

NANOTECNOLOGIES EN MECÀNICA MOLECULAR I CEL·LULAR

MIREIA GRABULOSA, LARA BUSCEMI, JORDI ALCARAZ, XAVIER TREPAT, FELIX RICO I DANIEL NAVAJAS

Unitat de Biofísica i Bioenginyeria. Departament de Ciències Fisiològiques I. Facultat de Medicina. Centre de Recerca en Bioelectrònica i Nanobiociència. - Universitat de Barcelona - IDIBAPS

Adreça per a la correspondència: Daniel Navajas. Unitat de Biofísica i Bioenginyeria. Facultat de Medicina. Carrer de Casanova, 143. 08036 Barcelona. Tel.: 934 024 515. Fax: 934 024 516. Adreça electrònica: dnavajas@medicina.ub.es.

Paraules clau: Nanobiotecnologia, microscopi de força atòmica, trampes òptiques, micropartícules magnètiques.

Key words: Nanobiotechnology, atomic force microscopy, optical traps, magnetic beads.

RESUM

Algunes nanotècniques recents permeten la manipulació de biomolècules i cèl·lules en escala nanomètrica amb la mesura simultània de la força aplicada amb resolució de piconewtons. Aquestes escales de desplaçament i força, i la possibilitat de treballar en medi líquid, fan que siguin eines molt útils per a l'estudi de les propietats mecàniques de molècules i cèl·lules individuals en condicions fisiològiques. Entre les tècniques més utilitzades es troben el microscopi de força atòmica, les trampes de làser i les microesferes magnètiques. En aquest treball es descriuen els principis de funcionament d'aquestes tècniques en aplicacions biològiques i, en particular, en l'estudi de la mecànica molecular i cel·lular.

SUMMARY

Recent nanotechnologies have enabled the manipulation of biomolecules and cells at the nanometric scale and the simultaneous measurement of the applied force with resolution in the piconewton range. These displacement and force scales and the possibility of working in liquid medium enhance the utility of these tools for studying the mechanical properties of single molecules and cells in physiological conditions. The most commonly used techniques

include the atomic force microscope, laser traps and magnetic beads. We describe the principles of these techniques in biological applications and, particularly, in the study of cell and molecular mechanics.

INTRODUCCIÓ

Les propietats mecàniques de les cèl·lules són determinants de moltes funcions cel·lulars fonamentals, com la forma, integritat estructural, motilitat, mecanotransducció i expressió gènica. Per la seva banda, la mecànica cel·lular està determinada per les propietats mecàniques de les molècules que constitueixen l'esquelet cel·lular i pels mecanismes moleculars de generació de força i moviment. Malgrat el seu paper essencial, les propietats i el comportament mecànic de les molècules i cèl·lules és encara poc conegut a causa de l'absència, fins fa poc, de tècniques adients de manipulació a escala molecular i cel·lular. El recent desenvolupament de nanotècniques que permeten manipular la matèria en l'escala del nanòmetre i mesurar forces en l'escala del piconewton ha obert noves possibilitats per a la recerca de la mecànica molecular i cel·lular. A més, aquestes tècniques poden treballar en medi líquid, i això les converteix en eines especialment adequades per a la recerca molecular i cel·lular en condicions fisiològiques. Amb part d'aquestes nanotècniques es manipula la matèria per contacte directe d'una sonda mecànica. Amb d'altres es fa la manipulació mitjançant l'aplicació de forces generades per camps òptics o magnètics externs. La nanotècnica de manipulació mecànica amb una sonda de contacte més utilitzada actualment és el microscopi de força atòmica (MFA). Entre les tècniques de camp extern cal destacar la manipulació de microesferes magnètiques mitjançant camps magnètics i les denominades *trampes òptiques*, que manipulen microesferes transparents

amb feixos de làser. En aquest treball es descriu el principi de funcionament d'aquestes tècniques en la seva aplicació biològica i, en particular, en l'estudi de la mecànica molecular i cel·lular.

