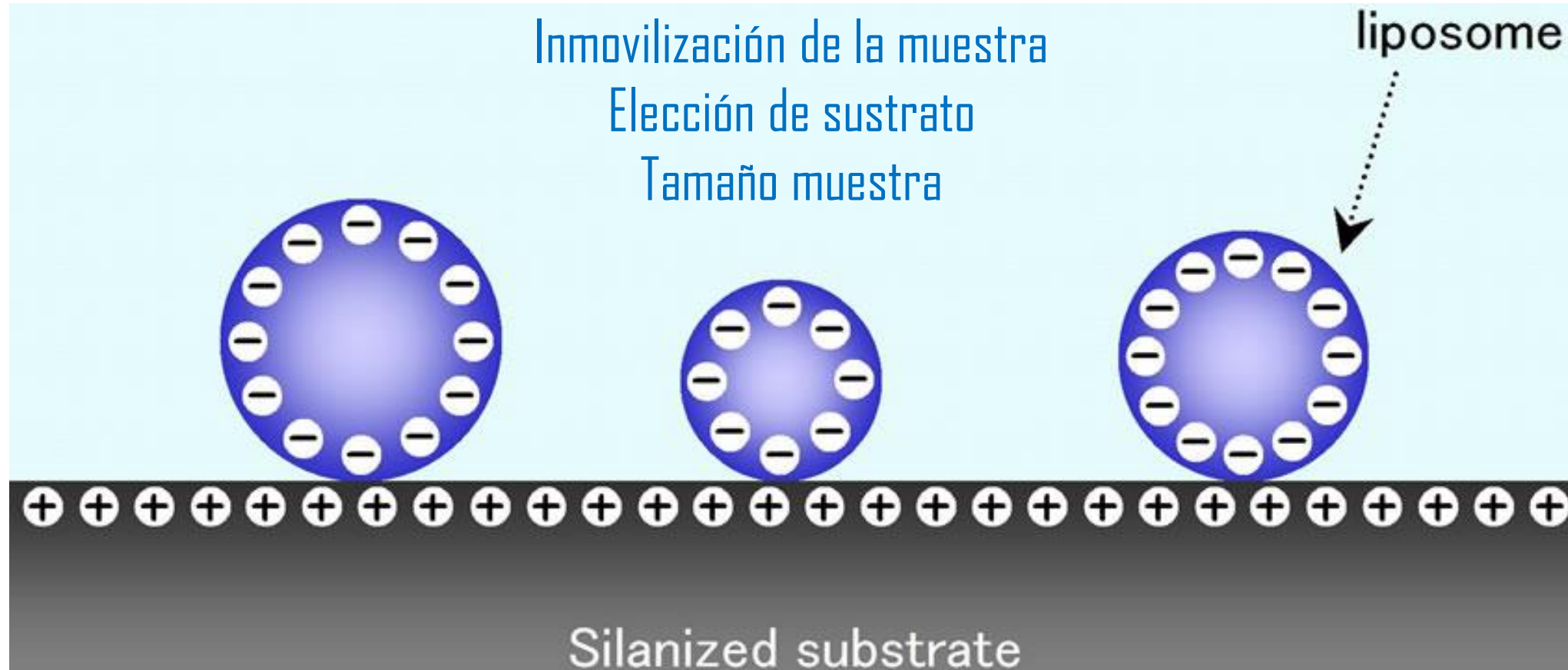
TEMPERATURA

ENTORNO FISIOLÓGICO

MANIPULACIÓN MÍNIMA

1, Bases y fundamentos del AFM

Desventajas





Physical Adsorption

Chemical Functionalization of Substrate

Covalent Immobilization

Drop Casting

Embedding in Soft Matrix

1, Bases y fundamentos del AFM

Inmovilización de proteínas

Método	Principio	Sustratos típicos	Estabilidad	Orientación	Ventajas clave	Limitaciones principales	Uso AFM típico
Adsorción física	Interacciones débiles (electrostáticas, hidrofóbicas, vdW)	Mica, HOPG, SiO ₂	Baja	Aleatoria	Simple, rápida, sin química	Desorción, posible desnaturalización	Imagen rápida en aire/líquido
Covalente (APTES, EDC/NHS, glutaraldehído)	Enlace covalente (-NH ₂ , -COOH, -SH)	SiO ₂ , mica modificada	Alta	Parcial/aleatoria	Alta estabilidad, reproducible	Puede alterar estructura, menos control de orientación	Force spectroscopy, estudios mecánicos
Linkers PEG	Espaciadores flexibles covalentes	SiO ₂ , oro, mica tratada	Alta	Parcial (mejor accesibilidad)	Reduce adsorción no específica, mejora movilidad controlada	Síntesis/funcionalización más compleja	Force spectroscopy de molécula única
Bioafinidad (biotina-estreptavidina)	Interacción específica de alta afinidad	Superficies funcionalizadas	Muy alta	Controlada	Orientación definida, muy estable	Requiere modificación previa de proteína	Estudios funcionales precisos
His-tag / Ni-NTA	Coordinación metal-histidina	Oro, SiO ₂ funcionalizado	Media-Alta	Parcial/controlada	Reversible, útil en proteínas recombinantes	Menor estabilidad que biotina	Ensayos dinámicos/reversibles
Antígeno-anticuerpo	Reconocimiento específico	Superficies biofuncionalizadas	Alta	Controlada (si bien diseñada)	Alta especificidad	Coste, preparación compleja	Biosensado, reconocimiento molecular

1, Bases y fundamentos del AFM

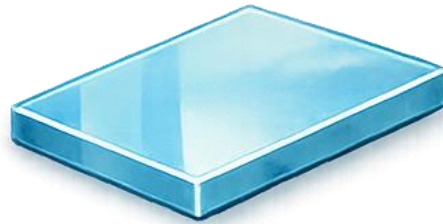
Elección del sustrato

Silicon / Silicon oxide
Glass
Mica
Gold

versatile, easy functionalization
general-purpose, cells
atomically flat, ideal for biomolecules
for thiol chemistry



