

Metodología para el Estudio de la Disolución de Cálculos Renales Usando Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Mario Alberto Ramírez¹, Miguel Cadena¹, Sergio Ureta² y Nikola Batina³

¹ Universidad Autónoma Metropolitana / Departamento de Ingeniería Eléctrica, Centro de Investigación en Instrumentación e Imagenología Médica, México D.F., México

² Hospital Español / Servicio de Urología, México D.F., México

³ Universidad Autónoma Metropolitana / Departamento de Química, Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, México D.F., México

Abstract— Formation and dissolution of kidney stones is an important medical subject, not completely understood yet. Surgery and lithotripsy techniques, nowadays solutions are still expensive and aggressive with important limitations. The aim of this study is to develop a new methodology to evaluate efficiency of different drugs treatment upon renal stone dissolution process, at nanometric scale. The main idea is to visualize (monitoring) the dissolution processes of the renal stones surface during the different substance treatment, including some commercial medical drugs. AFM as nanotechnology technique was used to monitor dissolution at the nanometric level. Here, in this work, we show how to prepare samples for the AFM study and how to record changes in the surface topography during the stone dissolution. The preliminary results, images obtained by using commercial drug Allopurinol, show significant surface layer alternation (the renal stone destruction), which was characterized in the qualitative and quantitative way, in great details.

Palabras claves— Disolución, cálculo renal, AFM, nanotecnología.

I. INTRODUCCIÓN

Un cálculo renal se puede formar en el interior de un riñón cuando la orina está muy concentrada con algunas sales inorgánicas, como oxalatos y carbonatos de calcio (principales componentes de los cálculos renales), o sustancias orgánicas, como ácido úrico [1].

La Medicina actual ha utilizado técnicas de nanotecnología para entender el proceso de biomineralización de los cálculos renales y encontrar sustancias que ayuden a desintegrarlos con el propósito de evitar cirugías y el uso de litotricias. Las primeras significan un riesgo inherente de perder la función renal y las segundas implican una alta probabilidad de requerir dos o más tratamientos de litotricia, con los altos costos asociados a la técnica y sin ofrecer una garantía como tratamiento resolutivo al paciente [2]. Así, estudiar y comprender procesos alternos de disolución de los cálculos con métodos bioquímicos es de un alto interés en la industria

farmacéutica para encontrar tratamientos que sean efectivos y no invasivos para la litiasis renal.

Una manera de hacerlo es caracterizando la composición y estructura superficial de los cálculos renales para observar su transformación conforme se utilizan diferentes sustancias que tengan un alto potencial para la disolución de los cálculos.

Actualmente existe capacidad para estudiar la topografía y estructura superficial a nivel molecular de diferentes materiales usando técnicas de nanotecnología basadas en la microscopía de fuerza atómica (AFM) [3-6]. Sin embargo, el estudio de superficies de materiales biológicos utilizando AFM es reciente ofreciendo nuevas posibilidades poco exploradas como es el caso del estudio de la topología y estructura de los cálculos renales [5,6].

Así el propósito de este trabajo es desarrollar una técnica innovadora para el estudio de las estructuras de superficies de cálculos renales mediante AFM [5,6]. La metodología incluye: (a) un proceso para la preparación de una muestra del cálculo renal, (b) la manera eficiente en el manejo del microscopio AFM. Particularmente para el estudio de una muestra muy rugosa como es el caso de las superficies de cálculos renales y (c) una forma de medir el efecto sobre la superficie de un cálculo, cuando se utilizan diferentes sustancias y que por hipótesis afectan las características de superficie del cálculo, aplicando diferentes tiempos de exposición a las mismas; este análisis se muestra en el capítulo de resultados.

