



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**NANOBIOLOGÍA CELULAR:
VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS
POR MEDIO DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ERNESTO VILLALOBOS NÁJERA



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

**TUTOR:
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Villalobos
Nájera
Ernesto
56 88 41 88
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
0-6912306-5
2. Datos del Tutor
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Lourdes Teresa
Agredano
Moreno
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Blanca Margarita
Bazán
Perkins
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Georgina
Álvarez
Fernández
7. Datos del trabajo escrito
Nanobiología Celular: visualización de células sanguíneas
por medio de microscopía de fuerza atómica
45 p
2009.

A María de Jesús Nájera, que no solo me diste la vida, sino que me colocaste en la senda del saber.

A Santiago Villalobos Pérez, porque sembraste en mi la inquietud y la necesidad de saber.

A Georgina, aliada y amiga, compañera de aventura en el camino de nuestra vida.

A Rebeca, sol y torbellino de mi existencia.

A Sandra, que es como un don y regalo que irrumpió en mi vida.

A Hugo y Laura, tan inseparables, a su pesar, y tan necesarios para mi.

A Tere y Aníbal, amigos y compañeros en este camino claroscuro de retos y satisfacciones.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Nanobiología Celular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dra. María de Lourdes Segura Valdez, con el apoyo del proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT IN206307.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por introducirme en este campo de conocimiento, otorgándome todo su apoyo y asistencia de forma incondicional y generosa .

A la Dra María de Lourdes Segura Valdez por su paciente y sostenida asistencia al acceso a esta tecnología y al trabajo del laboratorio que hicieron posible la obtención de resultados.

A la Dra. Georgina Álvarez Fernández por su constante apoyo en la discusión de los temas y cuyas sugerencias y correcciones fueron fundamentales para el trabajo

A los miembros del jurado:

Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno
Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dra. María de Lourdes Segura Valdez
Dra. Georgina Álvarez Fernández

por su cuidadosa revisión que se tradujo en una aportación de gran valor para el mejoramiento del trabajo.

A Cristian Ordoñez Santiago por su valiosa aportación técnica para la implementación de las figuras con cuadrícula milimétrica.

A Saúl Villalobos Nájera por sus atinadas sugerencias y asistencia en el manejo de imágenes.

A Sandra Villalobos Nájera por su asistencia técnica en la elaboración de imágenes y corrección final del manuscrito.

A la Maestra Teresa Wuest Silva por su persistente insistencia, a tiempo y a destiempo por impulsar la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Agradecimientos	5
I. Resumen	7
II. Introducción	8
1. La constitución de la observación científica	8
2. Microscopía y nanotecnología	9
3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	11
4. Nanobiología	12
5. AFM. Biofísica y bioquímica de la célula	13
III. Justificación del trabajo	15
IV. Objetivos	18
V. Material y Métodos	19
VI. Resultados	21
VII. Discusión	33
VIII. Conclusiones	41
IX. Bibliografía	42

I. RESUMEN

La utilización de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en el campo de la biología y la medicina, aunque incipiente muestra grandes avances. Se han estudiado varias alteraciones en la morfología estructural de leucocitos y eritrocitos, como indicadores de diversas patologías, lo que muestra la importancia de los estudios de la morfología estructural de las células realizados mediante la AFM.

En este trabajo se analizan las configuraciones estructurales tridimensionales y de perfil, de leucocitos y eritrocitos de sangre humana, destacando sus relieves topográficos obtenidos con AFM, en comparación con las imágenes de microscopía óptica y electrónica. Los resultados muestran además del contraste entre ambas observaciones, los detalles topográficos a escala nanométrica de las superficies celulares, así como del núcleo de los leucocitos. Se presentan perfiles gráficos de la topografía celular, que permiten efectuar análisis cuantitativos a escala nanométrica y se plantea su posible utilidad para caracterizar diferentes tipos celulares, así como para establecer la relación entre la topografía nuclear y las condensaciones cromatínicas. Se corrobora la utilidad de la AFM como una herramienta que ofrece grandes posibilidades en la correlación de algunos procesos celulares con parámetros cuantitativos indicados por los gráficos en distintas escalas nanométricas.

Palabras clave : Microscopía de Fuerza Atómica, nanobiología celular, células sanguíneas, eritrocitos, leucocitos, observación científica

II INTRODUCCIÓN

1. La constitución de la observación científica

Observar en ciencia es un proceso de indagación constructiva, no es solo el hecho de ver un objeto (“algo que está ahí”). Es el estudio del objeto que de antemano ha sido configurado, constituido desde una matriz teórica, propia de una disciplina científica particular. Lo “observado”, es producto de un proceso complejo que resulta de las interacciones entre lo conceptual y un segmento o un recorte de lo “real”, que “aparece” mediante un proceso de observación instrumental (Fourez, 1994).

La observación en las ciencias naturales es por naturaleza instrumental, es decir involucra la mediación de instrumentos para su realización. Esta metodología y tecnología del instrumento consisten en el diseño e implementación de herramientas y técnicas que permiten acotar, seleccionar o destacar ciertos aspectos o “cualidades” de la materia, de acuerdo con los referentes teóricos de la disciplina a la que pertenece el campo de estudio (Agazzi, 1998), de tal suerte que “el objeto observado” es producto de un proceso de interacciones constructivas. La utilización de instrumentos de observación es inherente al desarrollo de las ciencias naturales y ha hecho posible, no sólo la existencia misma de la práctica científica, sino incluso la creación de nuevos campos de investigación que de otro modo serían inaccesibles. Es por ello que la implementación de técnicas instrumentales derivadas de proyectos y perspectivas teóricas específicas, suele impulsar la innovación tecnológica y la gestación de nuevos campos de estudio.

Sin embargo, estas consideraciones no parecen muy claras en el ámbito de la microscopía; particularmente en el de la óptica. La observación microscópica puede generar la impresión de que los objetos “vistos” simplemente “están ahí”, es decir, que son percibidos directamente, sin tomar en cuenta que nuestra mirada es resultado de un conjunto de presupuestos previos, a partir de los cuáles identificamos los objetos que nos muestra el instrumento. Dichos presupuestos son el resultado de diversas concepciones teóricas, construídas a lo largo del tiempo. En el curso de su historia, las disciplinas científicas han llevado a cabo un trabajo constante de contrastación entre diversas prácticas experimentales e instrumentales. Esto ha generado nuevas conceptualizaciones sobre la observación que permiten, a su vez, justificar los distintos planteamientos teóricos, en un ciclo de retroalimentación entre la teoría y la práctica científica.

2. Microscopía y nanotecnología

Después de la aparición de la microscopía óptica (1590), el surgimiento de la microscopía electrónica (ME) en la década de los años 1930, revolucionó la capacidad de la observación microscópica, permitiendo un acercamiento de 10^6 veces mayor a los objetos de estudio.

Una tercera revolución parece iniciarse con la aparición reciente en el campo de la nanociencia, de nuevas tecnologías de observación microscópica como la microscopía de sonda de rastreo (SPM: Scanning Probe Microscopy), que ha

transformado de manera radical la forma de aproximarse al estudio de la materia a escala nanométrica.

Estas nuevas formas de observación que aparecieron a principios de la década de los años 80 s, han generado un cambio radical en las tecnologías microscópicas, ya que sin lentes, fotones o electrones, este nuevo tipo de microscopía, examina las estructuras de las superficies de las muestras mediante un barrido con una sonda de tamaño nanométrico (en Braga y Ricci, 2004). En el campo de la nanociencia, que estudia la materia a escala molecular y atómica, esta tecnología instrumental ha sido muy fecunda, sobre todo en la ciencia de los materiales.

Lo anterior ha contribuido a gestar una nueva perspectiva para considerar y abordar el estudio de la materia, con muy diversas aplicaciones técnicas que han aportado enormes recursos a la nanotecnología.

En la microscopía SPM, las muestras a observar, son rastreadas o barridas por una sonda en forma de punta de un espesor nanométrico. En este proceso de barrido las interacciones entre las superficies y la punta son monitoreadas, teniendo como resultado la conformación de imágenes tridimensionales en las que se registran con gran precisión los relieves topográficos de las superficies de las muestras.

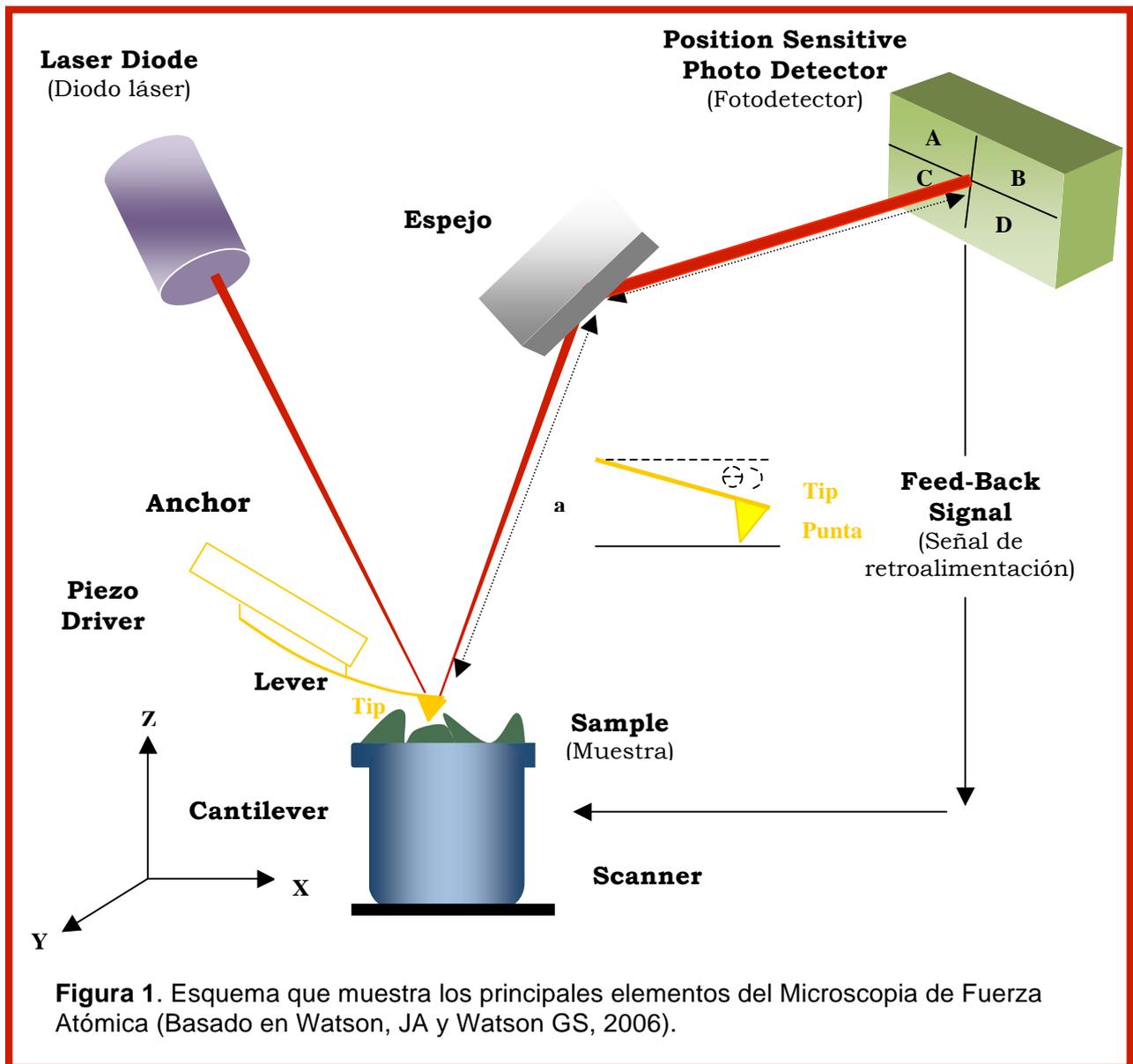
Dos formas principales de esta tecnología son la microscopía de efecto túnel (STM), desarrollada por Binnig y Rohrer de la IBM en Suiza en 1981 (premio Nobel de Física en 1986) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) por Binnig y colaboradores en 1986 (Binnig et al 1986).