MICROSCOPI DE FORÇA ATÒMICA

El microscopi de força atòmica va ser inventat per Binnig i Quate (1986). L'MFA utilitza un microflexor microfabricat amb silici com a sonda per a explorar la superfície de

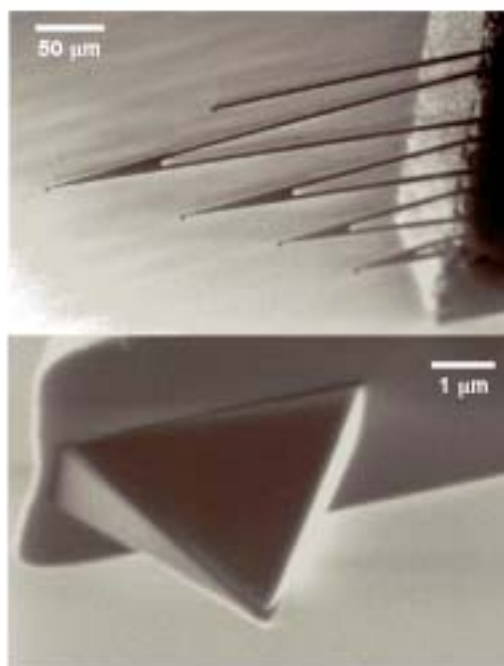


FIGURA 1. Imatges de microflexors de microscopi de força atòmica (MFA) obtingudes amb microscòpia electrònica de rastreig. A dalt: imatge de microflexors rectangulars i triangulars de diverses dimensions. A sota: detall de la punta d'exploració d'una sonda rectangular.

la mostra (figura 1). A l'extrem del microflexor es troba una punta molt fina amb un radi de contacte de l'ordre de 10 nm. Habitualment, la mostra per explorar se situa sobre un actuador piezoelèctric que permet un desplaçament en les tres direccions de l'espai (figura 2). La força realitzada per la sonda sobre la superfície de la mostra es mesura enfocant un feix de làser (1-5 mW) sobre l'extrem del microflexor. El feix reflectit es fa incidir en un fotodetector segmentat. Quan no hi ha contacte entre la punta de la sonda i la superfície de la mostra, el feix reflectit incideix en el centre del fotodetector i la diferència de corrent entre els dos segments és nul·la. Apropant la mostra a la sonda amb el piezoelèctric s'estableix contacte i la sonda es flexiona i provoca un desviament del feix de làser cap a un dels segments del fotodetector, i en resulta una distribució asimètrica de llum. La diferència de corrent entre els dos segments permet determinar el grau de flexió de la sonda i, coneixent la seva constant elàstica, la força aplicada. Aquest sistema de detecció òptica es pot utilitzar en medi líquid, la qual cosa permet estudiar biomolècules i cèl·lules en condicions fisiològiques. Els actuadors piezoelèctrics actuals permeten desplaçar la sonda en els tres eixos amb resolució (RMS) subnanomè-

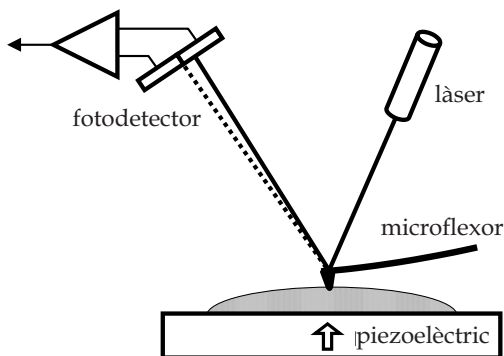


FIGURA 2. Principi de funcionament del microscopi de força atòmica.



FIGURA 3. Microflexor triangular en contacte amb la superfície d'una cèl·lula epitelial bronquial humana (BEAS-2B) en cultiu. Imatge obtinguda amb un microscopi òptic invertit amb camp brillant.

trica en un rang de $\sim 100 \mu\text{m}$ en el pla de la mostra (X-Y) i $\sim 10 \mu\text{m}$ en alçada (Z). A més, utilitzant els microflexors més flexibles disponibles actualment ($\sim 0,01 \text{ nN/nm}$) es poden mesurar forces amb resolució de l'ordre del pN. En aplicacions biològiques és important visualitzar la sonda i la mostra simultàniament. Això es pot aconseguir muntant l'MFA sobre la platina d'un microscopi òptic invertit. En aquest cas és convenient acoblar la sonda al piezoelèctric, per a efectuar l'exploració desplaçant la sonda sobre la superfície de la mostra mentre aquesta es manté centrada en el camp visual del microscopi (figura 3).

