



## NANOESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HeLa POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Melina Tapia Tapia <sup>1</sup>, Eva Ramón Gallegos <sup>2</sup> y Nikola Batina <sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Nanotecnología e Ing. Molecular, Departamento de Química, CBI, UAM-Iztapalapa, bani@xanum.uam.mx, melit1@yahoo.com. <sup>2</sup>Laboratorio de Citopatología Ambiental, Depto. Morfología ENCB-IPN., evaramong@portugalmail.pt

### RESUMEN

El estudio estructural de las células cancerosas ha sido fundamental en el desarrollo de las metodologías de identificación y diagnóstico de diversos tipos de cáncer. Los avances en el conocimiento de la estructura de la membrana celular, aportan las bases para conocer los cambios fisiológicos asociados a algunos padecimientos cancerosos, logrando el establecimiento de una relación entre las condiciones fisiológicas y la estructura membranal. La microscopía de fuerza atómica (AFM), representa una herramienta nueva capaz de realizar análisis de la superficie de la membrana plasmática a nivel nanométrico, al generar imágenes de alta resolución en tres dimensiones, aportar información acerca de sus características mecánicas (fuerzas adhesión y atracción). En este estudio la superficie de membrana plasmática de células HeLa fue visualizada a través de imágenes de alta resolución con AFM. Partículas de 20nm y poros de 60nm fueron identificados exitosamente. Adicionalmente la medición de fuerzas de interacciones entre la punta de AFM y la superficie celular, muestra diferencias entre propiedades de sustrato. En el presente trabajo se desarrolló una nueva metodología para la medición y evaluación de propiedades mecánicas para la diferenciación de valores de fuerzas cuando la punta interactúa con las células o con el medio de cultivo. Por ejemplo la fuerza de adhesión entre punta y medio de cultivo es alrededor de dos veces mayor que la interacción punta-membrana celular. Estos resultados obtenidos son preliminares, dentro de un objetivo más complejo, dirigido a desarrollar una nueva metodología de identificación de composición (proteínas y lípidos) de la superficie de membrana a nivel nanométrico. La exposición de este trabajo revela a detalle los pasos de esta nueva metodología

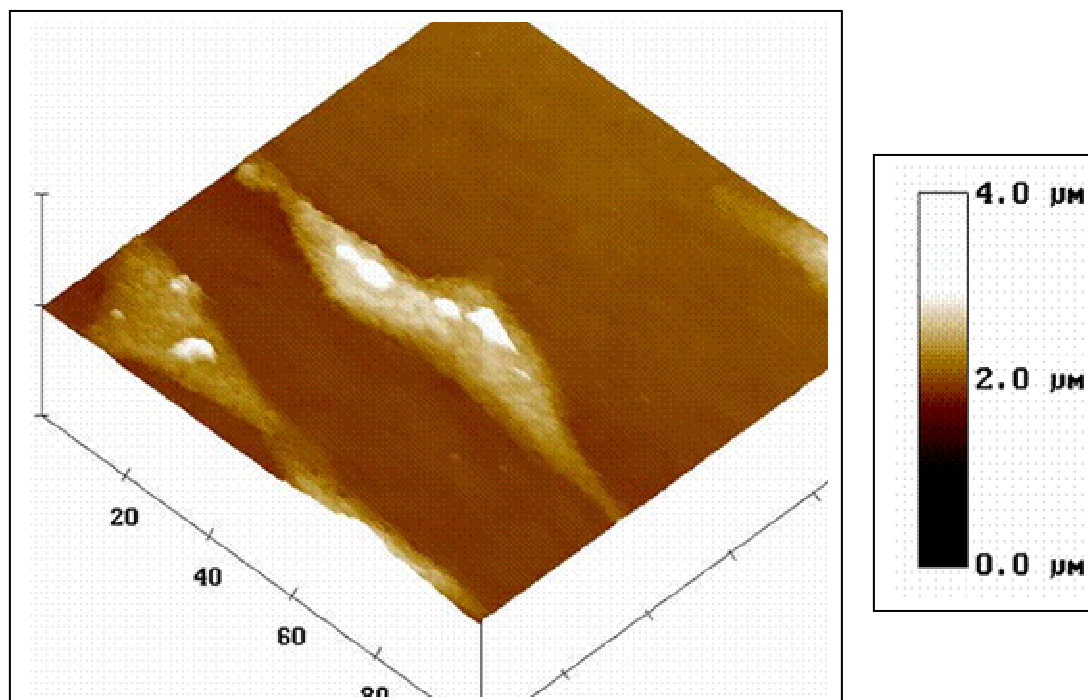
**Palabras clave:** Nanoestructura, Microscopía de Fuerza Atómica, curva de fuerza.