Silicio



Vidrio



Mica



Oro

1, Bases y fundamentos del AFM

Sustratos para células

1. Glass Coverslips

Most widely used substrate
Easy to clean and functionalize
Compatible with optical + AFM correlative imaging
Often **coated** with:

Poly-L-lysine → enhances adhesion via electrostatics
Extracellular matrix (ECM) proteins (collagen, fibronectin)

Best for: Adherent cells (fibroblasts, epithelial cells)

2. Mica (Modified)

Atomically flat (excellent for AFM resolution)
Naturally not ideal for cells → requires coating

Coatings used: Poly-L-lysine
ECM proteins

Best for: High-resolution imaging of fixed cells or membranes

3. Silicon / Silicon Oxide Wafers

Very flat and rigid
Easy surface chemistry modification
Pros: Good for nanomechanics measurements
Compatible with microfabrication

Best for: Controlled experiments (patterned adhesion, stiffness studies)

4. Gold-Coated Substrates

Used when ****thiol chemistry**** is needed
Allows formation of self-assembled monolayers (SAMs)
Best for: Functionalized surfaces (e.g., ligand-specific binding)

5. Polymer-Coated Surfaces

Tunable stiffness (important for cell mechanics)
Examples: Polyacrylamide gels
PDMS (polydimethylsiloxane)

Best for: Studying how cells respond to substrate stiffness (mechanobiology)

6. ECM-Coated Surfaces (Extracellular matrix)

The biological coating is key:

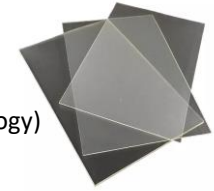
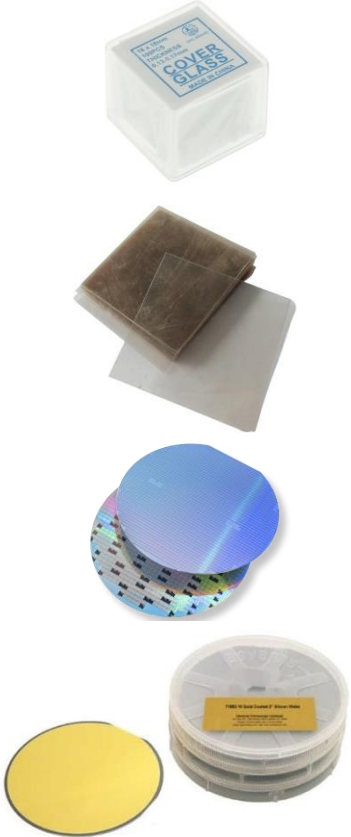
Collagen
Fibronectin
Laminin

These mimic natural cell environments and improve:

Adhesion
Spreading
Viability

7. Cell Culture Dishes (AFM-Compatible)

Special dishes with glass bottoms
Designed for liquid imaging
Best for: Live-cell AFM experiments





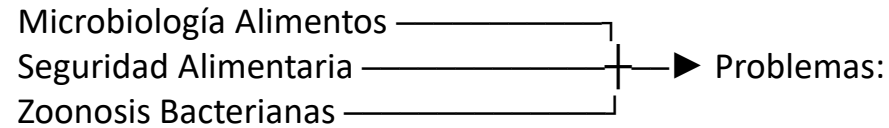
2, Aplicaciones en investigación veterinaria

1. ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS

2. RESOLUCIÓN NANOMÉTRICA SIN NECESIDAD DE TINCIÓN

3. MEDICIÓN DIRECTA DE PROPIEDADES MECÁNICAS

2, Aplicaciones en investigación veterinaria MICROBIOLOGÍA Y BIOFILMS



- Biofilms resistentes
- Adhesión bacteriana
- Superficies contaminadas
- Eficacia de desinfectantes
- Virulencia y adhesinas

Soluciones AFM:

- Topografía nanométrica
- Adhesión bacteria–superficie
- Elasticidad del biofilm (QNM)
- Daño estructural tras tratamientos
- Mapeo de proteínas de superficie

2, Aplicaciones en investigación veterinaria MICROBIOLOGÍA Y BIOFILMS

S.J. Yuan, S.O. Pehkonen 2009, AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by Pseudomonas NCIMB 2021 and Desulfovibrio desulfuricans in simulated seawater, Corrosion

El AFM permite visualizar y cuantificar a escala nanométrica la colonización microbiana y los cambios topográficos asociados, evidenciando cómo la formación de biofilms induce y acelera procesos localizados de corrosión en acero inoxidable 304.