3. Microscopía de Fuerza Atómica.

Este tipo de microscopía SPM se puede realizar con varios tipos de muestras, incluso con aquellas de material no conductor o aislante. La punta de barrido, de unos nanómetros de diámetro, está localizada al final de una barra o cantilever de un poco más de un centenar de micras de largo. La punta barre la superficie de la muestra de diferentes modos o formas de acercamiento o de contacto intermitente o no, detectando, con diversos grados de precisión, la topografía del material en cuestión (Braga y Ricci, 2004).

En el modo de contacto, la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra y las peculiaridades topográficas de la superficie son detectadas por las presiones de las fuerzas que se producen sobre la punta que flexionan a la barra o cantilever. La deflexión del cantilever en cada punto es detectada por el sistema de la AFM generando un mapa de relieve del área de la muestra bajo observación (Figura 1).

Esta técnica permite no solo apreciar las formas tridimensionales del material observado, sino que puede destacar los relieves verticales a escala nanométrica, poniendo así de manifiesto con gran detalle y precisión las estructuras de distintos materiales. Uno de los aspectos más relevantes ha sido sin duda la posibilidad de manipular el material a escalas moleculares y atómicas, lo que contribuye de manera considerable a la implementación de nanotécnicas (Howland y Benatar, 2000).



4. Nanobiología

La aplicación de estas tecnologías al campo de la biología es incipiente y, sin embargo, sus resultados han sido significativos y prometedores (Horber y Miles, 2008).

La AFM hace posible la obtención de imágenes topográficas de las células de diferentes tejidos con gran precisión, lo que permite no solo complementar y corroborar las observaciones conocidas por otras técnicas microscópicas, sino que muestra aspectos y detalles del material viviente en escalas de enorme precisión, incluso nanométricas.

Se pueden efectuar reconocimientos tridimensionales de las estructuras celulares, destacando los relieves verticales *in situ*, en condiciones ambientales.

El hecho de mirar las imágenes celulares *in vivo* sin depender estrechamente de las técnicas de fijación y tinción, permite una aproximación a la dinámica de los procesos celulares pudiendo explorar sus propiedades tanto mecánicas como electromagnéticas (Braga y Ricci, 2004), lo que contrasta con las observaciones celulares tradicionales efectuadas en material inerte, como es el caso de la microscopía electrónica.

Estas tecnologías representan para las ciencias biológicas no solo una nueva forma de observar, sino que introducen una manera distinta de apreciar y abordar experimentalmente la materia viva a escala microscópica generando así nuevos campos disciplinarios como el de la nanobiología.

5. AFM. La Biofísica y la Bioquímica de la Célula

Las aplicaciones de la AFM en los estudios celulares son cada vez más relevantes. Se han podido obtener imágenes de células vivas en un medio de cultivo líquido, permitiendo la observación tridimensional del movimiento celular con alta

resolución, lo cual puede ser de gran utilidad para investigar el movimiento de las células en relación con elementos subcelulares como por ejemplo, el citoesqueleto (Ushiki, 2001).

La AFM también ha aportado nuevos datos en el estudio estructural de diferentes tipos celulares como son los fibroblastos (Bushell et al., 1999), las neuronas (Ricci et al., 2004) y los espermatozoides humanos (Joshi et al, 2000), entre otros, sin que sea necesaria la inclusión, tinción o congelamiento de las muestras.

La contribución de esta nueva tecnología en la investigación de la estructura del DNA (Hansma, 2001), el RNA (Ushiki et al, 1996), los complejos ácidos nucleicos-proteínas o los receptores-ligandos (Miklaszewska et al., 2004), así como el análisis *in situ* de estructuras intracelulares como el núcleo (Jiménez-García y Segura-Valdez, 2004) no han sido menos importantes.

Asimismo, es posible monitorear las interacciones de diferentes fármacos con las células y los tejidos, para visualizar cambios en la estructura molecular de las proteínas y otros componentes celulares (Miklaszewska et al., 2004).

Es así que la AFM está desempeñando un papel fundamental en los estudios de los procesos moleculares de la célula. En el campo de la bioquímica se han desarrollado métodos para investigar las interacciones entre las biomoléculas, del tipo enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo entre otras (Weisenhorn et al., 1990). También se han estudiado los procesos biofísicos de cristalización o coagulación en tejido sanguíneo (Wu et al., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El surgimiento en el campo de la nanotecnología de este nuevo instrumental microscópico ha constituido sin duda una manera de analizar el material biológico, que no solo refuerza y apoya a las otras tecnologías de observación, sino que es un tipo de análisis de las estructuras microbiológicas en las que estas revelan o manifiestan peculiaridades y aspectos que resultan imprescindibles para estudios y diagnósticos en diferentes campos de la biología y la biomedicina.

En el caso de los componentes celulares del tejido sanguíneo, la AFM se está constituyendo en una herramienta cada vez más importante.

En particular, la aplicación de la AFM a estudios de biofísica celular realizados en células sanguíneas, así como el análisis de las configuraciones de las estructuras morfológicas de las mismas, entre otros, ha resultado ser de gran utilidad, ya que ha permitido caracterizar algunas de las alteraciones o modificaciones en la morfología de las células como indicadores de determinados procesos fisiológicos o patológicos.

Está bien establecido que el tamaño y la forma de las células rojas humanas son indicadores importantes de su funcionamiento normal. La AFM permite evaluar con gran precisión parámetros como el espesor, la altura, la superficie y el volumen de los eritrocitos, lo que tiene gran importancia en los procedimientos de análisis hematológicos, ya que permite obtener, en una sola prueba, los datos necesarios en lo referente al tamaño y la forma de los mismos para la valoración de la salud del individuo (O'Reilly et al., 2001).

La AFM también ha permitido observar diferencias en la rigidez de los hematíes provenientes de pacientes normales y de pacientes con hipertensión, diabetes y trastornos coronarios, mostrando que puede ser una herramienta de gran utilidad como método diagnóstico de rutina para el análisis de diferentes estados fisiológicos y patológicos de las células rojas (Lekka et al., 2005).

Del mismo modo, se han caracterizado cuantitativamente por medio de la AFM alteraciones morfológicas inducidas en los eritrocitos sometidos a agentes exógenos como ciertos fosfolípidos, medios de fuerza iónica baja y drogas. La comparación entre los cambios inducidos artificialmente en las células rojas y las modificaciones observadas con más frecuencia en diversas patologías asociadas a estas células, podría representar una nueva estrategia para describir y comprender mejor las modificaciones bioquímicas y/o mecánicas responsables de diferentes patologías (Girasole et al., 2001).

Chen y Cai (2006) han puesto en evidencia la utilidad de esta técnica en el campo de la medicina forense al demostrar que es posible estimar el tiempo transcurrido desde la muerte de un individuo, analizando los cambios que sufren las células rojas en su forma y en la ultraestructura de su membrana celular después de la muerte.

En el caso de las células blancas, estudios realizados con AFM específicamente en los leucocitos, han permitido establecer una relación cuantitativa entre algunas propiedades biofísicas de las superficies celulares y las deformaciones generadas en estas células por la leucemia (Rosenbluth et al., 2006).

También ha sido posible analizar los cambios estructurales sufridos por diferentes células blancas en muestras de sangre periférica de pacientes afectados por malaria falciparum aguda, antes y después del tratamiento con cloroquina, demostrando que puede ser una herramienta muy útil en el seguimiento de enfermedades infecciosas (el-Shoura, 1993).

Otros estudios en los que se utilizó la AFM para analizar la superficie de linfocitos procesados para histoquímica, empleando lectinas biotiniladas y oro coloidal, mostraron que esta herramienta permite un análisis de alta resolución, aportando información adicional a la obtenida con técnicas de ME (Sakaue y Taniguchi, 2001).

Las células blancas como los leucocitos se reconocen entre otras características por el tipo de núcleo. Se requiere abordar de una manera más amplia las configuraciones de las células rojas y blancas mostradas por la AFM en contraste con las observadas con microscopía óptica y electrónica para que puedan ser utilizadas como referentes amplios para la caracterización de las estructuras de las superficies y relieves topográficos de las células del tejido sanguíneo.

Por lo tanto, este trabajo se propone corroborar la importancia de esta nueva perspectiva que ha abierto la tecnología observacional de la AFM en el campo de la biología, además de establecer su posible utilidad en el reconocimiento y análisis tanto tridimensional como de perfil de la morfología nuclear y citoplasmática de las células blancas a escalas nanométricas. Esto último, podría aportar un parámetro adicional a los ya conocidos que pueda ser evaluado de manera rápida y precisa.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Observar células sanguíneas en frotis mediante la AFM, analizando las superficies celulares, nucleares y citoplasmáticas en su configuración tridimensional y topológica, atendiendo a una posible caracterización nanométrica y plantear su utilización en el análisis clínico de las células sanguíneas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Evaluar las configuraciones tridimensionales de leucocitos y eritrocitos.
- 2) Analizar las superficies nucleares y citoplasmáticas del linfocito en sus aspectos tridimensionales y de perfil destacando su topología nanométrica.
- 3) Plantear la importancia de algunos aspectos de la caracterización nanométrica de los perfiles tridimensionales y gráficos para la constitución de un parámetro adicional de identificación de las células sanguíneas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