Inicialment l'aplicació biològica més freqüent de l'MFA va ser l'obtenció d'imatges de biomolècules i cèl·lules adherents (Le Grimellec *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1995). Per a obtenir imatges topogràfiques de la superfície es desplaça la mostra en el pla X-Y mentre un sistema de retroalimentació ajusta el desplaçament vertical (Z) per mantenir la força en un nivell constant prefixat (figura 4). No obstant això, com que el sistema de retroalimentació no té resposta instantània, la sonda no pot mantenir amb precisió la

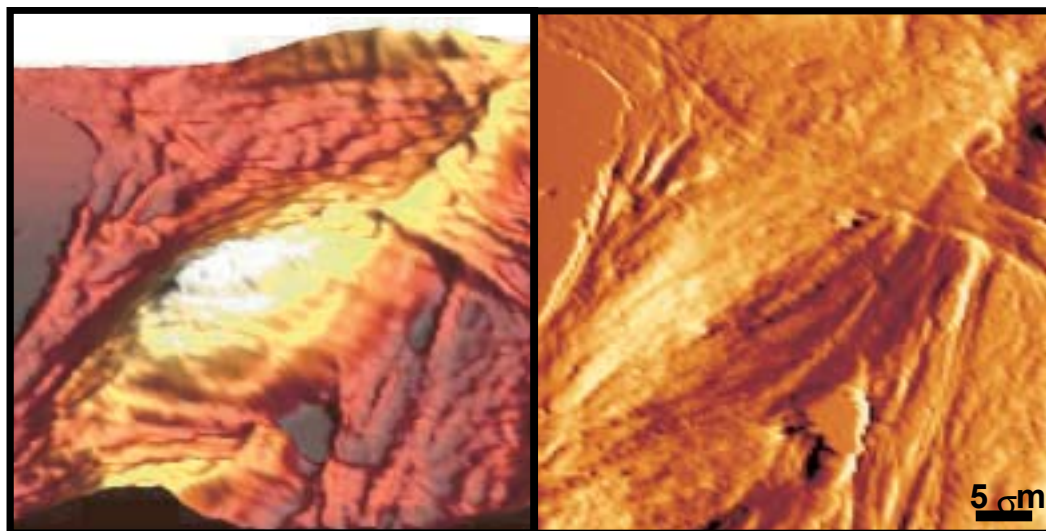


FIGURA 4. Imatge de MFA d'una cèl·lula epitelial bronquial humana en cultiu. Esquerra: Imatge de topografia de superfície. Dreta: Imatge d'error.

força prefixada. Per tant, la imatge topogràfica de la superfície de la mostra no és obtinguda realment amb un nivell de força constant. La imatge d'error, calculada en cada punt com la diferència entre la força real i la prefixada, mostra detalls fins de la morfologia de la superfície o canvis locals de la duresa cel·lular. Aquests s'interpreten com el reflex d'estructures del citosquelet o òrgans interiors.

Cada vegada és més freqüent utilitzar l'MFA per a investigar les propietats mecàniques de biomolècules i cèl·lules individuals. En lloc d'explorar la superfície de la mostra amb força constant es poden estudiar les propietats mecàniques cel·lulars prement suaument la sonda en un punt de la superfície i mesurant la relació força-desplaçament (F-Z) (figura 5). Analitzant la relació F-Z amb un model elàstic apropiat, que tingui en compte el progressiu augment de l'àrea de contacte entre la punta del microflexor i la superfície, es pot determinar el mòdul de Young (E) de la mostra (A-Hassan *et al.*, 1998; Weisenhorn *et al.*, 1993). La figu-