### RESUMEN EN EXTENSO

El estudio estructural de las células cancerosas ha sido fundamental en el desarrollo de las metodologías de identificación y diagnóstico de diversos tipos de cáncer. Los avances en el conocimiento de la estructura de la membrana celular, aportan las bases para conocer los cambios fisiológicos asociados a algunos padecimientos cancerosos, logrando el establecimiento de una relación entre las condiciones fisiológicas y la estructura membranal.

El AFM fue diseñado originalmente para el estudio de la topografía de superficies, produce un mapa, a partir de una serie de mediciones, tomadas en los planos cartesianos X, Y y Z a lo largo de la superficie, proporcionando una imagen tridimensional de

resolución manométrica de la superficie celular sin dañarla al momento del análisis (figura 1).



**Figura 1.** Perspectiva de una Imagen de altura (146.4 x 146.4  $\mu\text{m}$ ), a 45° y en 3D donde se contrasta la imagen gracias al ángulo de la imagen y de la presencia de altura, generado por el eje z.

Estas mediciones, muestran las diferencias más sutiles entre células sometidas a distintos tratamientos o con diferentes condiciones de crecimiento, pueden también realizarse mediciones de propiedades mecánicas (rigidez, plasticidad y viscoelasticidad) de la célula en comparación con otros sustratos mediante y así, en un futuro, se podrá conocer el papel de cada elemento del citoesqueleto.

El cálculo se realizó a partir de las curvas de fuerzas obtenidas por AFM, como resultados, se obtuvo un rango de las mediciones del sustrato empleado, el medio de cultivo y la superficie de la membrana celular, obteniendo los siguientes valores:

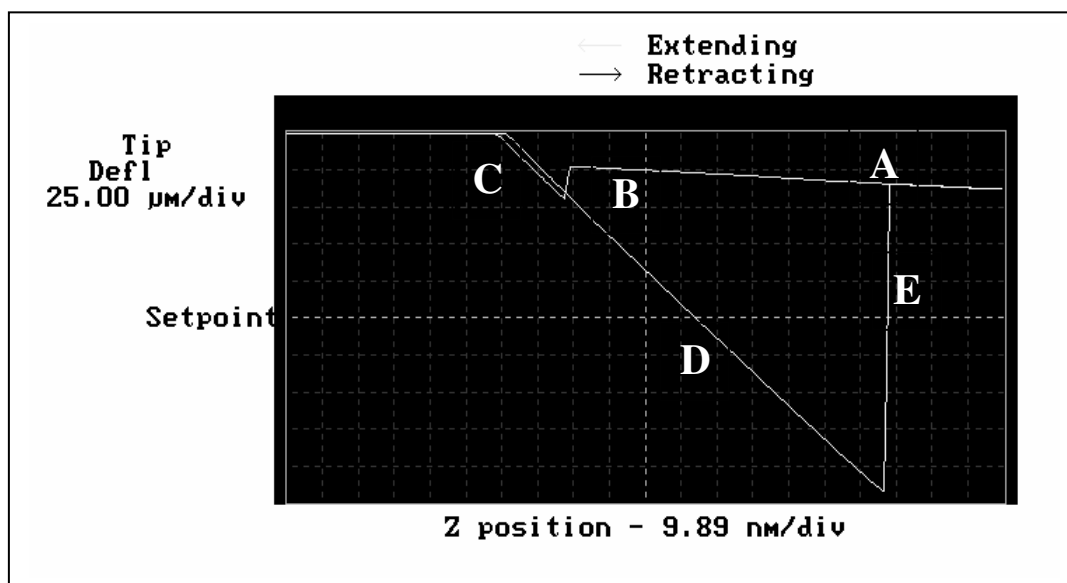
<b>COMPARACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS DEL SUSTRATO, EL MEDIO Y LA SUPERFICIE CELULAR</b>			
<b>FUERZAS</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Sustrato con medio de cultivo</b>	<b>Superficie de membrana celular</b>
<b>Atracción</b>	0.0075 nN	0.18-0.2 nN	0.0064 nN
<b>Adhesión</b>	0.17-0.2 nN	1-1.5 nN	0.64 nN

**Tabla 1.** Resultados de valores de fuerzas de atracción y adhesión en Au(111), medio de cultivo (MEM) y en la superficie celular.