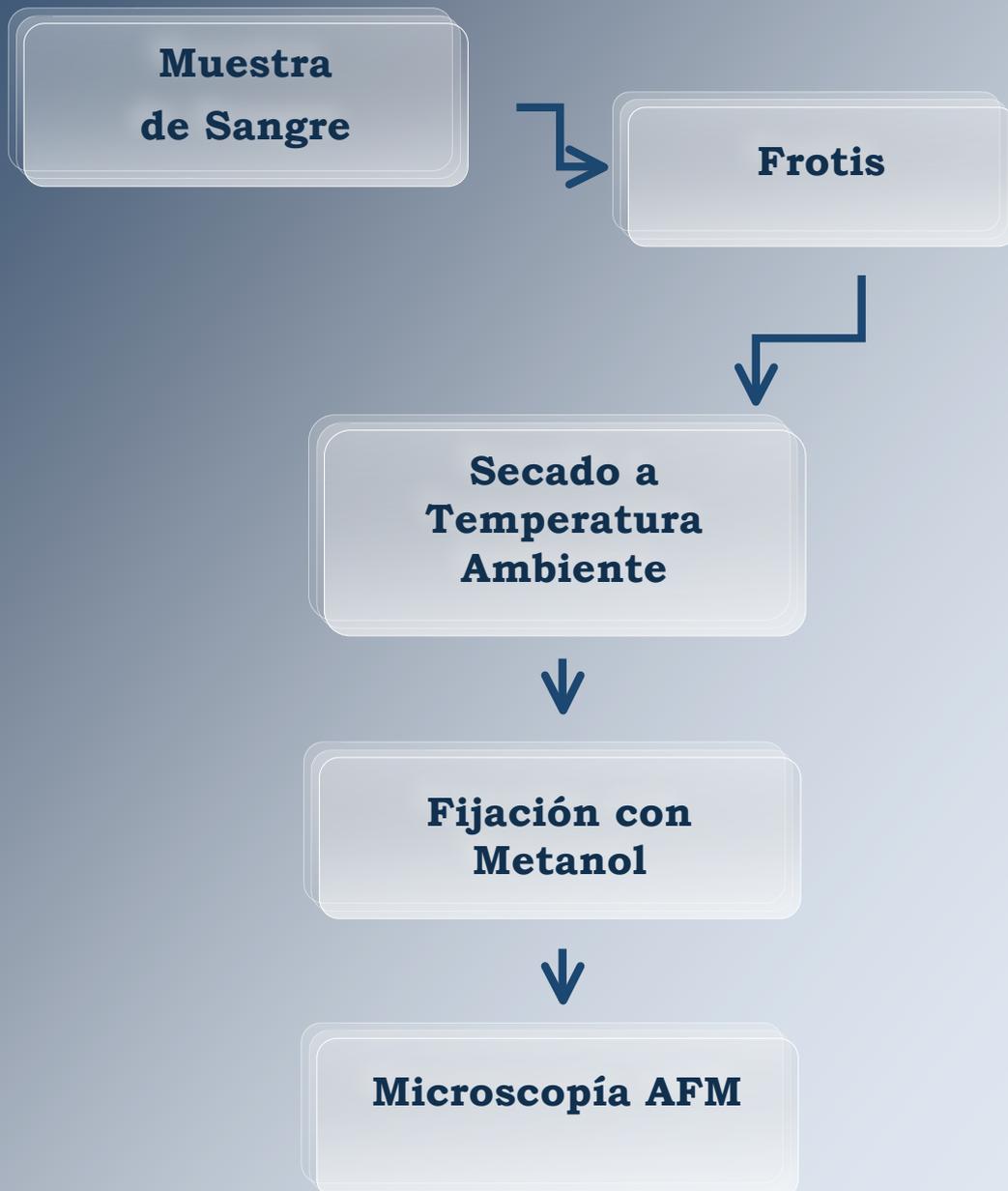
Se efectuaron frotis de sangre humana, que se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con metanol durante 3 minutos.

Microscopía de fuerza atómica

Se observaron, sin teñir, con un microscopio de fuerza atómica modelo BioScope (Digital Instruments, Santa Bárbara CA, USA). Se utilizó el modo de contacto con el controlador Nanoscope IIIa.

El AFM opera sobre un microscopio de luz invertido que permite localizar en el portaobjetos el área de observación. Se hicieron barridos en áreas rectangulares de 39.08, 21.72 y 13.06 nanómetros por lado con nanopuntas de silicio en condiciones secas.

Diagrama del procedimiento metodológico realizado



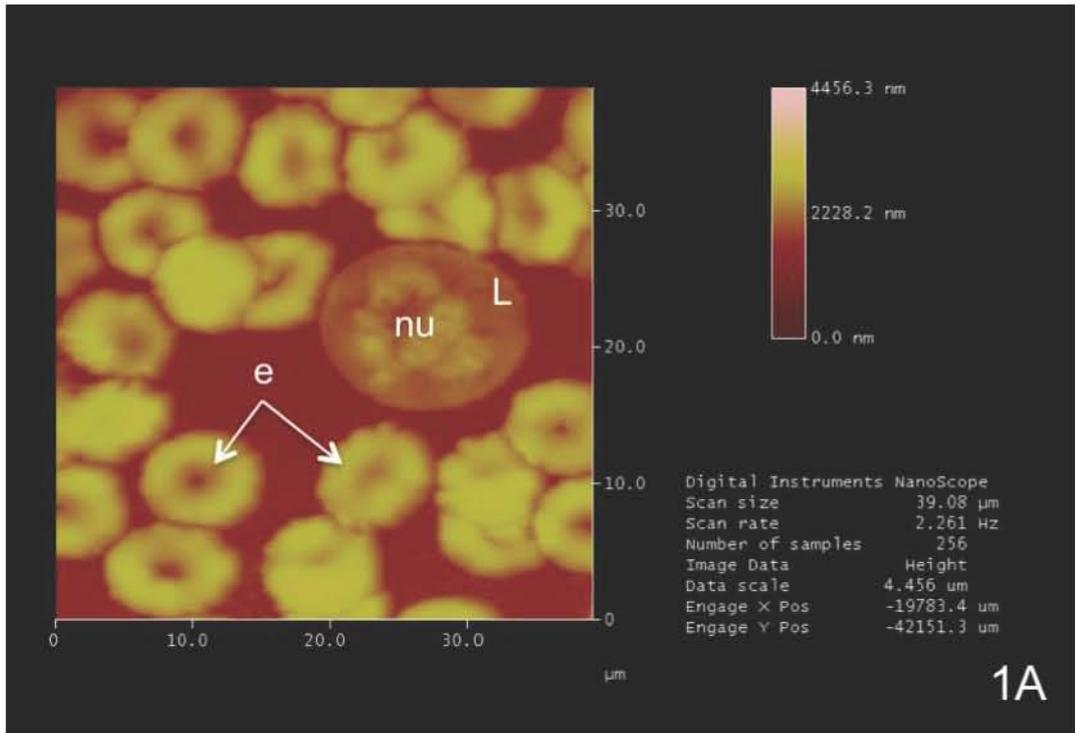
VI. RESULTADOS.

Las imágenes de frotis de sangre humana, obtenidas mediante AFM, muestran agrupaciones celulares que parecen corresponder a eritrocitos y algunas células blancas aisladas.

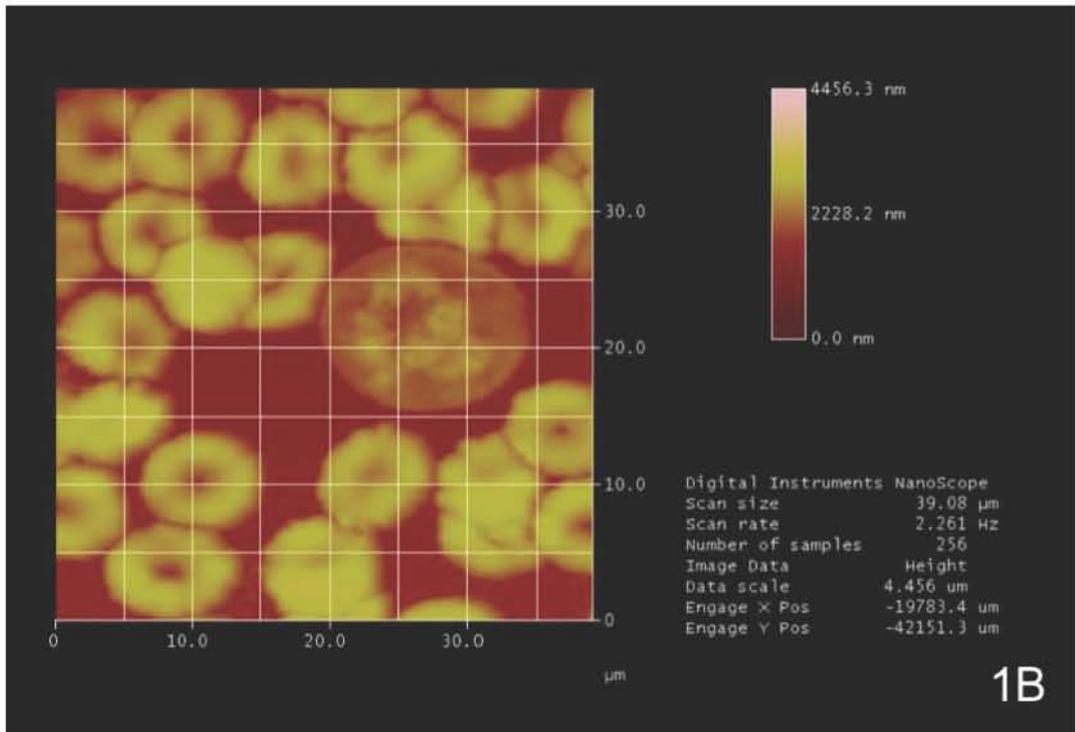
En una superficie de barrido de $39.08 \mu\text{m}$ (Figura 1A) se observan dos tipos de estructuras celulares, una de diámetro mayor rodeada de otras, de menor diámetro. En las células de menor diámetro puede apreciarse, mediante los cambios de coloración, la topografía de las mismas (las zonas más brillantes están más elevadas en relación a las oscuras, en una escala de 0 a 4456.3 nm). Además, se puede advertir una hendidura circular en el centro de estas células y pequeñas protuberancias en lo que podría ser la membrana celular.

Se observa también una célula de mayor diámetro, probablemente un leucocito, que presenta un núcleo con lobulaciones en la que también podemos inferir cierta topografía por los cambios de coloración.

En la misma figura, se insertó una cuadrícula de dimensiones conocidas, para poder calcular, en caso requerido, los diámetros de las células de forma aproximada (Figura 1B).



1A



1B

Figura 1A. Micrografía de fuerza atómica de un frotis de sangre humana. Aumento bajo (superficie de barrido 39.08 μm). Se observan células rojas (e) y un Leucocito (L) con su núcleo lobulado (nu).

Figura 1B. Figura 1A con cuadrícula para calcular los diámetros de las células.

También fue posible obtener la imagen de una proyección tridimensional parcial de la figura anterior, en la que se pueden apreciar los relieves topográficos con gran detalle, así como la textura de las superficies celulares y del núcleo de la célula de mayor diámetro (Figura 1C). La zona de barrido es la misma (39.08 μm) y la dimensión vertical (eje Z) es de 4456 nanómetros por división.

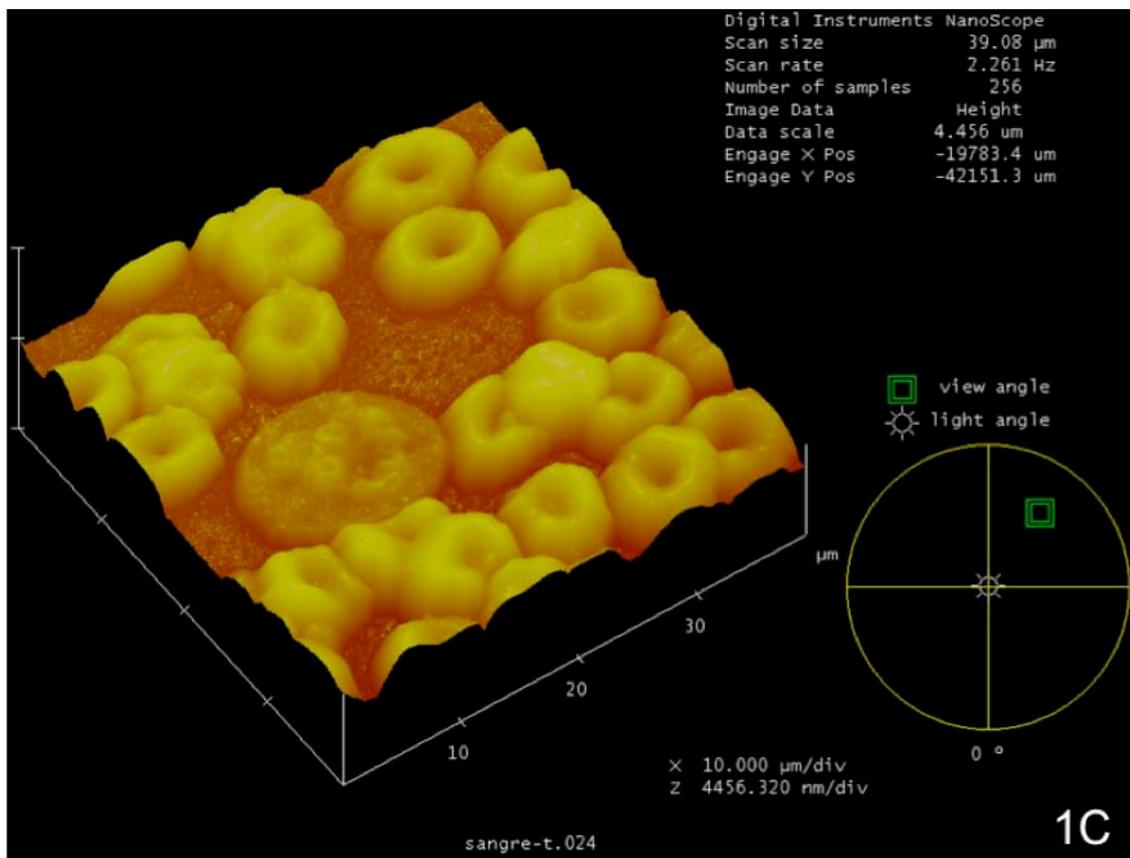


Figura 1C. Proyección tridimensional parcial de la figura 1A, en la que se indica el ángulo de observación, la escala de los ejes X y Y (10 $\mu\text{m}/\text{división}$), así como la de la dimensión vertical del eje Z (4,456.32 nm/división).