ra 5 mostra la corba de retracció per sota de la corba de compressió. Aquesta histèresi reflecteix una dissipació d'energia i, per tant, la cèl·lula presenta propietats viscoelàstiques. També pot observar-se que la corba de separació mostra una regió de forces negatives que indica l'existència d'adhesió inespecífica de la punta de la sonda amb la membrana cel·lular. El comportament viscoelàstic de la cèl·lula i, en particular, la separació entre l'energia emmagatzemada i dissipada i la seva dependència amb la velocitat pot determinar-se més acuradament a partir de corbes F-Z obtingudes fent oscil·lar sinusoidalment la sonda al voltant d'un valor de força o desplaçament prefixat (figura 6). Aquest procediment permet calcular el mòdul elàstic complex ($G = G' + iG''; \sqrt{-1}$; Mahaffy *et al.*, 2000). La part real es denomina *mòdul d'emmagatzematge* (G') i caracteritza el comportament elàstic de la mostra. La part imaginària o mòdul de pèrdua (G'') reflecteix la viscositat o fricció interna de la cèl·lula.

En les mesures dinàmiques efectuades

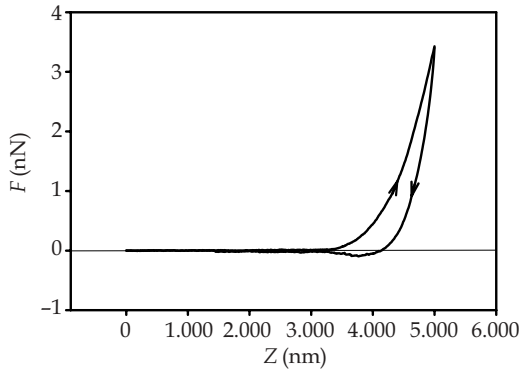


FIGURA 5. Corbes força-desplaçament registrades en una cèl·lula BEAS-2B.

en medi líquid cal tenir en compte la força de fricció hidrodinàmica que és conseqüència del moviment relatiu del microflexor i el medi líquid. Aquest artefacte es pot corregir fàcilment estimant el coeficient hidrodinàmic del microflexor en contacte a partir de mesures oscil·latòries del coeficient de fricció efectuades a diferents separacions de la superfície de contacte (Alcaraz *et al.*, 2002).

En l'obtenció d'imatges i en la mesura dels mòduls elàstic o viscoelàstic l'exploració de la mostra es realitza en condicions de força positiva en les quals la punta del microflexor comprimeix la mostra. Una alternativa és el recobriment de la punta del microflexor amb un lligand específic d'una molècula d'interès. Així, quan s'estableix contacte es formen unions entre les molècules que recobreixen la punta i la molècula estudiada. Aquest procediment permet estudiar-ne les propietats mecàniques fixant un extrem de la molècula a un substrat i registrant les corbes força-extensió mentre s'estira l'altre extrem amb la punta del microflexor. Aquest mètode, denominat *espectroscòpia de força*, ha permès mesurar l'elasticitat molecular i investigar el mecanisme de desplegament de proteïnes (Fisher *et al.*,

1999). Recobrint la sonda amb un lligand d'un receptor específic i separant-la fins a produir el trencament de la unió es poden determinar les forces de ruptura de l'enllaç lligand-receptor (Merkel *et al.*, 1999; Willemsen *et al.*, 2000). Els experiments d'adhesió molecular es poden efectuar també amb receptors de membrana en cèl·lules en cultiu. La figura 7 mostra corbes d'aproximació i retracció obtingudes en una cèl·lula BEAS-2B en cultiu recobrint la punta de la sonda amb un pèptid sintètic que conté la seqüència arginina-glicina-àcid aspàrtic (RGD), i que s'uneix específicament a integrines de la membrana. Les corbes de retracció mostren zones de forces negatives d'adhesió amb dents de serra. Els bruscs salts de força s'associen a ruptura d'enllaços intermoleculars.