II. METODOLOGÍA DESARROLLADA

A. Preparación de una muestra

Un cálculo renal fue extraído quirúrgicamente de un paciente tratado por el servicio de Urología del Hospital Español en la Ciudad de México. Para preparar la muestra y poderla someter a la técnica de microscopía de fuerza atómica (debido a las especificaciones del microscopio), se cortó un pedazo del cálculo extraído a manera de rebanada (dimensiones aproximadas 5.6 x 2.4 x 2 mm), se montó en

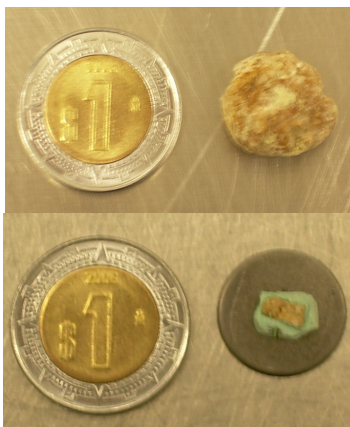


Fig. 1 Fotografías: arriba, un cálculo renal; abajo, una muestra del cálculo montada para su estudio en AFM. Ambas imágenes muestran la comparación con una moneda de 1 peso mexicano.

resina epóxica dejando libre la superficie externa del cálculo y se colocó en un disco porta-muestras del microscopio AFM. La figura 1 muestra el tamaño relativo de un cálculo renal y el tamaño de la muestra ya fijada por la resina epóxica (las dimensiones son relativas a un peso mexicano con un diámetro de 20 mm). Es importante resaltar que la superficie de la muestra no fue pulida (alterada), con la finalidad de evitar modificar de alguna manera su superficie durante su preparación; a diferencia a otros estudios realizados anteriormente, donde la superficie de los cálculos se pulió para obtener una superficie plana [5,6].

B. Obtención de imágenes de la superficie de un cálculo renal usando microscopía AFM

Se utilizó el microscopio Nanoscope IV, AFM (DI, USA), para obtener imágenes de la superficie del cálculo renal; sin tratamiento, y después de haberse expuesto en diferentes tiempos a una solución de un medicamento comercial usado contra la litiasis renal (generación de cálculos renales) que tiene como sustancia activa el Alopurinol [7]. La microscopía AFM se aplicó en modo intermitente (*tapping mode*) y las imágenes obtenidas son de una superficie de aproximadamente $1\mu\text{m}^2$. Estas imágenes se muestran en el siguiente capítulo.

El tratamiento no fue aplicado mientras la muestra estuviera en el microscopio, pero utilizando un sistema de video de alta resolución, se tomaron fotografías de $540 \times 400\mu\text{m}$ (ver figura 2) para marcar la zona de la superficie que sería estudiada y la ubicación del soporte que sujeta la punta del microscopio AFM sobre la muestra, y en base a esas fotografías poder posicionar la punta sobre la misma zona del cálculo renal después de cada aplicación del medicamento.

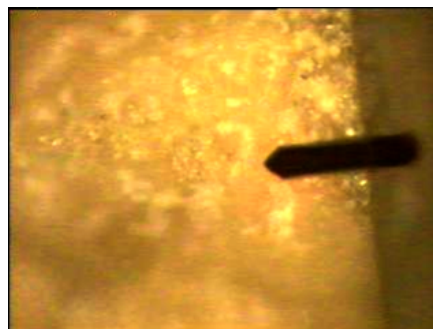


Fig. 2 Fotografía de la superficie del cálculo renal con la punta de AFM (Tamaño: $540 \times 400\mu\text{m}$) que muestra la zona de la superficie que será estudiada.

III. RESULTADOS

Al aplicar la nueva metodología propuesta para el estudio de la superficie de un cálculo renal se obtuvieron de manera simultánea imágenes de altura y de fase con el microscopio AFM. La imagen de altura nos muestra la topografía de la superficie. La imagen de fase nos indica diferencias en la dureza del material que la compone, con respecto a los cambios en la composición química.