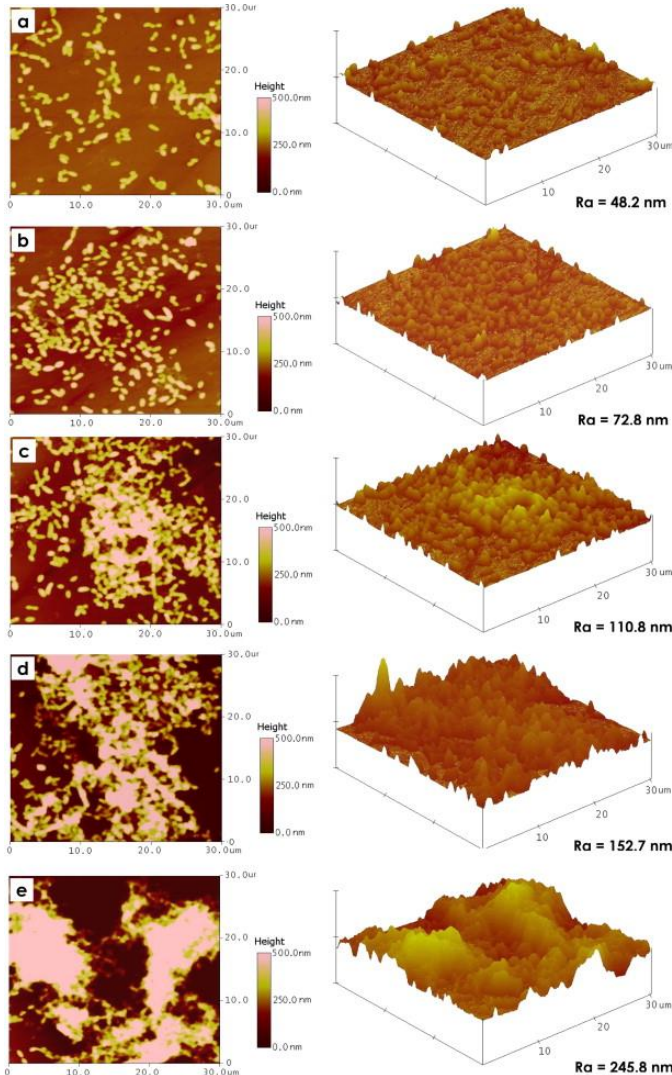
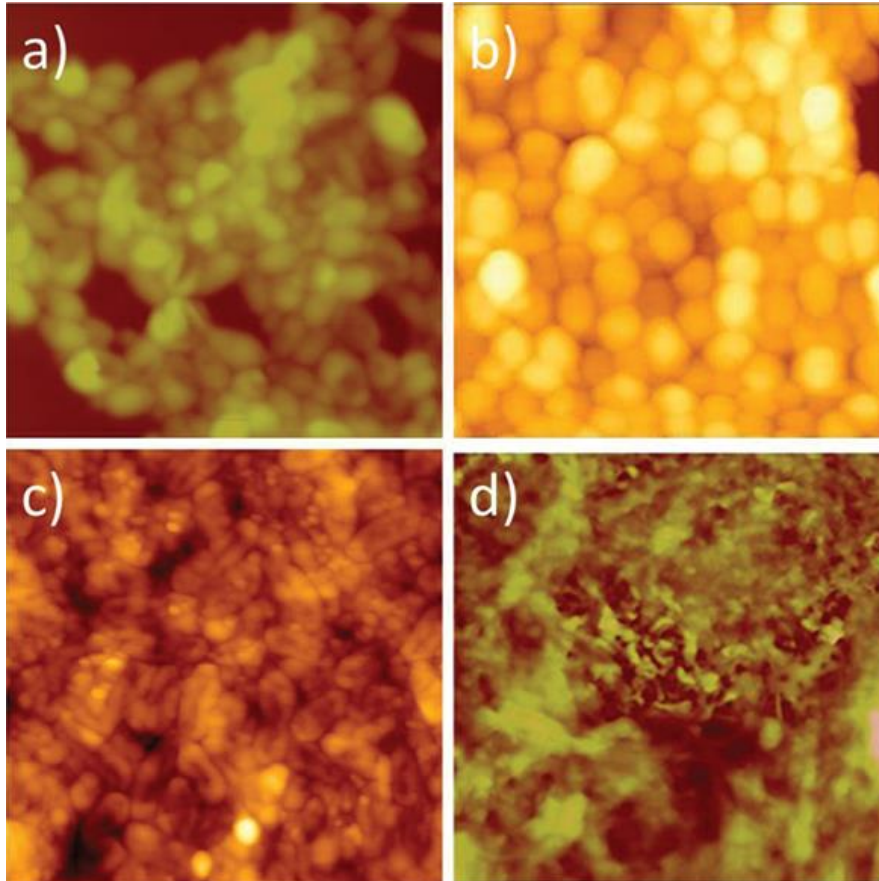


Fig. Representative two-dimensional and three-dimensional topographical AFM images of 304 SS substrates with the Pseudomonas biofilm after
(a) 3 days,
(b) 7 days,
(c) 14 days,
(d) 28 days and
(e) 42 days of exposure in the Pseudomonas inoculated medium

2, Aplicaciones en investigación veterinaria MICROBIOLOGÍA Y BIOFILMS



Sean A. James et al. 2016 AFM of biofilms— Imaging, interactions, and mechanics. Microbial Biofilms – Importance and Applications

Microscopía de fuerza atómica (AFM) para estudiar biofilms microbianos

Figure AFM tapping mode images of microbial biofilms:

(a) *Candida tropicalis* ($50 \mu\text{m}^2$),

(b) *Staphylococcus aureus* ($10 \mu\text{m}^2$),

(c) *Pseudomonas aeruginosa* ($10 \mu\text{m}^2$),

(d) mixed species biofilm at an industrially fouled reverse osmosis membrane ($10 \mu\text{m}^2$)

2, Aplicaciones en investigación veterinaria PRIONES, GENÓMICA Y PROTEÍNAS

Enfermedades Priónicas —————
Bioquímica y Biología Molecular —————► Problemas:
Complejos ADN/ARN, cromatina, estructuras nucleares —————
Interacciones proteína–proteína, señalización —————

- Fibrillas priónicas
- Interacciones proteína–proteína
- Agregación proteica
- Estabilidad estructural

AFM aporta:

- Visualización de fibrillas sin tinciones
- Medición de altura y morfología de complejos biomoleculares
- Seguimiento de cinética de agregación

2, Aplicaciones en investigación veterinaria PRIONES, GENÓMICA Y PROTEÍNAS

B. Wang et al. 2015 Following the aggregation of human prion protein on Au(111) surface in real time Chemical Communications

El AFM permite observar directamente, en tiempo real y a escala nanométrica, la formación y evolución de agregados de proteínas priónicas que son inaccesibles a técnicas estructurales convencionales

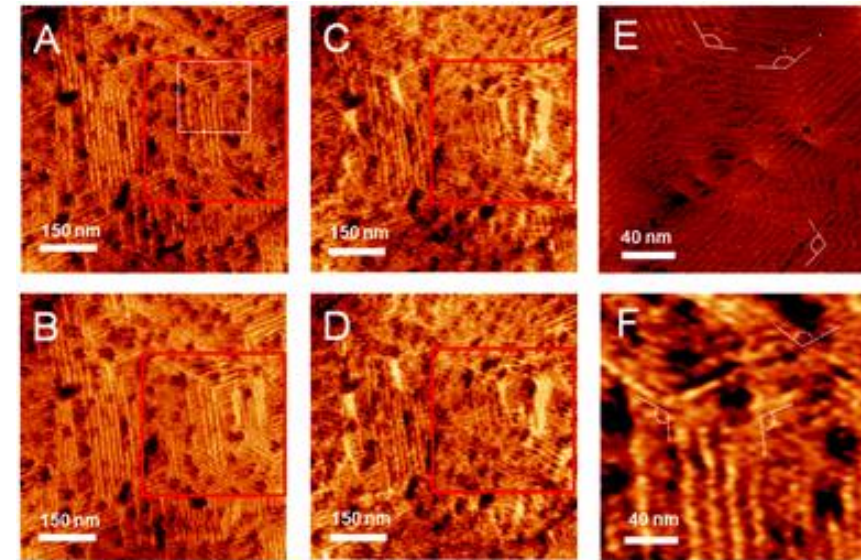


Figura. Representative AFM topography images of PrP on an Au(111) surface.