TRAMPES DE LÀSER

La sonda de l'MFA és una eina molt útil per a manipular micropartícules, biomolècules o cèl·lules. No obstant això, aquesta tècnica requereix el contacte de la sonda amb l'objecte per manipular. Això representa una limitació quan no hi ha accés directe a

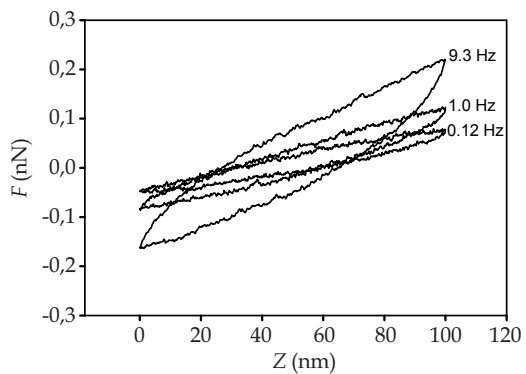


FIGURA 6. Resposta oscil·latòria de la cèl·lula de la figura 5 obtinguda a diferents freqüències al voltant d'un punt de força de ~ 1 nN.

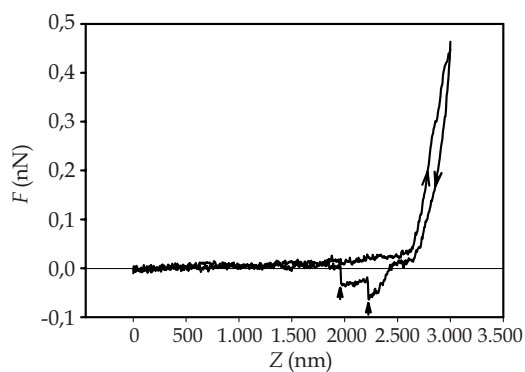


FIGURA 7. Corbes força-desplaçament obtingudes en una cèl·lula BEAS-2B recobrint la punta de la sonda de MFA amb un pèptid sintètic que conté RGD. La corba de separació mostra salts (fletxes) que corresponen a la ruptura d'enllaços amb receptors de membrana.

l'objecte com, per exemple, en estudiar estructures intracel·lulars. Alternativament, la manipulació es pot fer utilitzant camps externs. En general, això requereix la unió prèvia d'una partícula micromètrica a l'objecte per manipular. Les trampes de làser es basen en les forces aplicades en una microesfera transparent per la pressió de radiació produïda per un feix de làser enfocat (Ashkin *et al.*, 1986; Ashkin, 1997; Wuite *et al.*, 2000). La figura 8 descriu el principi d'utilització d'aquesta tècnica per a la manipulació molecular i cel·lular. Un feix de làser travessa un objectiu de microscopi d'elevada obertura numèrica i provoca un fort gradient de llum en el focus de l'objectiu. Una microesfera transparent centrada en el focus està sotmesa a una força resultant nul·la. Si l'esfera, però, se separa lateralment de l'eix, la pressió de radiació provoca una força resultant dirigida cap a l'eix òptic que tendeix a retornar l'esfera al centre focal. D'aquesta manera la microesfera es troba «atrapada» pel gradient òptic. Desplaçant la posició del feix de làser es pot moure l'esfera atrapada amb resolució nanomètrica. Recobrint la microesfera amb un lligand ade-

quat, la trampa de làser es converteix en una eina molt útil per a manipular biomolècules i cèl·lules individuals (Bustamante *et al.*, 2000). També és possible manipular estructures intracel·lulars introduint la microesfera a l'interior de la cèl·lula.

Per a estudiar la mecànica molecular i cel·lular no solament cal provocar desplaçaments controlats sinó també conèixer simultàniament la força aplicada. En el cas que l'esfera estigui sotmesa a una força, es desplaçarà del centre de la trampa fins que la força òptica equilibri la força aplicada per l'objecte manipulats. Així, la separació de la microesfera respecte al centre de la trampa indica la força aplicada. El desplaçament de la microesfera es pot determinar agafant la imatge microscòpica amb una càmera digital (CCD) d'alta resolució i calculant el centre geomètric amb algorismes de processament d'imatge. Amb aquests algorismes es pot mesurar el desplaçament del centre geomètric de l'esfera amb resolució nanomètrica. Per petites separacions el desplaçament és proporcional a la força aplicada. Calibrant prèviament la relació força-desplaçament de la trampa, es poden mesurar forces amb resolució del pN. Aug-