Las imágenes de altura (figuras 3, 4 y 5), se presentan en este trabajo de manera tridimensional mostrando superficies de aproximadamente $1\mu\text{m}^2$ y con la escala de altura fijada en 500nm. La figura 3, muestra la topografía superficial del cálculo sin haberle aplicado algún tratamiento. Después de obtener esta imagen, se sumergió la muestra en una solución de $3 \times 10^{-3}\text{M}$ de Alopurinol durante 1hr 20min y se obtuvo la imagen de la figura 4. El efecto en la topografía de exponer

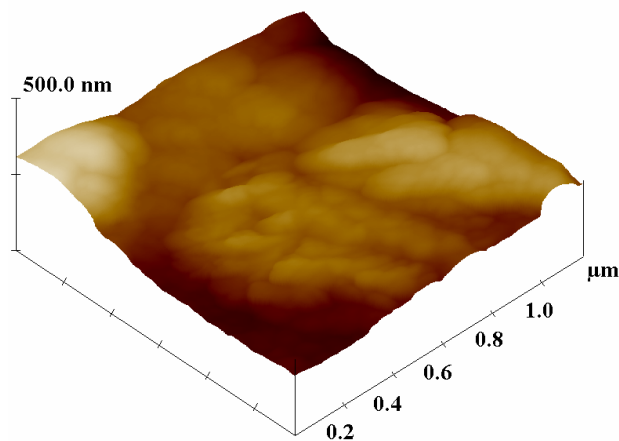


Fig. 3 Imagen de altura 3D de AFM con resolución nanométrica, de la superficie del cálculo renal antes del tratamiento con Alopurinol.

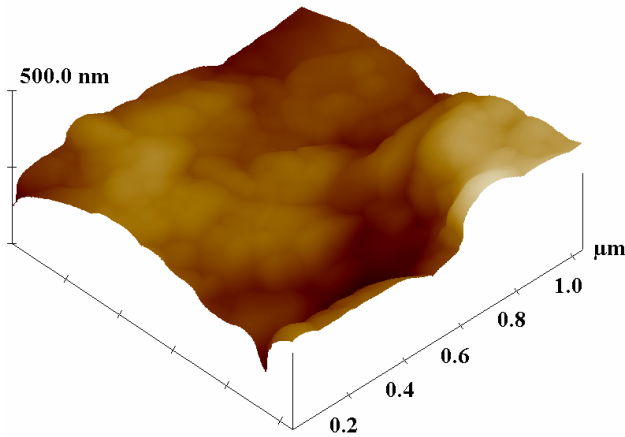


Fig. 4 Imagen de altura 3D de AFM con resolución nanométrica, de la superficie del cálculo renal (misma zona que en Fig. 3) después de 1hr 20min de tratamiento con Alopurinol.

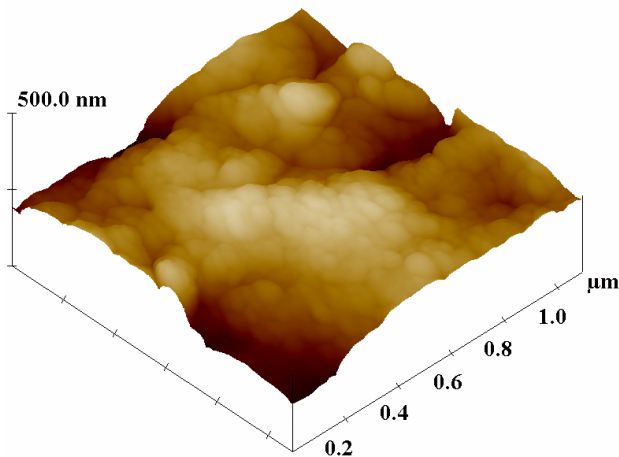


Fig. 5 Imagen de altura 3D de AFM con resolución nanométrica, de la superficie del cálculo renal (misma zona que en Fig. 3) después de 64hrs de tratamiento con Alopurinol.

el cálculo durante 64hrs a la solución con el medicamento se observa en la figura 5.

En base a las imágenes de altura, se realizó un análisis cuantitativo, sobre los cambios en la rugosidad de la superficie (tabla 1). Estos datos se calcularon con el software de análisis de imágenes del Nanoscope IV. El parámetro RMS (Rq), representa la rugosidad de la muestra, y es la raíz media cuadrática del promedio de los valores de altura de los diferentes elementos que componen la superficie. Se puede ver que el valor RMS (Rq) aumentó al aplicar el medicamento por un periodo relativamente corto y

Tabla 1 Resultados de análisis de rugosidad de la superficie del cálculo renal y diámetro de partículas.