Además se obtuvo una imagen del perfil tridimensional con una inclinación de 90° , lo cual nos da una mayor perspectiva del eje Z (Figura 1D). En esta visualización se aprecian con mayor claridad el perfil, los relieves en forma de crestas y valles y la mayor altura de los posibles eritrocitos en relación a la célula blanca.

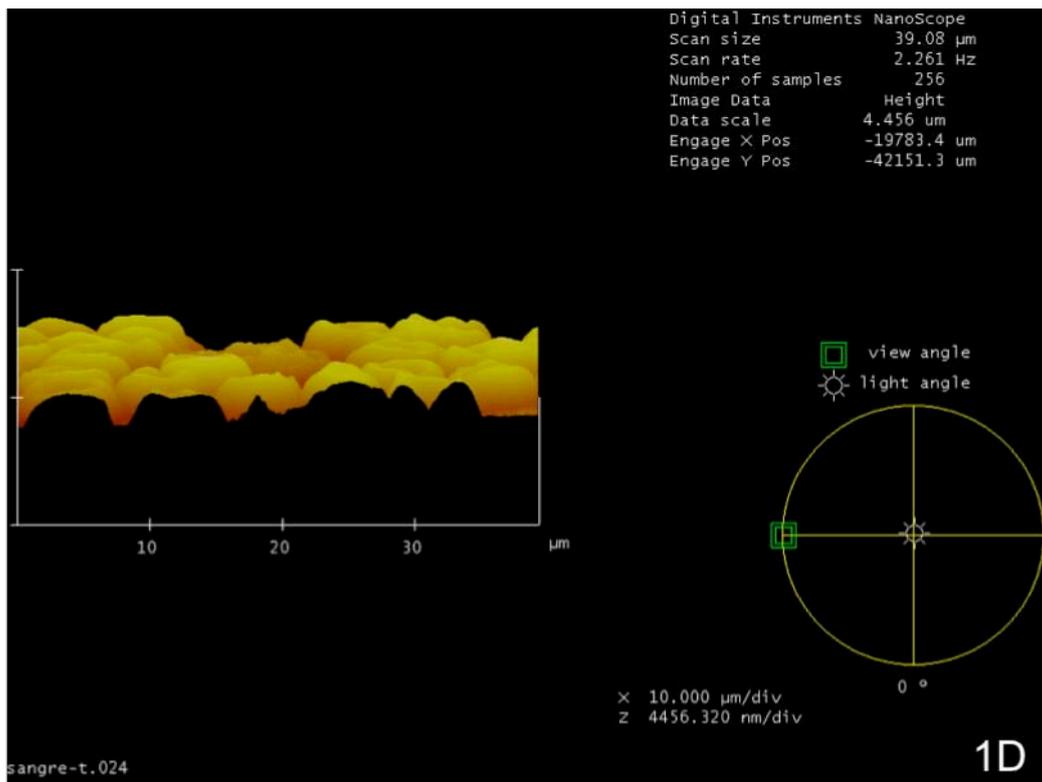


Figura 1D. Perfil tridimensional de la figura 1A, con un ángulo de inclinación de 90° .

En una zona de barrido menor (de $21.72 \mu\text{m}$), se puede apreciar una proyección bidimensional con más detalle de la célula blanca, en la que se puede observar con claridad un núcleo lobulado, pudiendo inferir la altura aproximada del mismo con respecto del citoplasma por la coloración, ya que las áreas brillantes están más elevadas en relación a la superficie del portaobjetos, como lo muestra la escala en la imagen que va de 0.0 nm a 4456.3 nm (Figura 2A).

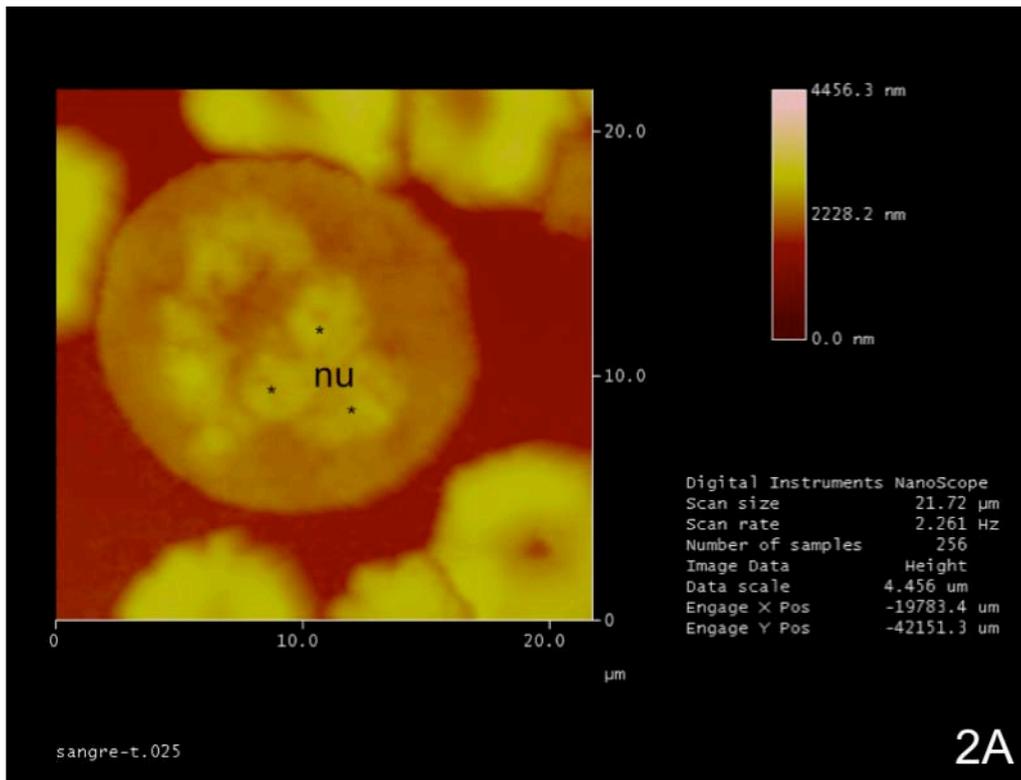


Figura 2A. Proyección bidimensional de un Leucocito a mayor aumento (zona de barrido de 21.72 μm). Los asteriscos señalan algunos de los lóbulos del núcleo (nu)

Con el propósito de calcular el diámetro de la célula, se utilizaron dos procedimientos: 1) la inserción de una cuadrícula de dimensiones conocidas (Figura 2B) y, 2) el empleo del software para análisis de imágenes del AFM, siendo el diámetro obtenido de 14.7 μm en el primer caso y de 15.613 μm con el segundo procedimiento.

También se efectuó un análisis para obtener el perfil gráfico de la célula blanca que corresponde a la línea contenida entre las dos flechas rojas en la imagen bidimensional de la misma (Figura 2C). El perfil gráfico, además de permitirnos calcular el diámetro de la célula, nos revela de manera fina una sucesión de crestas y valles a lo largo del diámetro de la célula en una escala nanométrica.

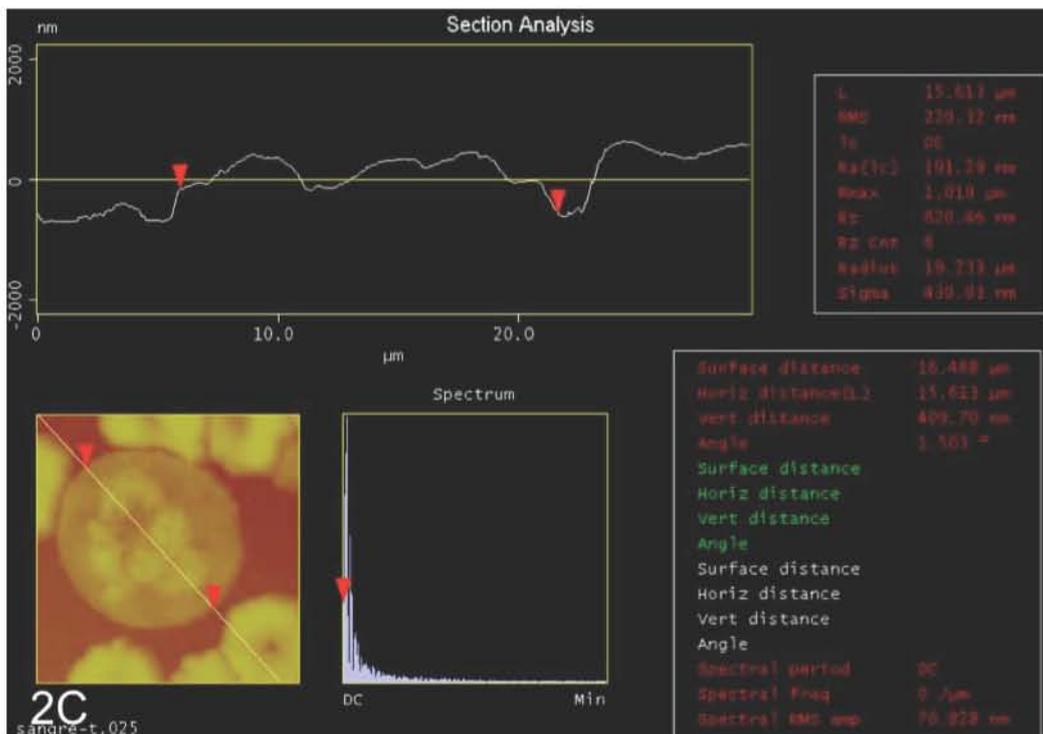
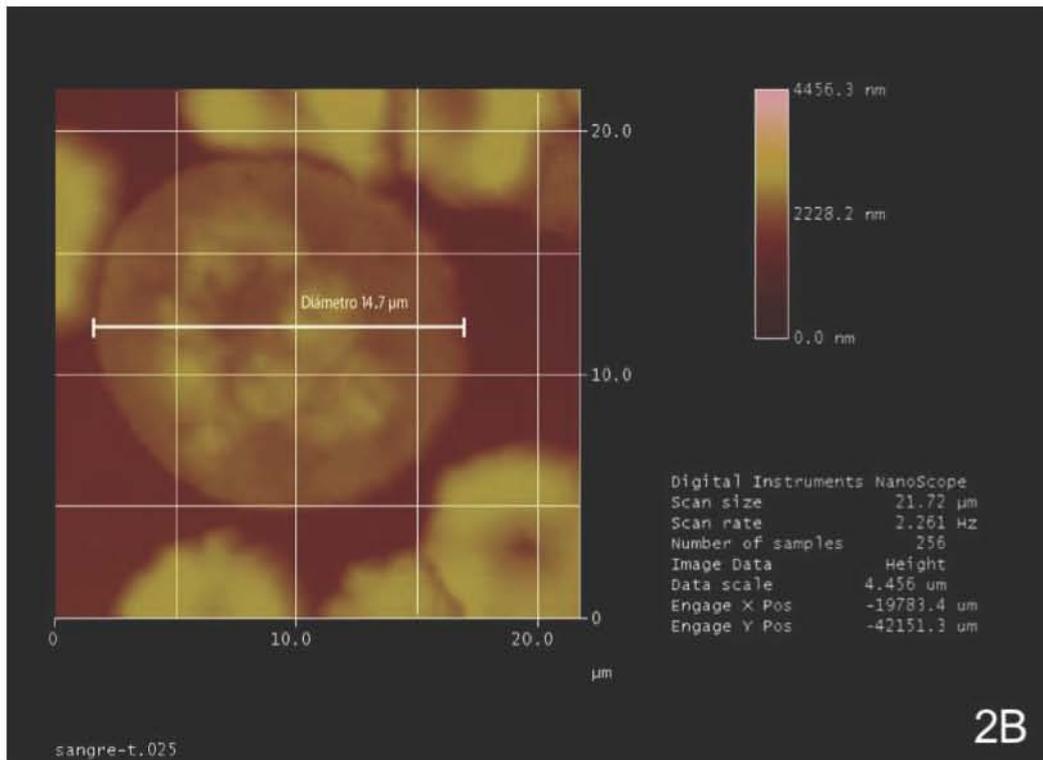