(A) to (D) are the topographic images obtained after 21 min, 47 min, 172 min, and 235 min of continuous scanning, respectively. Image size is 700 nm by 700 nm. The red frame in each image includes the area size of 400 nm by 400 nm. The highlighted areas are used in later analysis.

(E) STM image of reconstructed Au(111) surface.

(F) AFM image of PrP patterns enlarged from the area inside the white frame in (A).

The three angles marked for the herringbone structures in (E) and those for the PrP patterns in (F) all have the value of 120° . (E) and (F) have the same image size of 200 nm by 200 nm.

2, Aplicaciones en investigación veterinaria MICROBIOLOGÍA Y BIOFILMS

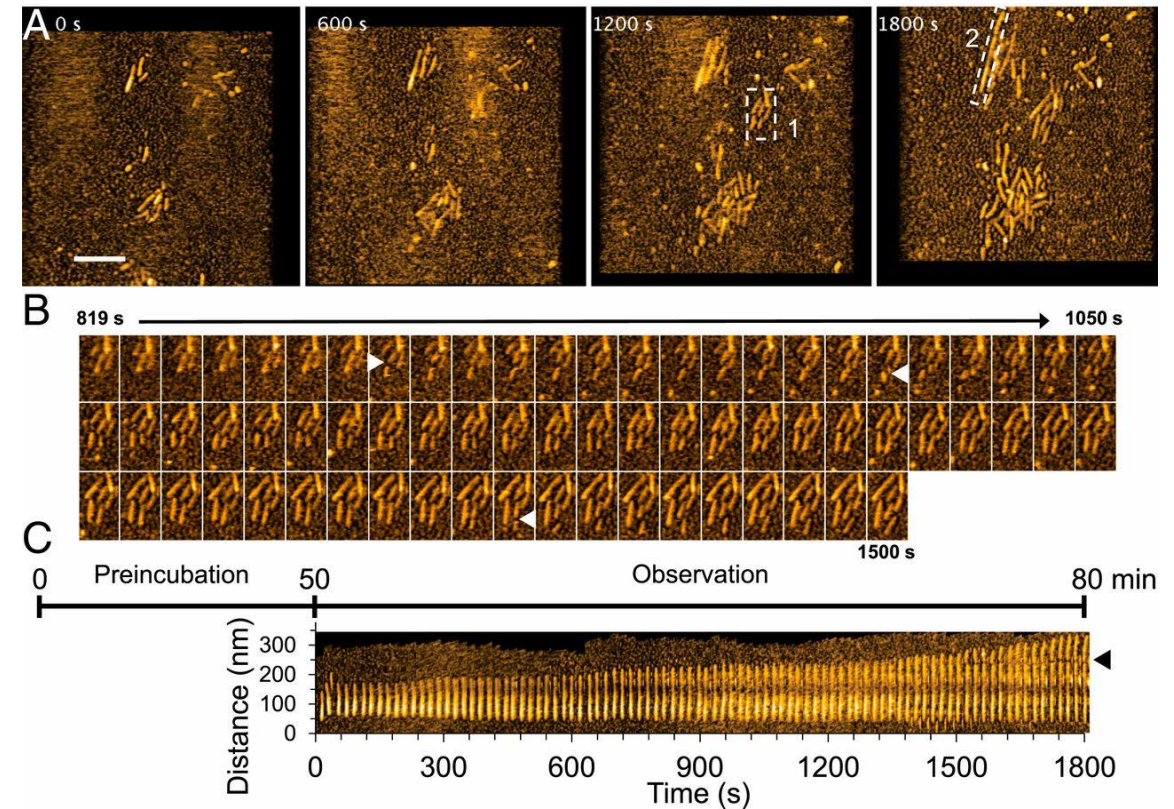
Konno et al. 2020 Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy Proceedings of the National Academy of Sciences.

El AFM mide crecimiento y reorganización de fibrillas priónicas a nivel de molécula individual

Figure. AFM images showing fibril growth.

(A) Sup35NM fibrils captured after 50-min preincubation on mica. (Z-scale, 10 nm; bar, 200 nm)
(B) Successive AFM images showing seed-dependent fibril growth and fragmentation.
(C) Kymograph of a representative growing Sup35NM fibril in the region highlighted by dashed box 2 in A.

The fragmented positions are indicated by a triangle. The time course in the figure shows the elapsed time including preincubation time since the monomers were added on the fibrils or seeds fixed on mica.



2, Aplicaciones en investigación veterinaria PATOLOGÍA ANIMAL, DIGESTIVO Y METABOLISMO

Patología Animal
ALIPAT (digestivo) → Problemas:

- Cambios mecánicos en enfermedad
- Inflamación y fibrosis. Rigidez tisular
- Alteraciones musculares
- Cambios celulares en estados metabólicos
- Adipogénesis, obesidad, biología del tejido adiposo

AFM aporta:

- Nanoindentación de tejidos
- Mapas de rigidez
- Elasticidad celular como biomarcador
- Detección de microdaños no visibles
- Cambios mecánicos en adipocitos y células metabólicas

2, Aplicaciones en investigación veterinaria PATOLOGÍA ANIMAL, DIGESTIVO Y METABOLISMO

*Vassilios E. et al. 2023 Nanoscale Prognosis of Colorectal Cancer Metastasis from AFM Image Processing of Histological Sections **Cancers***

El AFM permite extraer parámetros nanométricos de heterogeneidad estructural en tejido tumoral que actúan como predictores cuantitativos del potencial metastásico en cáncer colorrectal