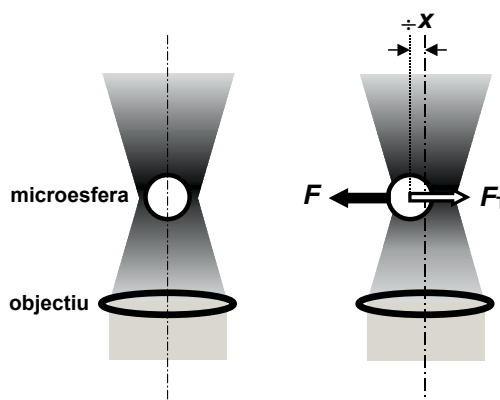


FIGURA 8. Trampa òptica. Esquerra: microesfera situada al punt focal amb una força resultant nul·la. Dreta: microesfera sotmesa a una força lateral F que la desplaça de l'eix òptic fins que la força de la trampa F_T equilibra F .



FIGURA 9. Imatge obtinguda amb microscopi òptic invertit amb camp brillant d'un cultiu cel·lular de BEAS-2B al qual s'han adherit a la membrana cel·lular microesferes ferromagnètiques (5 µm) (fletxes) recobertes amb pèptid-RGD.

mentant convenientment la intensitat del feix de làser, el rang de forces pot estendre's fins a $\sim 10^2$ pN. No obstant això, cal tenir en compte que una intensitat de llum molt elevada pot causar danys o alteracions en la mostra (Ashkin, 1997).

MICROPARTÍCULES MAGNÈTIQUES

A causa que, excepte en pocs casos, les biomolècules i cèl·lules no tenen propietats magnètiques, és possible manipular micropartícules magnètiques aplicant forces elevades (nN) amb camps magnètics externs sense provocar cap efecte apreciable en la mostra. La figura 9 mostra cèl·lules BEAS-2B en cultiu sobre les quals s'han adherit microesferes ferromagnètiques de 5 µm de diàmetre recobertes amb pèptid-RGD. En primer lloc, les esferes són sotmeses breument (~ 1 ms) a un camp magnètic horitzontal molt intens (~ 100 mT) que magnetitza totes

les esferes en la mateixa direcció i produeix un moment magnètic remanent. Si a continuació s'aplica un camp magnètic uniforme vertical d'intensitat més baixa (~ 2 mT), per a no remagnetitzar les esferes, es provoca un moment de torsió que les fa girar respecte el seu punt d'unió amb la membrana. La relació entre el moment de torsió aplicat i el gir produït en l'esfera permet estudiar el comportament mecànic cel·lular i en particular les propietats mecàniques del citoesquelet i els processos de mecanotransducció (Fabry *et al.*, 2001; Maksym *et al.*, 2000; Puig-de-Morales *et al.*, 2001). Fent funcionals les esferes amb diferents lligands es poden explorar distintes vies de transmissió de forces a través de la membrana cel·lular. En lloc d'un moment de torsió, es pot induir una força de translació en les esferes sotmetent-les a l'acció d'un gradient de camp magnètic aplicat en la direcció del seu moment remanent (Bausch *et al.*, 1999). Els camps magnètics també permeten manipular microesferes paramagnètiques (Smith *et al.*, 1992; Guttenberg *et al.*, 2000). Els materials paramagnètics no tenen magnetisme remanent significatiu i només presenten el moment magnètic induït per l'acció d'un camp magnètic extern. Per a desplaçar esferes paramagnètiques cal aplicar un camp magnètic no uniforme que generi una força de translació en la direcció del gradient magnètic (Ziemann *et al.*, 1994). Atès que les esferes paramagnètiques tenen un eix preferent de magnetització, també és possible generar moments de torsió en girar el camp magnètic extern (Strick *et al.*, 1996). Si bé es poden generar moments de torsió i forces de translació tant en esferes paramagnètiques com ferromagnètiques, aquestes últimes exhibeixen una magnetització per unitat de volum notablement superior, per la qual cosa les forces generades poden ser d'ordres de magnitud superiors. Un aspecte remarcable de la manipulació magnètica és la possibili-

tat d'aplicar el mateix camp i gradient sobre tota una zona d'estudi, per la qual cosa totes les esferes estan sotmeses simultàniament a la mateixa força o moment. Això, en contraposició a les trampes de làser, permet manipular simultàniament diverses partícules.