Figura 2B. Se indica el diámetro aproximado del Leucocito de la figura 2A (14.7 μm), calculado con la inserción de una cuadrícula de dimensiones conocidas.

Figura 2C. Perfil gráfico de la misma célula (línea blanca entre dos flechas rojas), indicándose en la tabla del ángulo superior derecho el diámetro calculado por este método (15.613 μm).

En una proyección tridimensional parcial de la misma figura, se pueden apreciar la morfología tridimensional de la célula y la textura de la superficie celular correspondiente al citoplasma y al núcleo, en el cual se pueden observar con claridad la topografía de las protuberancias nucleares y puentes muy finos entre los lóbulos del mismo.

Se evidencia también la diferencia en el tamaño y la morfología tridimensional de la célula blanca y las células más pequeñas que se encuentran a su alrededor (Figura 2D).

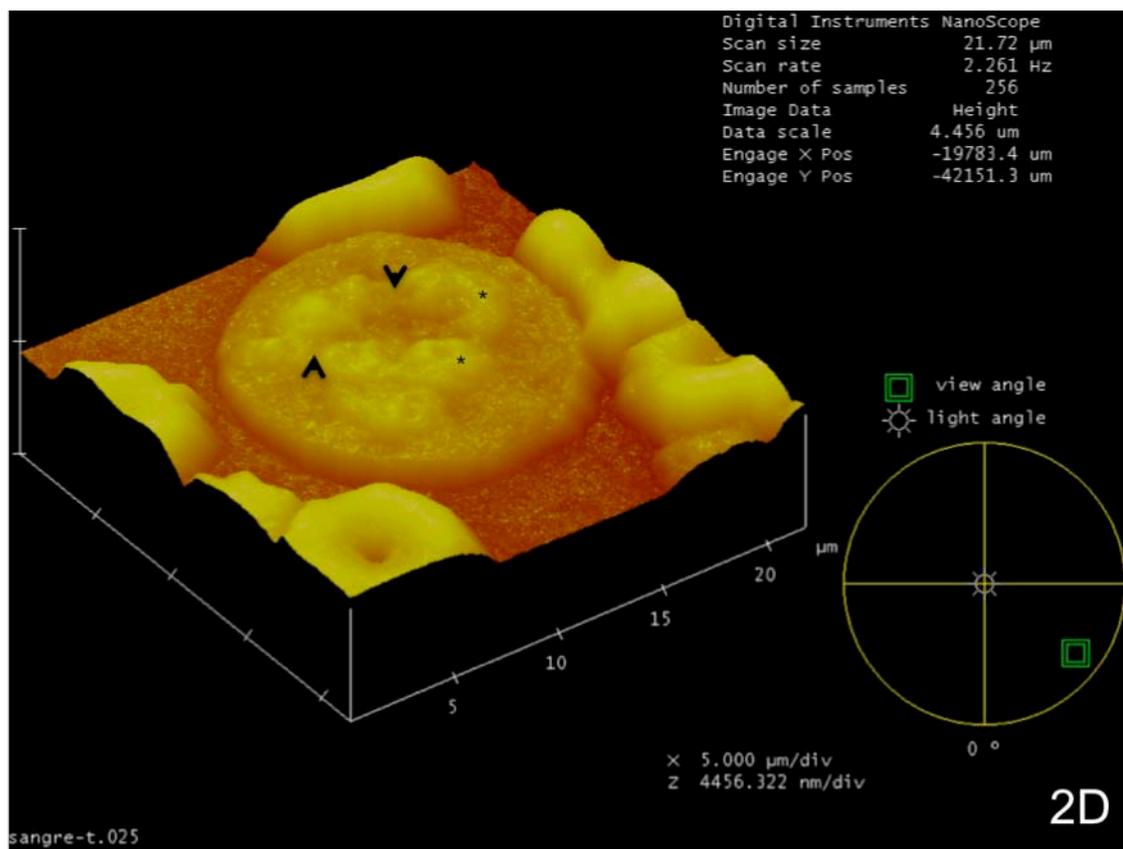


Figura 2D. Proyección tridimensional parcial de la figura anterior. Se observan con claridad los lóbulos nucleares (*), puentes muy finos entre los lóbulos del núcleo (^) y se aprecia con claridad la diferencia entre la textura del citoplasma y la del núcleo.

Al obtener un perfil tridimensional de la figura 2D, se aprecian en el eje Z, los relieves de la célula blanca y las células que la rodean. En la primera se advierten además de las texturas de las superficies celulares, las elevaciones de los lóbulos nucleares sobre la superficie del citoplasma. (Figura 2E).

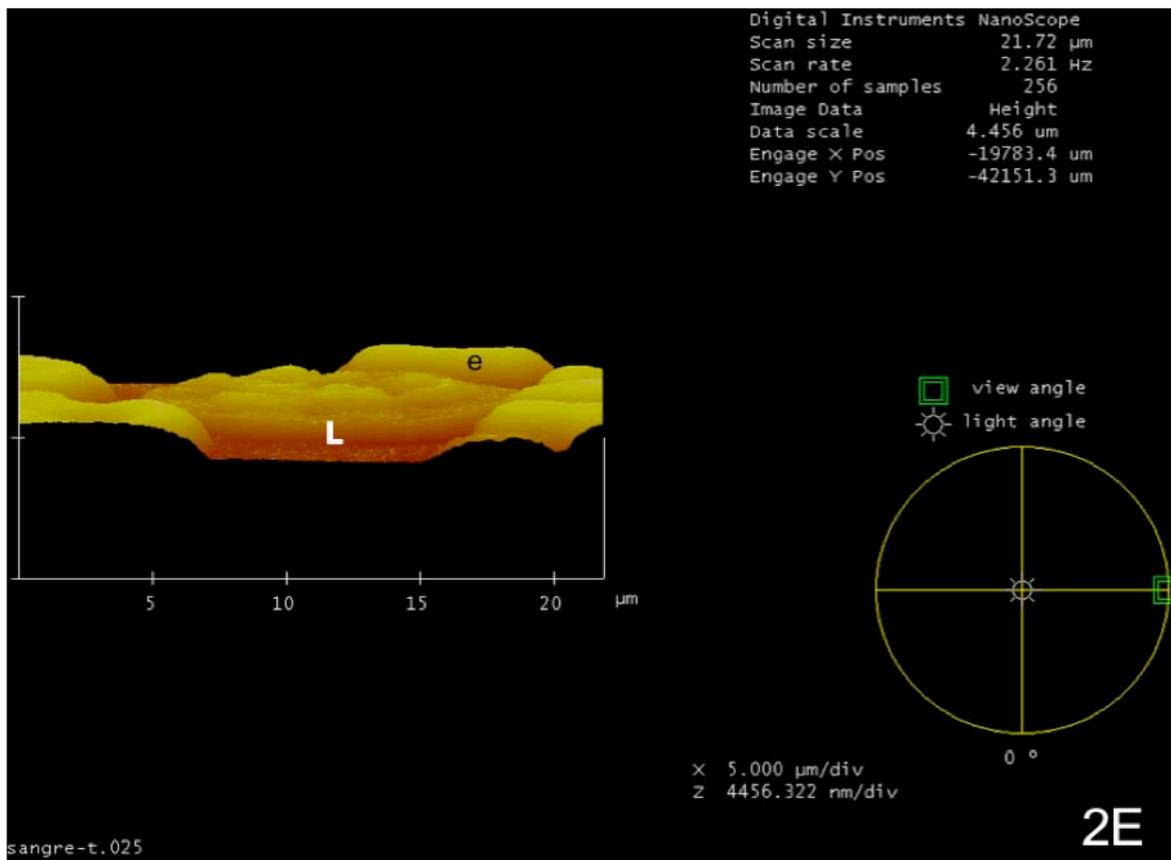


Figura 2E. Perfil tridimensional de la figura 2D con una inclinación de 90° en la que se observan los lóbulos nucleares sobresaliendo de la superficie del citoplasma y se aprecia el menor diámetro y mayor grosor de los eritrocitos (e) en relación con la célula blanca (L).

En una zona de barrido de $13.06 \mu\text{m}$ (Figura 3A) se obtuvo una imagen bidimensional de una célula blanca rodeada de otras células sanguíneas, en la que se puede observar lo que parece ser una membrana celular y un núcleo grande y circular, rodeado de una franja angosta de citoplasma. Las

coloraciones sugieren cierta topografía al destacar la altura de unas zonas sobre otras.

El perfil gráfico de la imagen anterior (Figura 3B) nos muestra en la parte inferior, una imagen bidimensional de la célula blanca en la que la línea recta entre las flechas rojas nos indica el diámetro celular de 10.66 μm .

En la parte superior de la figura se presenta el perfil gráfico (PG) de la superficie celular correspondiente al diámetro de la misma. Este muestra gráficamente los relieves de la superficie celular a escala nanométrica.

Al compararlo con el perfil de la figura 2C, se advierten claramente las diferencias, ya que en este caso no se observan las elevaciones correspondientes a los lóbulos nucleares, sino que el núcleo tiene una estructura más “aplanada”.