Tiempo de aplicación del tratamiento con Alopurinol al cálculo renal.	Rms (Rq) (nm)	Rmax (nm)	Intervalo de diámetros del mayor número de partículas (nm)
Sin tratamiento	62.291	335.68	40 – 100
1hr 20min	97.743	655.41	35 – 100
64 hrs	56.364	306.52	13 – 50

que al paso del tiempo ese valor disminuyó. El parámetro Rmax es la altura máxima que se presenta entre dos elementos de la imagen; y el efecto en este parámetro fue similar al sucedido con el valor. RMS (Rq).

Gracias a los datos obtenidos para la rugosidad, se cree que el primer efecto de la sustancia utilizada, es la generación de hoyos profundos en la superficie del cálculo; y al pasar el tiempo de exposición, la sustancia aplanar y fragmenta las partículas con las que tiene contacto.

Las imágenes de fase se muestran en las figuras 6, 7 y 8, correspondientes a la superficie sin tratamiento y con aplicación de la sustancia durante 1hr 20min y 64hrs; respectivamente.

Estas imágenes, ayudan a identificar la morfología de las partículas que conforman el cálculo estudiado. En las figuras 6 y 7, los diámetros del mayor número de partículas oscilan entre 35 y 100nm; pero en la figura 8 (después de 64hrs de tratamiento) el mayor número de partículas tienen un diámetro entre 13 y 50nm. Esto apoya la creencia de que a mayor tiempo de exposición a la sustancia, las partículas

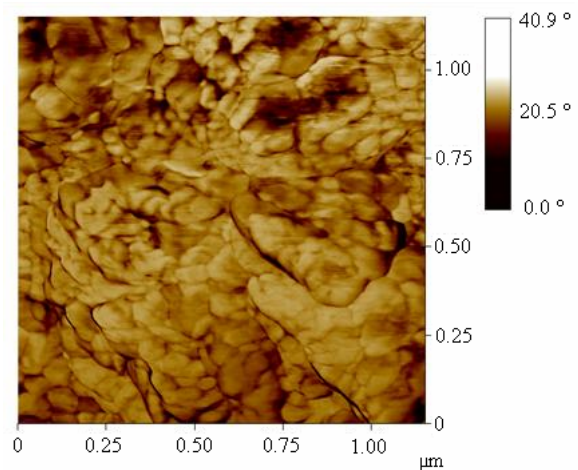


Fig. 6 Imagen de fase de AFM de la superficie del cálculo renal (obtenida simultáneamente con la imagen de la figura 3), antes del tratamiento con Alopurinol.

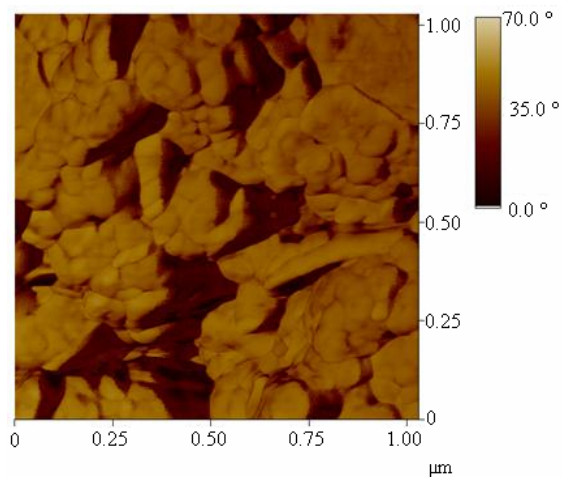


Fig. 7 Imagen de fase de AFM de la superficie del cálculo renal (obtenida simultáneamente con la imagen de la figura 4), después de 1hr y 20min de tratamiento con Alopurinol.