CONCLUSIONS

La microscòpia de força atòmica i la manipulació de microesferes amb camps externs han obert noves possibilitats a l'estudi de les propietats mecàniques de molècules i cèl·lules en condicions fisiològiques. Aquestes tècniques no solament permeten la manipulació espacial amb resolució nanomètrica, sinó també la mesura simultània de la força aplicada en resolució del pN, que són les escales de desplaçament i força rellevants en biomolècules i cèl·lules. A més, es poden mesurar en temps real els canvis induïts per fàrmacs o altres tractaments experimentals. Cal tenir en compte, no obstant això, que cada tècnica presenta avantatges i limitacions respecte de les altres, per la qual cosa cal triar en cada cas la que és més adient a les condicions experimentals concretes. Quan la mostra es pot manipular per contacte directe, l'MFA és una eina molt útil. Pot controlar amb precisió tant el desplaçament de la sonda com la força aplicada. El control de desplaçament és en les tres dimensions i amb resolució nanomètrica, però en un rang limitat ($\sim 10 \mu\text{m}$ en Z, i $\sim 100 \mu\text{m}$ en X-Y). El rang de forces de la sonda és molt ampli en Z, i va des del pN a desenes de nN. No obstant això, és difícil mesurar forces paral·leles a la sonda (X-Y). Amb les pinces òptiques és complicat controlar amb precisió la força i el desplaçament. El rang de desplaçament en el pla X-Y és molt ampli i es poden aplicar forces amb una resolució molt elevada (inferior al pN) en el pla perpendicular al feix, però, la manipulació en la direcció de l'eix òptic és difícil. Per a no danyar la

mostra, la força màxima es limita a 10-100 pN. Amb les microesferes magnètiques es controla directament la força amb molta precisió ($\sim 10^{-3}$ pN), i és complicat controlar-ne el desplaçament. No és fàcil arribar a forces superiors a uns pocs pN, però és la tècnica més útil per a aplicar moments de torsió. Com que la força es pot aplicar simultàniament a un nombre elevat de partícules, s'obté ràpidament informació estadística de l'experiment. A més, el fet de no utilitzar llum de làser permet la manipulació magnètica amb visualització simultània mitjançant microscòpia convencional i de fluorescència.

Futures millores d'aquestes tècniques com, per exemple, el desenvolupament de microflexors piezoresistius d'alta sensibilitat i susceptibles de treballar en medi líquid podran substituir el sistema de detecció per làser i simplificaran substancialment l'aplicació de l'MFA en estudis en biomolècules i cèl·lules vives. S'obren també noves perspectives amb la combinació de les nanotècniques de manipulació amb les tècniques de fluorescència de molècules individuals (Ishijima i Yanagida, 2001). La possibilitat de manipular estructures cel·lulars visualitzant simultàniament canvis dinàmics a escala molecular ha d'aportar un avenç significatiu en la comprensió del comportament mecànic cel·lular.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat en part per la Direcció General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (PM-980027).