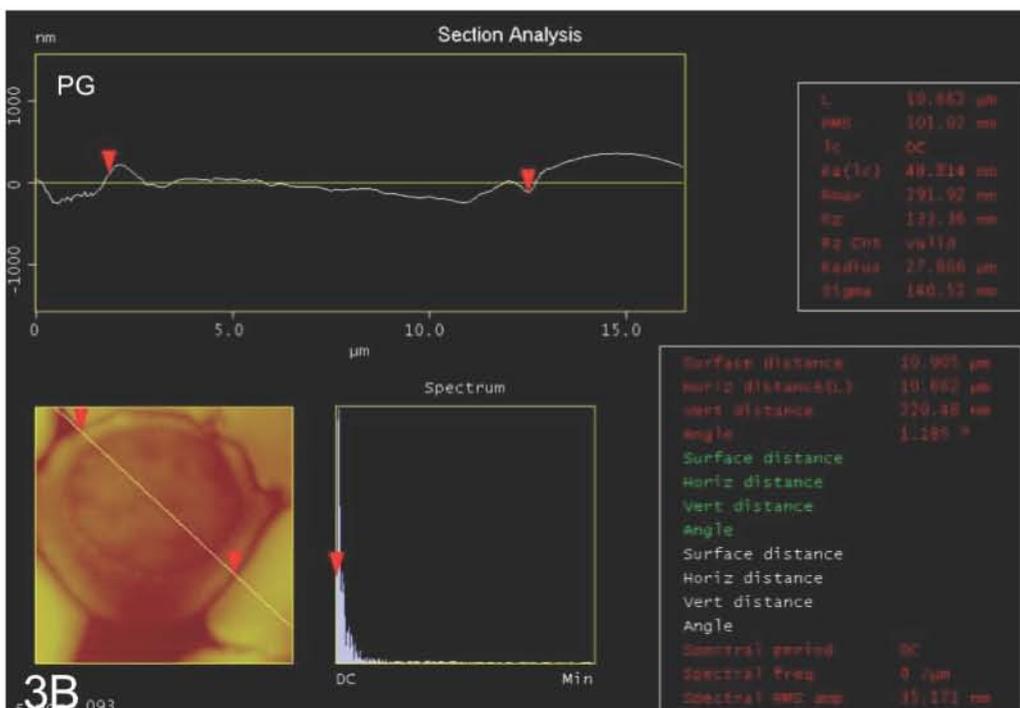
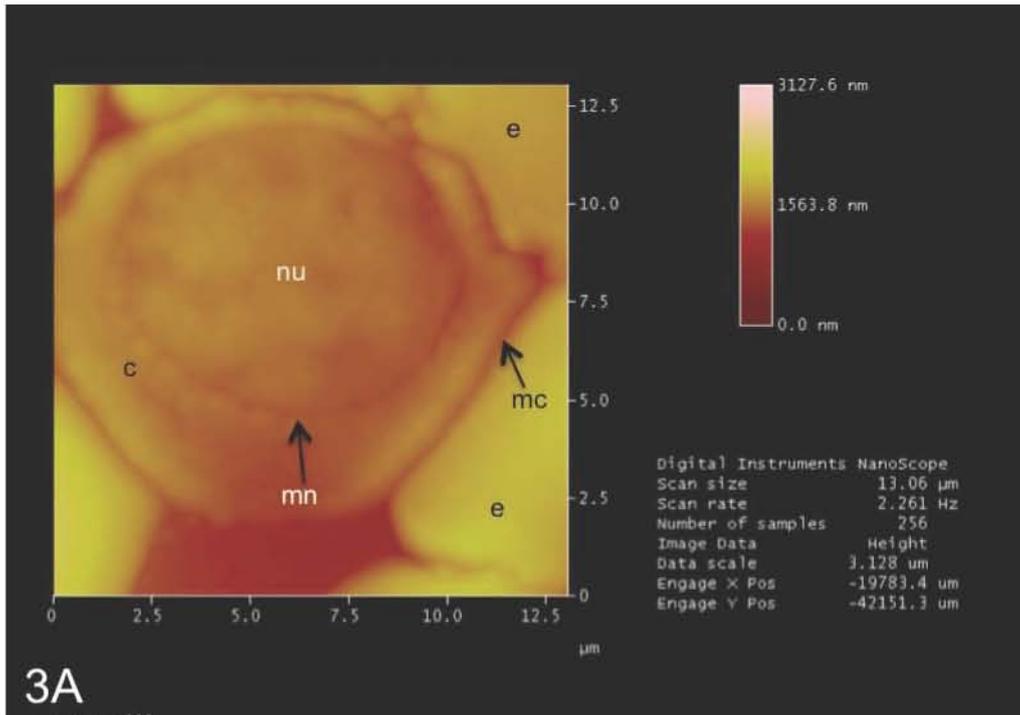


Figura 3A. Imagen de una célula blanca, rodeada de eritrocitos (e), en la que se observa un núcleo grande y circular (nu) con su membrana (mn), rodeado de una franja angosta de citoplasma (c) y lo que parece ser la membrana celular (mc).
Figura 3B. Perfil gráfico (PG) de la figura 3A en el que se indica el diámetro del linfocito (10.66 μm) cuyos límites se señalan con dos flechas rojas

En una proyección tridimensional parcial de la misma célula se pueden apreciar un núcleo más o menos circular desplazado hacia un extremo, con una textura que muestra pequeños relieves y hendiduras. También se distingue con claridad la membrana nuclear y el citoplasma que presenta una textura diferente de la del núcleo. La escala en el eje Z es de 3127.6 nm por división (Figura 3C).

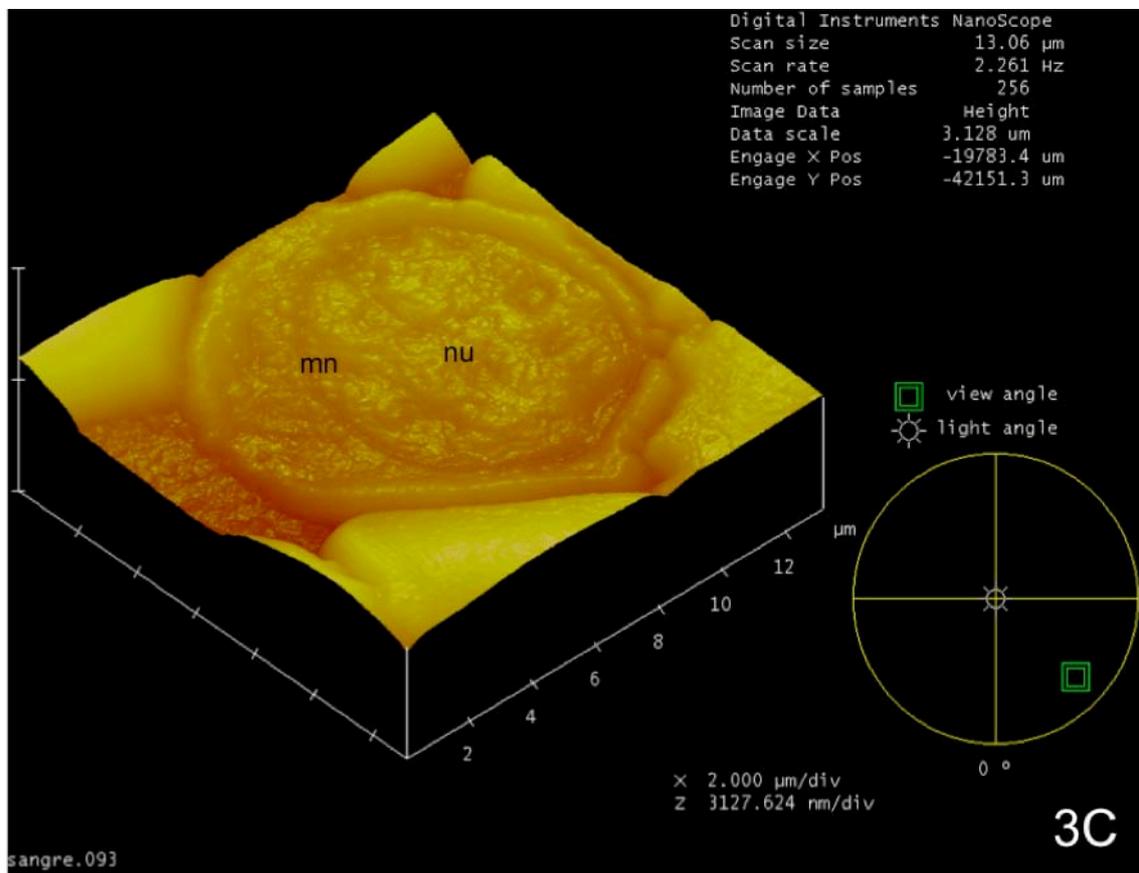


Figura 3C. Proyección tridimensional parcial del linfocito mostrado en la figura 3A, en el que se puede apreciar el núcleo (nu) desplazado hacia un extremo de la célula, con una textura que muestra pequeños relieves y hendiduras, así como la membrana nuclear (mn). La escala en el eje Z es de 3127.6 nm.

En el perfil tridimensional de la figura anterior se observa la membrana celular con una dimensión mayor en el eje Z con respecto del núcleo, lo que da la apariencia de que este último se encuentra “hundido” en el citoplasma. También se aprecia un mayor grosor de los elementos celulares que lo rodean. La escala en el eje Z es la misma (Figura 3D).

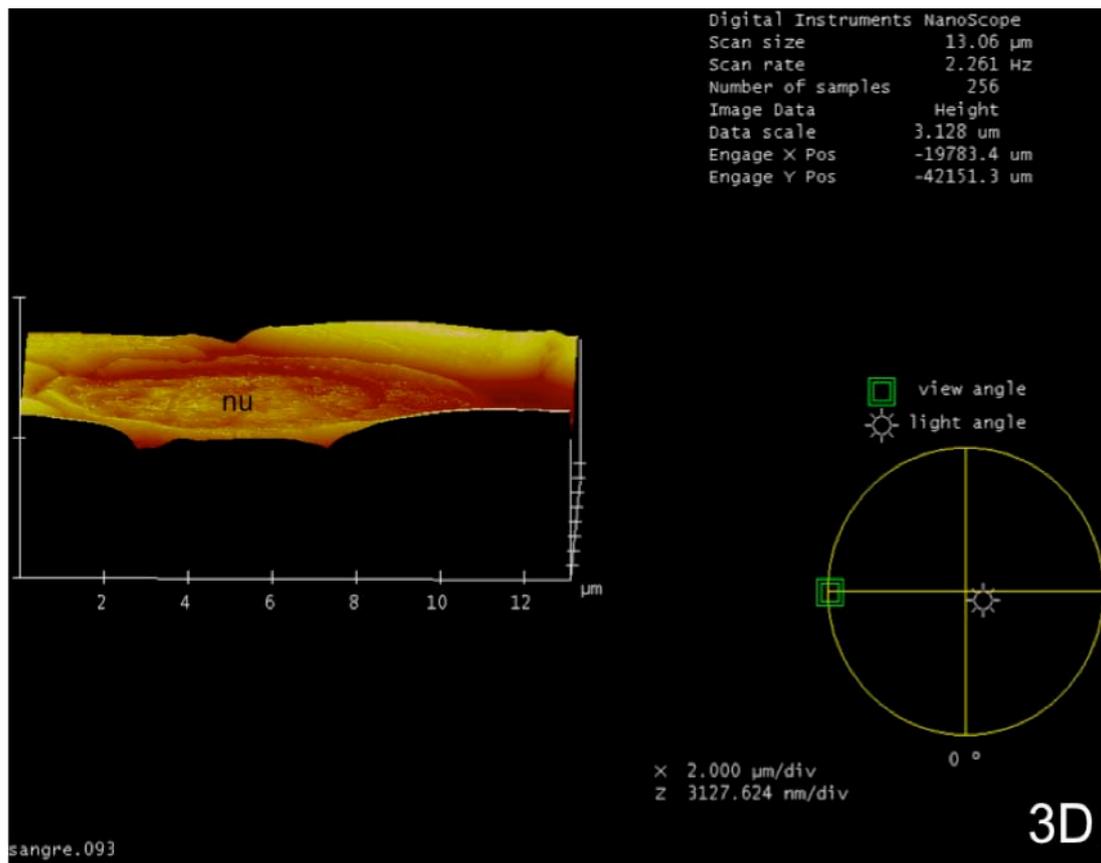


Figura 3D. Perfil tridimensional de la figura anterior. Se aprecia claramente el núcleo (nu) que parece estar “hundido” en el citoplasma de la célula.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se han obtenido imágenes de células sanguíneas en frotis sin teñir con el microscopio de fuerza atómica en modo de contacto, con el propósito de destacar y corroborar la importancia de la AFM en el campo de la observación a escalas micrométricas, análogas y complementarias a las de la microscopía electrónica y otras tecnologías de observación (Ushiki et al, 1996).