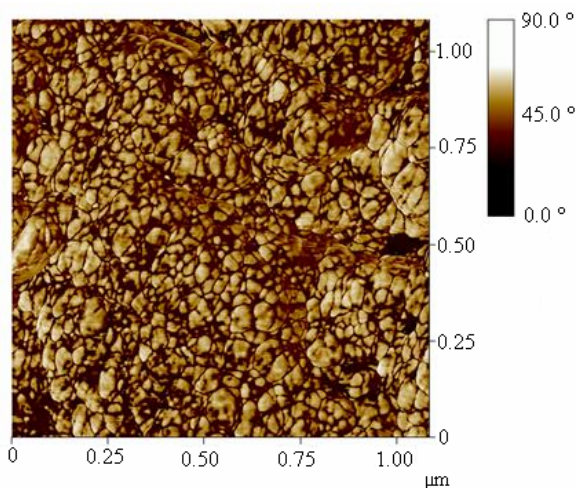


Fig. 8 Imagen de fase de AFM de la superficie del cálculo renal (obtenida simultáneamente con la imagen de la figura 5), después de 64hrs de tratamiento con Alopurinol.

que forman la superficie del cálculo renal se fragmentan y sufren un proceso de disolución.

IV. CONCLUSIONES

Esta nueva metodología desarrollada en nuestro laboratorio, es válida para el estudio de los primeros efectos de disolución que diferentes sustancias provocan en los cálculos renales, gracias a la alta sensibilidad, la resolución nanométrica y las imágenes en tres dimensiones que se obtienen con el microscopio de fuerza atómica.

Usando esta metodología de manera directa, se puede concluir la eficiencia del Alopurinol para el tratamiento de este cálculo renal en particular. Sin embargo, durante este período preliminar, concluimos, que se necesitará tener un mayor número de muestras, probar diferentes concentraciones y realizar los experimentos *in vitro*, para obtener conclusiones de manera generalizada sobre la efectividad del medicamento.

De esta manera nuestro trabajo, tiene el potencial para convertirse en una metodología para evaluar los efectos y la eficiencia de sustancias (incluyendo medicamentos) usados para el tratamiento de piedras renales a nivel molecular y atómico; y al mismo tiempo, analizar el proceso de disolución de cálculos renales.

Creemos que estos resultados ayudarán a plantear nuevos tratamientos para la litiasis renal e incluso evitar la recurrencia que algunos pacientes presentan frente a esta enfermedad.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la beca de estudios de maestría al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

REFERENCIAS

1. Erich Königsberger, LanChi Königsberger (2006) *Biom mineralization: Medical Aspects of Solubility*. John Wiley & Sons, Australia.
2. David M. Charytan et al. Enciclopedia médica en español en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/encyclopedia.html>
3. Yip, C. M.; DeFelippis, M. R.; Frank, B. H.; Brader, M.L.; Ward, M. D. (1998) Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by atomic force microscopy: Evidence of hydrophobically driven assembly. *Biophysical Journal* 75:1172-1179.
4. Jung T., Sheng X., Choi C. K., Kim W., Wesson J. A., Ward, M. D. (2004) Probing crystallization of calcium oxalate monohydrate and the role of macromolecule additives with in situ atomic force microscopy. *Langmuir*. 20:8587-8596.
5. H. H. Dorian, P. Rez, G. W. Drach (1996) Evidence for aggregation in oxalate stone formation: Atomic force and low voltage scanning electron microscopy. *The Journal of Urology*. 156:1833-1837.
6. P. Rez, H. Fong, M. Sarikaya (2002) *Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy of the Ring Structures in Human Calcium Oxalate Urinary Stones*, Microscopy and Microanalysis, Quebec City, Canada, 2002, pp 4-8.
7. Emilio Rosenstein. Diccionario de especialidades farmacéuticas. En http://www.elocal.gob.mx/wb2/ELOCAL/ELOC_Diccionario_de_Especialidades_Farmacéuticas.

Autor: Mario Alberto Ramírez Baeza
 Instituto: Universidad Autónoma Metropolitana
 Dirección: Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa.
 C.P.: 09340
 Ciudad: México, D.F.
 País: México
 E-mail: ib_marb@yahoo.com.mx