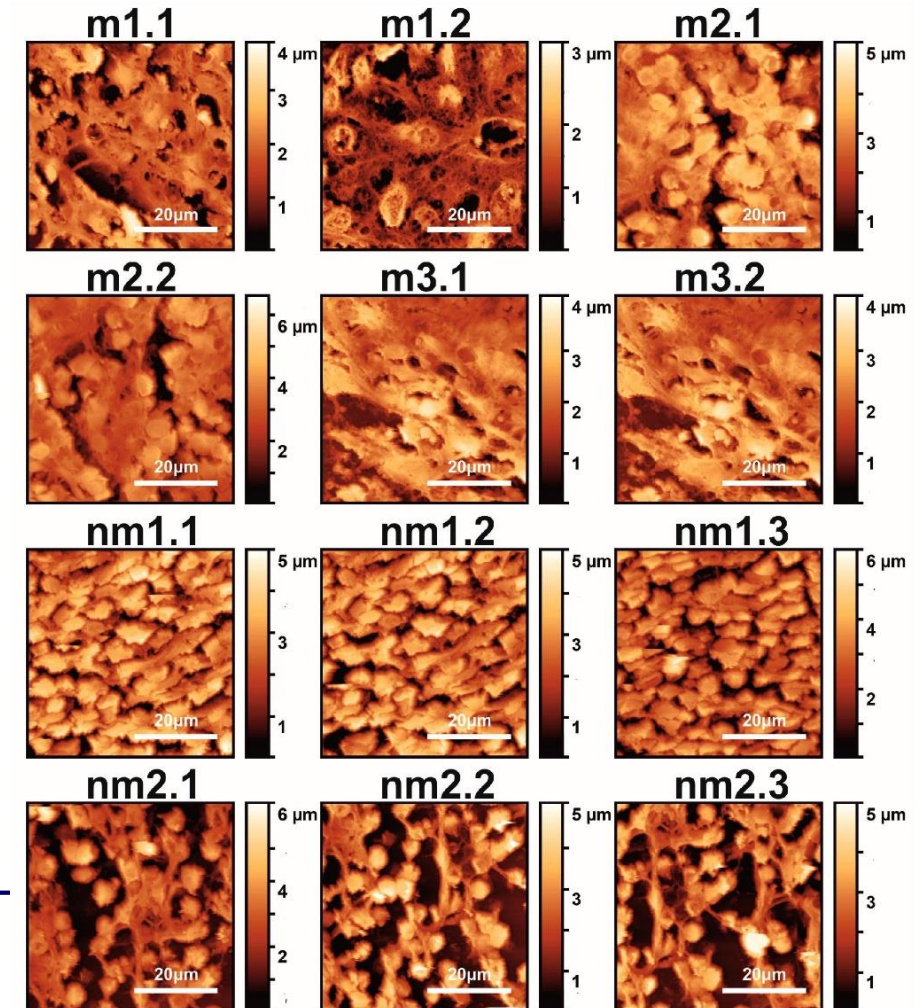


Figura: Mapas AFM de secciones histológicas de cáncer colorrectal donde el procesamiento de imagen revela heterogeneidad estructural nanométrica asociada al potencial metastásico.

2, Aplicaciones en investigación veterinaria PATOLOGÍA ANIMAL, DIGESTIVO Y METABOLISMO

Alia Mallah 2024 Atomic force microscopy characterization of white and beige adipocyte differentiation In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal

El AFM permite caracterizar de forma cuantitativa los cambios en morfología, rugosidad, elasticidad y adhesión durante la diferenciación adipocitaria, revelando diferencias mecánicas distintivas entre adipocitos blancos y beige

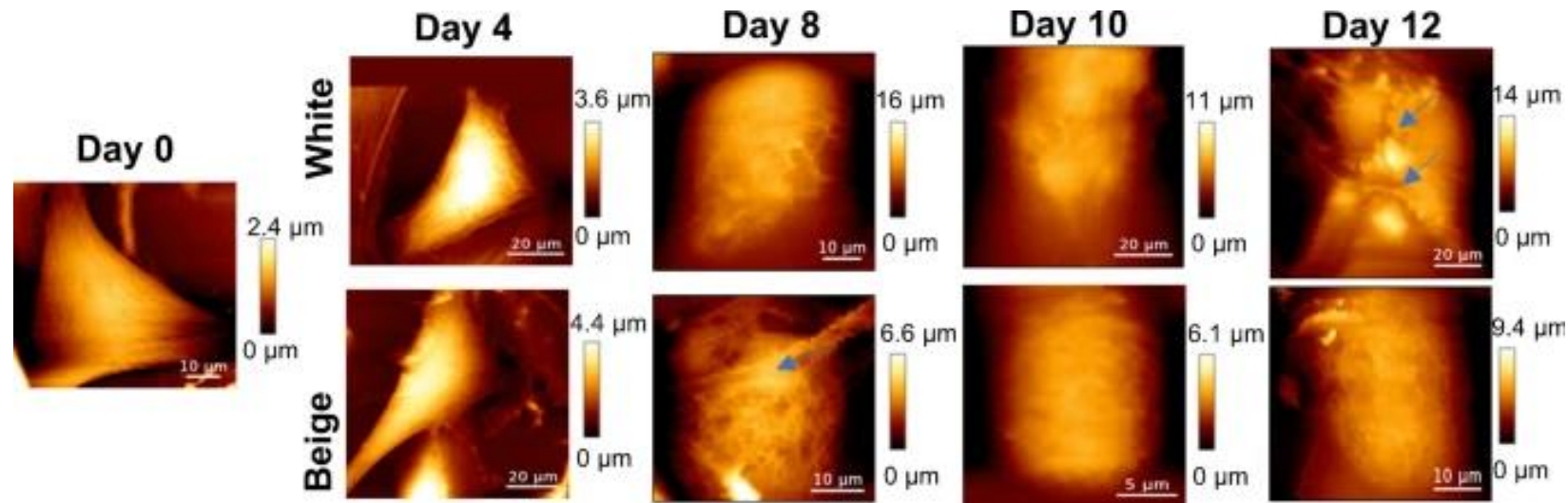


Figure. Representative AFM height images of cells during the differentiation process at all time points for white and beige (top and bottom row) adipocytes. Blue arrows to lipids observed in the adipocytes.