La peculiaridad de este tipo de observación está en que se produce mediante el “tacto” del cual se derivan las imágenes en las que apreciamos con gran precisión y “nitidez” las estructuras celulares a escalas incluso nanométricas, lo cual nos lleva a apreciar nuevos aspectos y dimensiones de las estructuras celulares y subcelulares. Esto no deja de tener implicaciones para las concepciones de observación en el campo de las ciencias naturales.

Las células sanguíneas, han sido bien caracterizadas por medio de la microscopía óptica y la microscopía electrónica de transmisión o de barrido.

Con el objeto de identificar los tipos de células sanguíneas observadas en este trabajo mediante la AFM, se han comparado con imágenes de estas mismas células obtenidas con microscopía óptica y electrónica. En este caso, las células visualizadas mediante AFM correspondieron a hematíes y a dos tipos de leucocitos: neutrófilos y linfocitos.

La observación en microscopía óptica y electrónica

Un criterio, utilizado para identificar las células sanguíneas en microscopía óptica y electrónica es tomando en cuenta el tamaño y la forma. En este sentido, las células rojas o eritrocitos se han descrito como discos bicóncavos, que en soluciones isotónicas miden aproximadamente 7.5 μm de diámetro, 2.6 μm de grosor en la periferia y 0.8 μm en el centro. En ciertas condiciones físicas se retraen irregularmente mostrando protuberancias en la superficie, por lo que reciben el nombre de hematíes crenados. En cambio, las células blancas o leucocitos tienen una forma esférica cuando se encuentran en suspensión en la sangre. En el caso particular de los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleados tienen diámetros entre 12 μm y 16 μm y sus núcleos están constituidos por dos a cinco lóbulos unidos entre sí por puentes de cromatina (Henriquez et al., 2008) (Figura 4A).

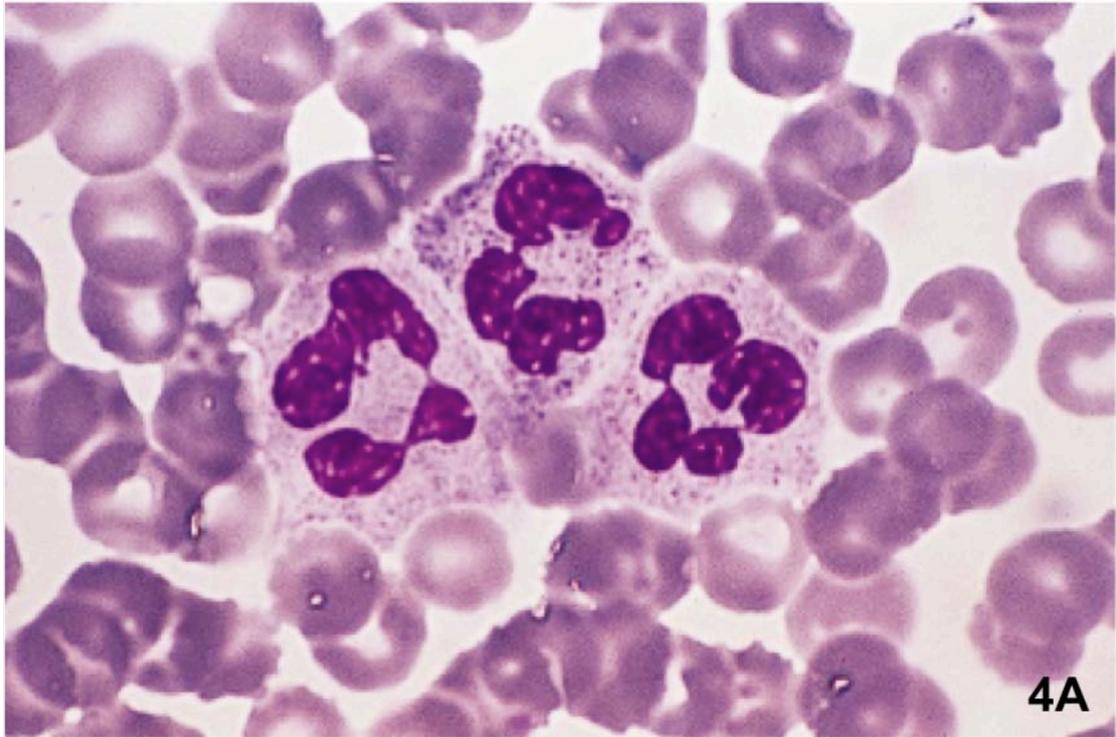


Figura 4A. Micrografía de un frotis sanguíneo en la que se muestran tres neutrófilos y diversos hematíes. Cada neutrófilo tiene sólo un núcleo, aunque cuenta con un número variable de lóbulos. Tinción de Giemsa. Gran aumento. (Tomada de Junqueira,L.C. Y Carneiro, J., 2006)

Los linfocitos pueden ser esféricos o ligeramente ovoides, con un núcleo grande y redondeado, que ocupa el 90 % de la célula y tienen un diámetro de 8 μm a 12 μm y hasta 18 μm de diámetro (Henriquez et al., 2008) (Figura 4B).

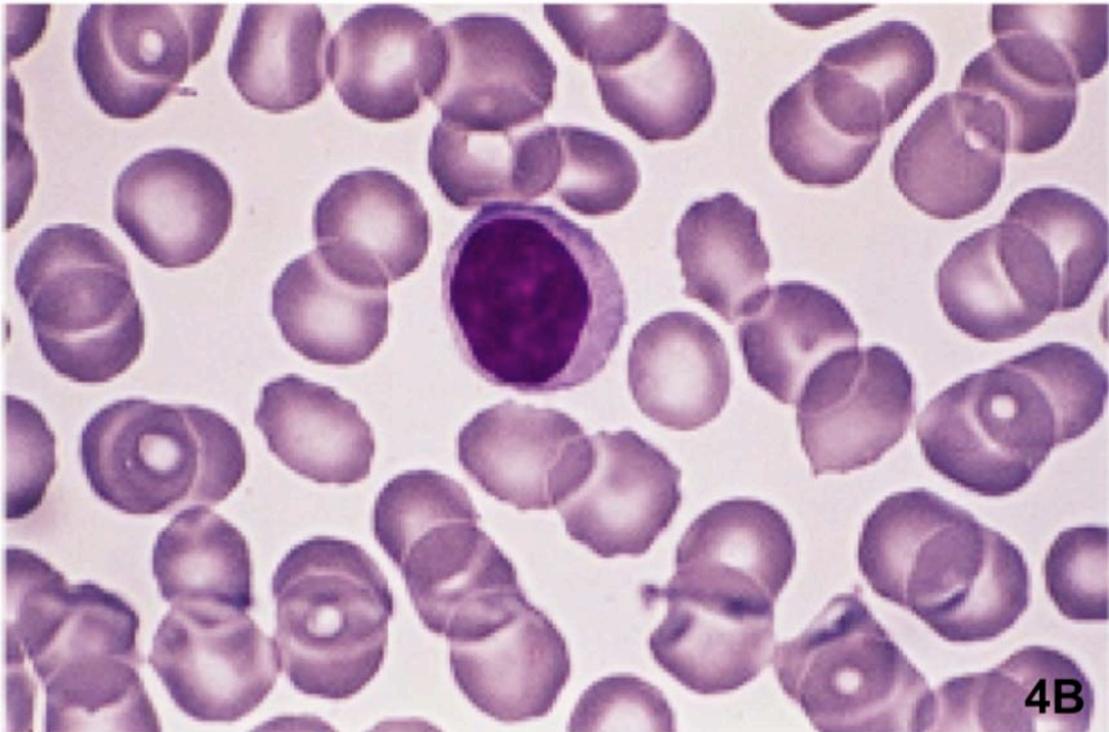


Figura 4B. Micrografía de un linfocito y de varios hematíes. El núcleo del linfocito es redondeado y el citoplasma no contiene gránulos específicos. Tinción de Giemsa. Gran aumento. (Tomada de Junqueira, L.C. Y Carneiro, J., 2006)

Las aproximaciones desde la AFM

En las imágenes obtenidas por AFM, se muestran varias posibilidades de abordar las configuraciones topográficas, los relieves y las texturas desde diferentes aproximaciones de área de barrido y desde distintas perspectivas dimensionales.

Al comparar las imágenes bidimensionales obtenidas con AFM en el área de barrido de $39.08 \mu\text{m}$ (Figuras 1A y 1B), con imágenes de microscopía óptica de un frotis de sangre (Figura 4A), se pudieron identificar por su forma, a varios eritrocitos alrededor de un neutrófilo que presenta un núcleo característico con varios lóbulos. Sin embargo, en el caso de las imágenes de AFM se obtiene una información topográfica adicional que se infiere por los

cambios en la coloración, ya que las zonas más brillantes se encuentran más elevadas que las oscuras a escala nanométrica. Esto último sugiere diferencias de carácter topográfico en los lóbulos nucleares del neutrófilo.

Se puede advertir también en los eritrocitos, a pesar de que la imagen es bidimensional, la hendidura circular en el centro característica de su forma bicóncava, así como las protuberancias en la superficie celular de algunos de ellos que indica su estado “crenado”.

Otro criterio para identificar a las células sanguíneas es su tamaño. En este caso, el diámetro, que es un parámetro comunmente utilizado, se calculó insertando una cuadrícula de dimensiones conocidas y por el empleo del software para análisis de imágenes de AFM. En el caso del neutrófilo de las figuras 2B y 2C, el diámetro fue de 14.7 μm y 15.6 μm respectivamente, que se encuentra dentro del rango del diámetro reportado en la literatura para los neutrófilos (12-16 μm)

Las imágenes tridimensionales (Figuras 1C y 1D) muestran con claridad la topografía celular en crestas y valles. Se advierte además, el detalle de las lobulaciones del núcleo del neutrófilo, que sobresalen por encima de la superficie citoplásmica (Figura 1C).

En lo que se refiere a los eritrocitos la figura 1C, además de proporcionarnos una información similar a la obtenida por la microscopía electrónica de barrido (Figura 5), la AFM nos permite incluso hacer mediciones en el eje Z y analizar con más detalle las modificaciones morfológicas que pueden sufrir estas células en diferentes condiciones. En este sentido, se ha propuesto a la AFM como una herramienta de diagnóstico muy útil en el análisis cuantitativo de estados fisiológicos o patológicos asociados a cambios

morfológicos de los eritrocitos (Lekka et al., 2005), así como en medicina forense para el establecimiento del momento de la muerte (Chen and Cai, 2005).