BIBLIOGRAFIA

A-HASSAN, E.; W. F. HEINZ; M. D. ANTONIK; N. P. D'CosTA; S. NAGESWARAN; C. SCHOENENBERG; J. H. HOH

- (1998). «Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy». *Biophys. J.*, núm. 74, pàg. 1564-1578.
- ALCARAZ, J.; L. BUSCEMI; M. PUIG-DE-MORALES; J. COLCHERO; A. BARÓ; D. NAVAJAS (2002). «Correction of microrheological measurements of soft samples with atomic force microscopy for the hydrodynamic drag on the cantilever». *Langmuir*, núm. 18, pàg. 716-721.
- ASHKIN, A.; J. DZIEDZIC; J. BJORKHOLM; S. CHU (1986). «Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles». *Optical Lett*, núm. 11, pàg. 288-290.
- ASHKIN, A. (1997). «Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94, pàg. 4853-4860.
- BAUSCH, A. R.; W. MÖLLER; E. SACKMANN (1999). «Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers». *Biophys. J.* núm. 76, pàg. 573-579.
- BINNIG, G.; C. F. QUATE (1986). «Atomic force microscope». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 56, pàg. 930-933.
- BUSTAMANTE, C.; J. C. MACOSKO; G. J. L. WUITE (2000). «Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one». *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, núm. 1, pàg. 130-136.
- FABRY, B., G. N. MAKSYM; J. P. BUTLER; M. GLOGAUER; D. NAVAJAS; J. J. FREDBERG (2001). «Scaling the microrheology of living cells». *Phys. Rev. Lett*, núm. 87, pàg. 148102.
- FISHER, T. E.; A. F. OBERHAUSER; M. CARRION-VAZQUEZ, P. E. MARSZALEK; J. M. FERNANDEZ (1999). «The study of protein mechanics with the atomic force microscope». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 24, pàg. 379-384.
- GUTTENBERG, Z.; A. R. BAUSH; B. HU; R. BRUINSMA; L. MORODER; E. SACKMANN (2000). «Measuring ligand-receptor unbinding forces with magnetic beads; molecular leverage». *Langmuir*, núm. 16, pàg. 8984-8993.
- ISHIJIMA, A.; T. YANAGIDA (2001). «Single molecule nanobioscience». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 26, pàg. 438-444.
- LE GRIMELLEC, C.; E. LESNIEWSKA; M. C. GIOCONDI; E. FINOT; V. VIE; J. P. GOUDONNET (1998). «Imaging of the surface of living cells by low-force contact-mode atomic force microscopy». *Biophys. J.*, núm. 75, pàg. 595-703.
- MAHAFFY, R. E.; C. K. SHIH; F. C. MACKINTOSH; J. KAS (2000). «Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 85, pàg. 880-883.
- MAKSYM, G. N.; B. FABRY; J. P. BUTLER; D. NAVAJAS; D. J. TSCHUMPERLIN, J. LAPORTE; J. J. FREDBERG (2000). «Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz». *J. Appl. Physiol.*, núm. 89, pàg. 1619-1632.
- MERKEL, R.; P. NASSOY, A. LEUNG, K. RITCHIE, E. EVANS (1999). «Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy». *Nature*, núm. 397, pàg. 50-53.
- MULLER, D. J.; F. A. SCHABERT; G. BULDT; A. ENGEL (1995). «Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy». *Biophys. J.*, núm. 68, pàg. 1681-1686.
- PUIG-DE-MORALES, M.; M. GRABULOSA; J. ALCARAZ; J. MULLOL; G. N. MAKSYM; J. J. FREDBERG; D. NAVAJAS (2001). «Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation». *J. Appl. Physiol.*, núm. 91, pàg. 1152-1159.
- SMITH, S. B.; L. FINZI; C. BUSTAMANTE (1992). «Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads». *Science*, núm. 258, pàg. 1122-1126.
- STRICK, T. R.; J. F. ALLEMAND; D. BENSIMON; A. BENSIMON; V. CROQUETTE (1996). «The elasticity of a single supercoiled DNA molecule». *Science*, núm. 271, pàg. 1835-1837.
- WEISENHORN, A. L.; M. KHORSANDI; S. KASAS; V. GOTZOS; H. J. BUTT (1993). «Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM». *Nanotechnology*, núm. 4, pàg. 106-113.
- WILLEMSSEN, O. H.; M. M. E. SNEL; A. CAMBI; J. GREVE; B. G. DE GROOTH; C. G. FIGDOR (2000). «Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy». *Biophys. J.*, núm. 79, pàg. 3267-3281.
- WUITE, G. J. L.; R. J. DAVENPORT; A. RAPPAPORT, C. BUSTAMANTE (2000). «An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules». *Biophys. J.*, núm. 79, pàg. 1155-1157.
- ZIEMANN, F.; J. RÄDLER; E. SACKMANN (1994). «Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead microrheometer». *Biophys. J.*, núm. 66, pàg. 2210-2216.