2, Aplicaciones en investigación veterinaria **BIOLOGÍA CELULAR Y REPRODUCCIÓN ANIMAL**

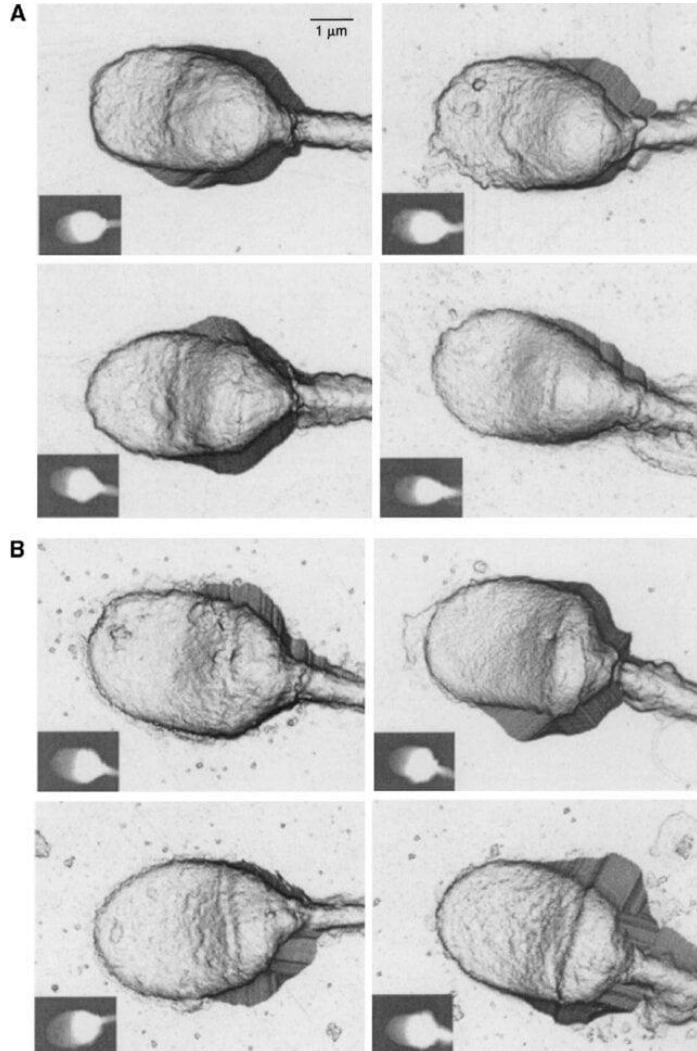
Reproducción Asistida —————▶ Problemas:

- Calidad espermática
- Elasticidad de ovocitos
- Integridad de membranas
- Interacciones gameto–zona pelúcida

AFM aporta:

- Topografía de gametos
- Elasticidad de membranas
- Adhesión molecular
- Detección de defectos estructurales

2, Aplicaciones en investigación veterinaria **BIOLOGÍA CELULAR Y REPRODUCCIÓN ANIMAL**



*Giojalas et al. 2002 Use of atomic force microscopy for morphological and morphometric analyses of acrosome-intact and acrosome-reacted human sperm. **Fertility and Sterility***
El AFM permite resolver y cuantificar cambios ultraestructurales nanométricos en el espermatozoide durante la reacción acrosómica que no pueden visualizarse ni medirse con técnicas ópticas convencionales.

Figure. Top view AFM images of acrosome intact (AI) and acrosome reacted (AR) PGC sperm. A ¼ AI sperm; B ¼ AR sperm.

2, Aplicaciones en investigación veterinaria **BIOLOGÍA CELULAR Y REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Évora, A. S. et al. 2025. Atomic force microscope protocols for characterising the elastoviscoplastic biomechanical properties of corneocytes. *Communications Biology*.

El AFM permite medir propiedades mecánicas celulares que no pueden obtenerse con microscopía convencional.

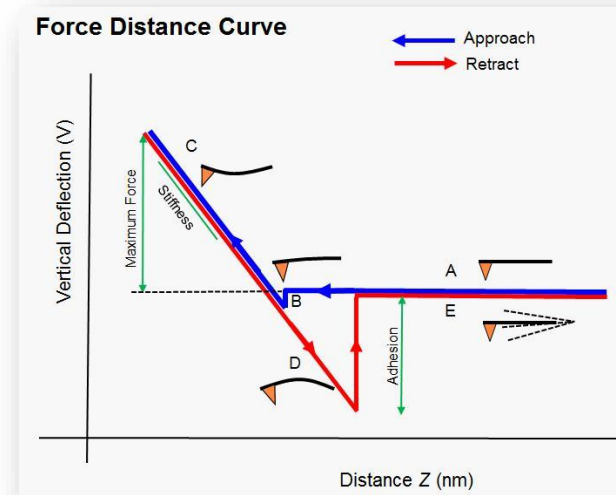
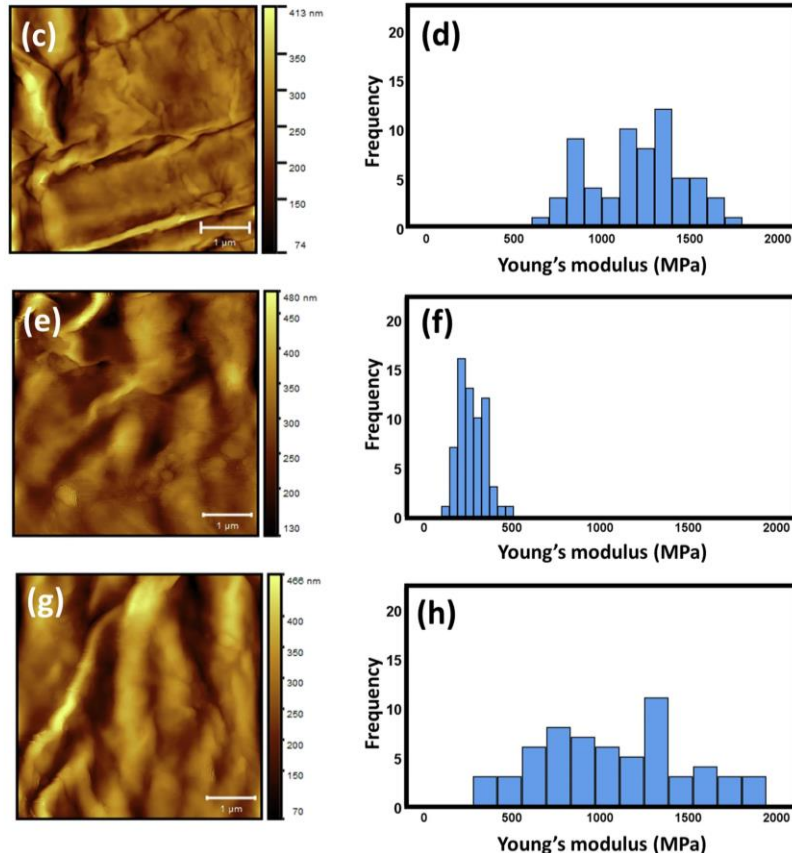
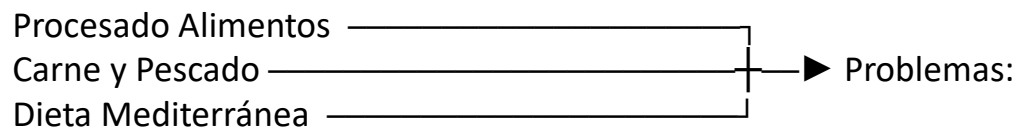