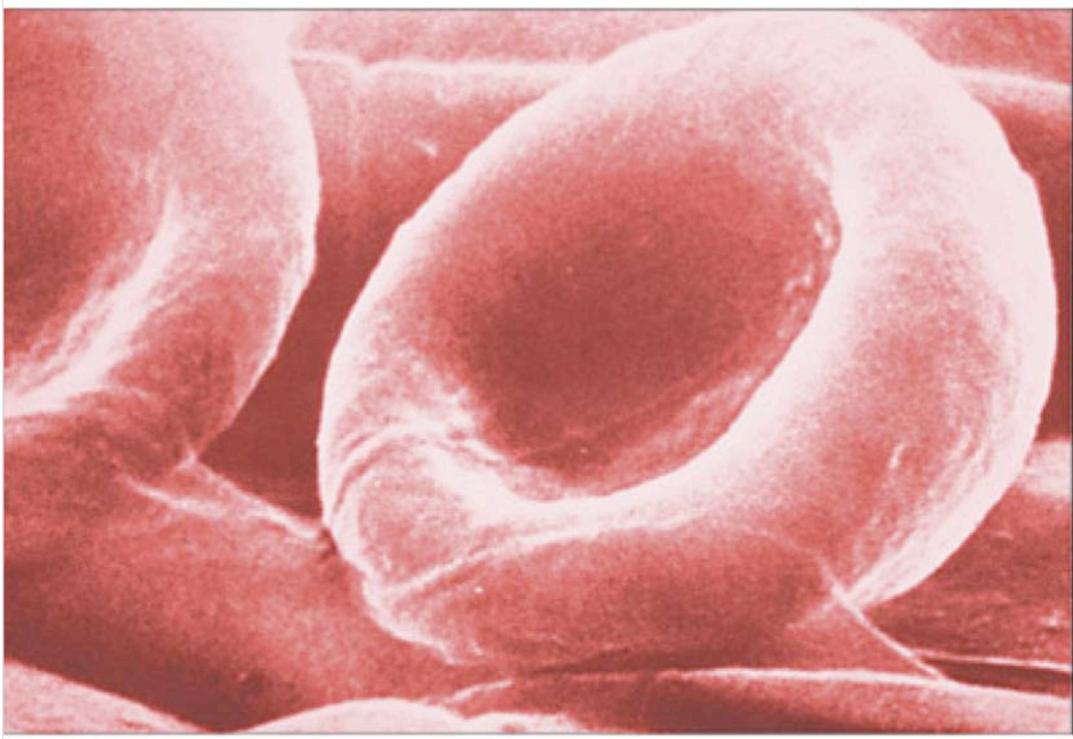


Figura 5. Electromicrografía de barrido de eritrocitos humanos normales, que muestra su forma bicóncava. (Tomada de: Blood Cells: An Atlas of Morphology With Clinical Relevance. G. Gulati and J. Caro, 2007)

En la proyección bidimensional de la figura 1A a mayor aumento (área de barrido de $21.72 \mu\text{m}$), se corrobora nuevamente que por su forma, tamaño y la presencia de un núcleo lobulado se trata de un neutrófilo en el que se advierte la altura las lobulaciones del núcleo sobre el citoplasma por los cambios en la coloración (Figura 2A). Esto se aprecia más claramente en la proyección tridimensional de la figura 2D.

Un aporte de la AFM de gran utilidad para el análisis morfológico de las células, es la posibilidad de obtener, a partir de una imagen bidimensional,

gráficos como el que se presenta en la parte superior de la figura 2C y en la figura 3B en las que advertimos un análisis cuantitativo del perfil de la superficie celular y la textura de la misma.

Esto abre nuevas perspectivas para explorar cuantitativamente cambios morfológicos *in situ* que pueden estar asociados a diferentes procesos fisiológicos, al tener la posibilidad de graficar a esta escala zonas de la superficie celular o secciones de las células para su análisis a escala nanométrica.

La figura 3A (área de barrido de 13.06 μm) es una proyección bidimensional que nos muestra una célula blanca ovoide que al compararla con las imágenes de microscopía óptica (Figura 4B), se puede identificar como un linfocito, caracterizado por su núcleo muy grande rodeado por una franja estrecha de citoplasma. También es posible inferir la topografía por la coloración diferencial.

La figura 3B muestra el perfil gráfico de la misma imagen y nos proporciona la dimensión del diámetro de la célula, así como un análisis nanométrico de la superficie celular. Si se compara con el perfil gráfico de la figura 2C correspondiente al neutrófilo, se pueden advertir las diferencias cuantitativas, que corresponden a las diferencias topográficas de las dos superficies celulares.

Esto nos lleva a sugerir el análisis de los perfiles gráficos de un mismo tipo celular para buscar una posible caracterización de este último, ya que los análisis gráficos de las texturas topográficas en una escala nanométrica pudieran ser específicas de cada tipo celular.

Por otro lado sería deseable buscar una correlación entre los perfiles gráficos de un área de superficie o de una sección celular y ciertos procesos celulares como por ejemplo en las zonas y secciones correspondientes al núcleo con la condensación de la cromatina.

Otro aspecto a considerar es que este trabajo se propuso estudiar básicamente las superficies celulares, es decir sobre la membrana, sin embargo, los trabajos que se realicen sobre la superficies de los cortes o secciones internas del material celular deberán ofrecer nueva información que se correlacione y en su caso pueda corresponderse con la obtenida en los estudios de las superficies de las membranas celulares.

Es oportuno hacer resaltar que ante la peculiaridad de este tipo de observación "microscópica" que nos amplía el espectro observacional, pues nos muestra imágenes, que "vemos" como resultado de un tipo de interacciones propias del "rastreo", enriquece la misma idea de observación científica (particularmente en el campo de biología) al mismo tiempo que la problematiza mas, al mostrar que los "datos" que nos "proporcionan" estas tecnologías estan inherentemente relacionados con sus condiciones de implementación teórica y técnica.

VIII. CONCLUSIONES

Estos resultados corroboran la utilidad de la información obtenida por medio de la AFM para elaborar parámetros a escala nanométrica, que pudieran utilizarse en la caracterización morfológica de tipos celulares. Además, los datos también sugieren que un análisis nanométrico específico de las texturas topográficas las superficies celulares y en particular de las nucleares de los leucocitos serían indicadores de algunos procesos celulares. Un caso sería el de la superficie nuclear y las formas de la compactación de la cromatina.

Se propone el análisis de otros tipos de células sanguíneas que con el fin de elaborar un atlas, que pudiera ser utilizado con fines de diagnóstico de cada tipo celular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Agazzi, E. (1998). **El Impacto epistemológico de la tecnología. Argumentos de razón técnica.** No 1 p. 17-32. Universidad de Sevilla.
2. Binnig G., Quate CF. y Gerber C. (1986). **Atomic force microscopy.** Phys. Rev. Lett. 56(9): 930-933.
3. Braga C. y Ricci D. (2004). **Atomic Force Microscopy.** Humana Press, New Jersey. pp. v-vi.
4. Bushell GR., Cahill C., Clarke FM., Gibson CT., Myrtha S. y Watson GS. (1999). **Imaging and force-distance analysis of human fibroblast in Vitro by atomic force microscopy.** Cytometry. 36(3): 254-64.
5. Chen Y. y Cai J. (2006). **Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy.** Micron 37(4): 339-346.
6. el-Shoura SM. (1993). **Falciparium malaria in naturalliy infected human patients: IV- Ultraestructural changes in Peripherals white blood cells.** Ann. Parasitol. Hum. Comp. 68(4): 169-75.
7. Fourez, G. (1944). **La Construcción del Conocimiento Científico.** Narcea, Madrid pp 36-37.
8. Girasole M, Cricenti A, Generosi R, Congiu-Castellano A, Boumis G. y Amiconi G. (2001). **Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study.** J. Microscopy. 204(1): 46-52.

9. Gulati G. and Caro J. (2007). Blood Cells. Atlas of morphology with clinical relevance. American Society For Clinical Pathology Press. p. 42.
10. Hansma HG. (2001). **Surface biology of DNA by atomic force microscopy**. Annu. Rev. Phys. Chem. 52: 71-92.
11. Henriquez K., Chue L., Almanza E., Carles T. De Gracia K. y Serracín D. (2009). **Atlas Virtual de Medicina**. En http://www.telmeds.net/AVIM/Ahema/serie_blanca/segmentados_celulaLE.htm
12. Horber JK. y Miles MJ. (2008). **Scanning probe evolution in biology**. Science 302(5647): 1002-5
13. Howland R. y Benatar L. (2000). **A practical guide to scanning probe microscopy**. ThermoMicroscopy.
14. Jiménez-García, L F. y Segura-Valdéz ML. (2004). **Vizualizing nuclear structure “in situ” by atomic force microscopy**. Methods. Mol. Biol. 242 : 191-9.
15. Joshi NV, Medina H, Colasante C. Y Osuna A. (2000). **Ultrastructural investigation of human sperm using atomic force microscopy**. Arch. Androl. 44(1): 51-7.
16. Junqueira LC y Carneiro J. (2006). **Histología Básica**. Masson, Barcelona. p.229, 234.
17. Lekka M, Fornal M, Pyka-Fosciak G, Lebed K, Wizner B, Grodzicki T. y Styczen J. (2005). **Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscopy**. Biorheology 42(4): 307-317.

18. Miklaszewska M., Targosz M., Pietrzyk J A., Szymonski M., Rumian R., Krawentek L. y Sulowicz W. (2004). **New measurement technics in biology and medicine: atomic force microscopy** (part II). *Przegl. Lek.* 61(2):126-33.
19. O`Reilly M., Mc Donnell L. y O`Mullane J. (2001). **Quantification of red blood cells using atomic force microscopy**. *Ultramicroscopy* 86(1-2): 107-112.
20. Ricci D., Grattarola M., y Tedesco M. (2004). **Growth cone of living neurons probed by Atomic Force Microscopy**. En "Braga C y Ricci D. (2004). *Atomic Force Microscopy*. Humana Press".
21. Rosembluth MJ, Lam WA. y Fletcher DA. (2006). **Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability**. *Biophys. J.* 90(8): 2994-3003.
22. Sakaue M. y Taniguchi K. (2001). **Imaging of lectin-labeled cell surface of human lymphocytes by the use of atomic force microscopy**. *J. Vet. Med. Sci.* 63(2): 223-225.
23. Ushiki T., Hitomi J., Ogura S., Umemoto T. y Shigeno M. (1996). **Atomic force microscopy in histology and cytology**. *Arch. Histol. Cytol.* 59(5): 421-431.
24. Ushiki T. (2001). **Atomic force microscopy and its related techniques in biomedicine**. *Ital. J. Anat. Embryol.* 106(2 suppl 1) :3-8.
25. Watson JA y Watson GS. (2006). **Scanning Probe Microscopy-Investigating the World Down Under**. *Materials Australia* 39(6): 31-33.

26. Weisenhorn AI, Gaub HE, Hansma HG, Sinsheimer RL, Kelderman GL. y Hansma PK. (1990). **Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope.** Scanning Microsc. 4 (3): 511-6.
27. Wu Y., Hu Y., Cai J., Ma S. y Wang X. (2008). **Coagulation property of hyaluronic acid-collagen/chitosan complex film.** J. Mater. Sci. Mater. Med. 19 (12): 3621-9.