Para la interpretación de curvas de fuerzas en modo contacto nos basamos en una curva de fuerza estándar, para identificar los procesos que ocurren durante cada etapa de la curva de fuerzas (Figura2).

- El piezoelectrónico se expande y la micropalanca se refleja hacia abajo.
- Por la presencia de fuerzas atractivas en la superficie se da el primer contacto de la punta con la superficie en este punto (atracción).
- Por la cercanía de la sonda con la superficie y por intervención de las fuerzas atractivas de la misma se mantiene el contacto.
- Las fuerzas entre la punta y la superficie comienzan a equilibrarse, el piezo presiona la punta y la micropalanca se flexiona hacia arriba y luego comienza a retractarse, ocasionando que la punta baje y al equilibrarse las fuerzas entre punta y superficie, la micropalanca se flexiona hacia abajo por la atracción de la superficie sobre la punta (adhesión).
- La fuerza de atracción de la punta con la superficie se rompe y regresa al punto de inicio, dejando a la micropalanca oscilar verticalmente.

Con esta metodología se calcularon dos tipos de fuerzas, fuerzas de atracción y fuerzas de adhesión. La fuerza de atracción corresponde al valor más bajo de la deflexión de la micropalanca, cuando el piezoelectrónico se expande, mientras que la fuerza de adhesión corresponde al valor más bajo de la deflexión, cuando el piezoelectrónico se retracta.



**Figura 2.** Curva de fuerza tipo obtenida en la medición de fuerzas de atracción y adhesión en la superficie de la membrana celular.

Las propiedades mecánicas de las superficies estudiadas, esta dada por las imágenes de fase y amplitud en conjunto con la medición de fuerzas de atracción y adhesión. En la medición de sus propiedades mecánicas, se obtuvieron los valores de fuerzas de atracción y adhesión, del sustrato de Au (111), el medio de cultivo (DMEM) y en la superficie de la membrana celular, donde se observó que las fuerzas presentes en la superficie de la membrana celular son 0.064 atracción y 0.64nN de adhesión, los valores de el medio de cultivo son de 0.18-0.2 atracción y 1-1.5nN de adhesión y los del sustrato son de 0.0075nN de atracción y 0.17-0.2nN de adhesión. Las fuerzas de atracción del sustrato con el medio de cultivo se presentaron un mayor valor, siendo seguido por el

sustrato de Au (111) y la superficie de la membrana celular. En los valores de atracción del sustrato y la superficie de membrana, se presenta una diferencia de 0.0011nN. En el caso de las fuerzas de adhesión, tenemos que el mayor valor corresponde al sustrato con medio de cultivo, seguido por los valores de la superficie de membrana celular y finalmente los valores del sustrato Au (111).

El desarrollo de esta nueva metodología para la medición y evaluación de propiedades mecánicas para la diferenciación de valores de fuerzas cuando la punta interacciona con las células o con el medio de cultivo, muestran que pueden ser ocupados a futuro como un parámetro de referencia para caracterización y análisis de composición de estructuras en la superficie de membrana celular (proteínas y lípidos) a nivel manométrico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Binning G., Quate C.F. y Gerber Ch., 1986, Atomic Force Microscopy, Physical Review Letters, 56(9):930-933.
2. Heaton M.G., Serry F.M., Scanning probe/Atomic force microscopy: Technology overview and update, Digital Instruments:Veeco
3. Hansma H.G., 1999, Varieties of imaging with scanning probe microscopes, Department of Physics, vol.96, 14678-14680
4. Hansma H.G., Hoh J.H., 1994, Biomolecular imaging with the atomic force microscope, Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct., Vol. 23, 115-139
5. Morris V.J., Kirby A.R. & Cuning A.P. 1999, Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press.
6. Petri P., Lehenkari, Guillaume T., Charras, Sphen A., Nesbitt y Mike A. Horton, (2000), New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells, Cambridge University Press, Cambridge
7. Sagvolden G., Giaever I., Pettersen E.O., and Feder J., 1999, Cell adhesion force microscopy, Biophysics, Vol. 96(2):471-476.