Figure. AFM images of corneocytes and histograms showing values of Young's modulus calculated from 64 force curves in that region for c and d Cell 1 of P1, e and f Cell 3 of P2 and g and h Cell 4 of P3. The cells were fixed on a glass slide, and the maximum force setpoint was 2 μN. Scale bars= 1 μm.

2, Aplicaciones en investigación veterinaria TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE ALIMENTOS



- Microestructura alimentaria
- Textura y redes proteicas
- Estabilidad de emulsiones
- Efecto del procesado

AFM aporta:

- Topografía de matrices
- Elasticidad y cohesión (QNM)
- Mapeo de fases (composición)
- Evaluación de tratamientos
- Estructura de proteínas (colágeno, miosina)
- Cambios inducidos por procesado (temperatura, presión)
- Textura y funcionalidad de alimentos

2, Aplicaciones en investigación veterinaria TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE ALIMENTOS

Jones, O. G. 2016 *Inhibiting, promoting, and preserving stability of functional protein fibrils. Current Opinion in Food Science*

El uso de AFM aporta caracterización directa de morfología, dimensiones y organización supramolecular de las fibrillas proteicas, permitiendo correlacionar su estructura a nanoescala con su estabilidad y funcionalidad bajo distintas condiciones

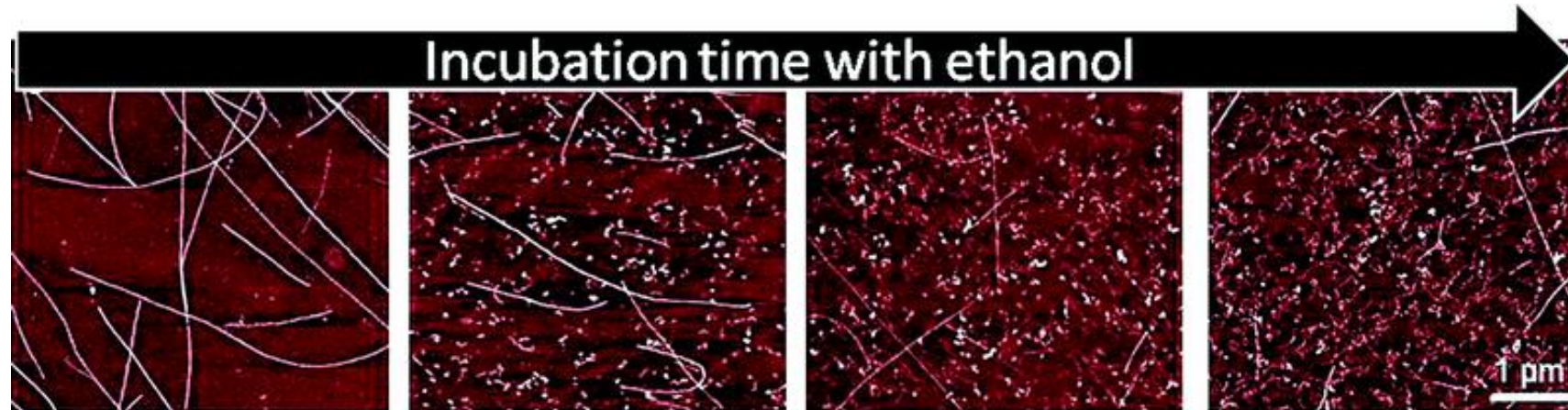


Figure. Atomic force microscopy images of β -lactoglobulin fibrils (0.1%), incubated with 50% aqueous ethanol solution at pH 2 for (from left to right) 0, 1, 5, and 8 weeks, showing the breakdown and regrowth of fibrils during incubation. Reprinted with permission from Jordens, Adamcik, Amar-Yuli and Mezzenga, *Biomacromolecules*, 2011, 12, 187. Copyright 2011 American Chemical Society.

2, Aplicaciones en investigación veterinaria TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE ALIMENTOS

Gunning, A. P., Morris, V. J. (2018). Getting the feel of food structure with atomic force microscopy. *Food Hydrocolloids*.

El AFM resuelve la dificultad de medir simultáneamente estructura y propiedades mecánicas de matrices alimentarias, proporcionando imágenes y fuerzas a escala nanométrica.

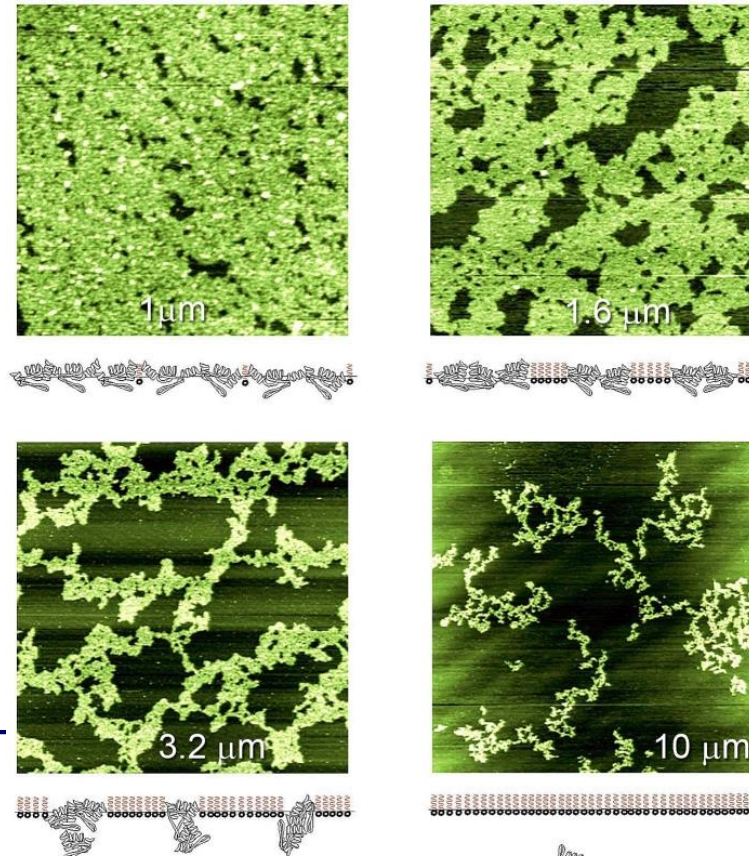
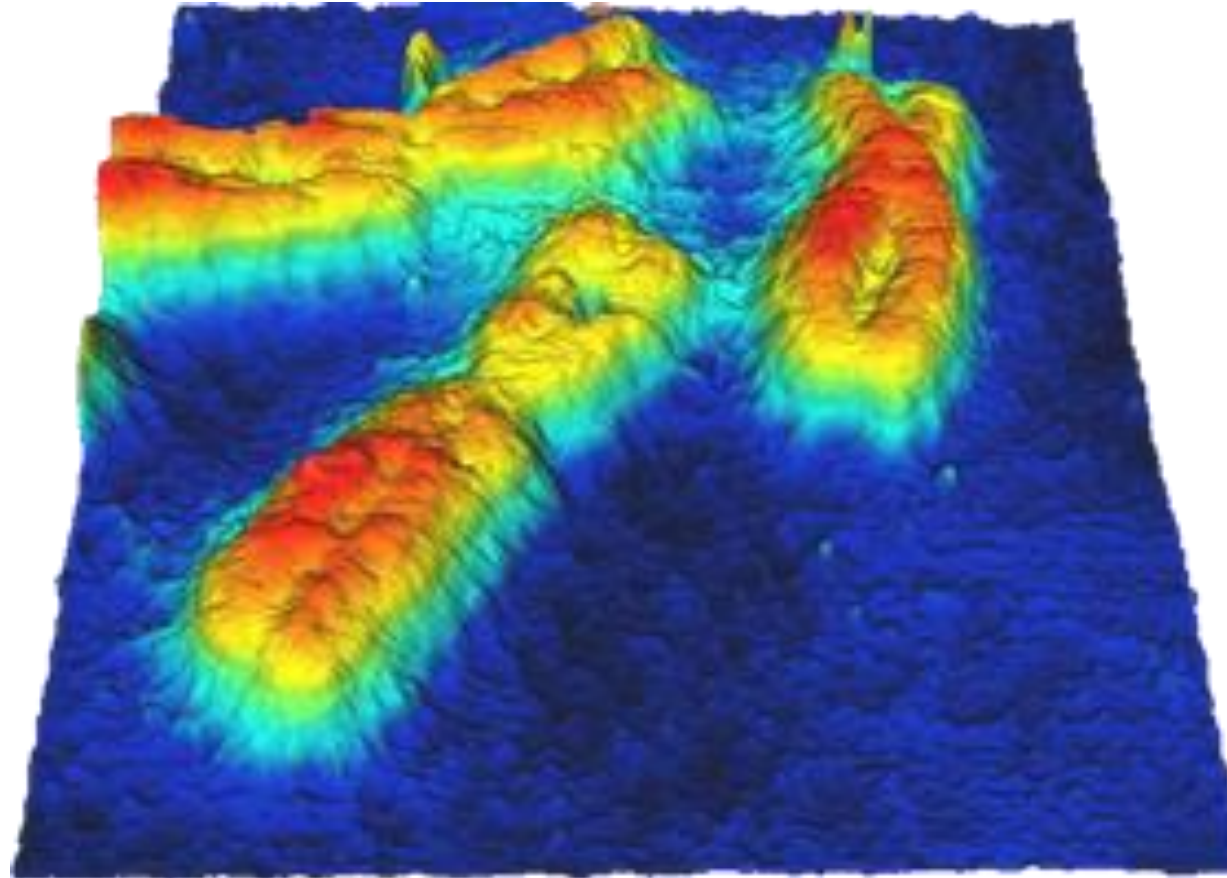


Figure. Orogenic displacement of β -lactoglobulin from an air-water interface by the surfactant Tween 20.

The images show the growth of surfactant domains, which compress and eventually break the protein network, allowing release of protein into the bulk phase (See Mackie et al. (1999), for further details).

Full size of each image is labelled.

Conclusión



LABORATORIO DE MICROSCOPIAS AVANZADAS



(+34) 976 762 980 lma@unizar.es 

 Sobre el LMA I+D+i Usuarios Industriales Servicio de Análisis Formación Equipos & Tarifas Divulgación

Contacto

ÁREA DE MICRO Y NANOFABRICACIÓN (DUAL-BEAM) Y CARACTERIZACIÓN (SEM, XPS Y XRD)

LEER MÁS

ÁREA DE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

LEER MÁS

ÁREA DE MICROSCOPIAS DE SONDA LOCAL (SPM)

LEER MÁS