

DESARROLLOS Y APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA DE FUERZAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS Y DE CÉLULAS CANCEROSAS

Tesis doctoral

Año 2013

Jorge Rodríguez Ramos



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



A la memoria de mi abuelo Ricardo

DESARROLLOS Y APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA DE FUERZAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS Y DE CÉLULAS CANCEROSAS

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas por:

Jorge Rodríguez Ramos

Dirigida por el Prof. Ricardo García García



Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Física de la Materia Condensada

Año 2013

Agradecimientos

A Ricardo García, por la acogida en el grupo FORCETOOL donde he desarrollado la mayor parte de este trabajo de tesis.

A los amigos del grupo: Elena, Paco, Cristian, Ramsés, Javi, Jose Luis, Nuria, Carlos, Marco, Marta, Ryu, Horacio, Alma, Dani, Andra, Amir, Fran, Ana. De todos se aprende y con todos se comparten penas, travesuras y, de vez en cuando, algunas glorias. Especialmente a Elena Tomás, por su ayuda durante mis primeros pasos en el mundo del AFM. A Cristian Dietz, con quien comparto el punto de vista de que los experimentos suelen estar bien y la desconfianza hacia los resultados perfectos. A Marco Chiesa, a quien se le puede preguntar casi cualquier cosa porque sabe de todo. A Amir Payam, por la polémica constante acerca del contraste de fase en medio líquido.

A los colegas de microelectrónica y el instituto de materiales que son muchos. A Margarita Sousa que de tantos aprietos burocráticos me libró. A los de los partidos de fútbol, la liga de basket y los *bloody runners*.

A los amigos del CEAC y el InSTEC en Madrid, que alivian las nostalgias.

A Ernesto Moreno, del CIM (Cuba), que me proporcionó un problema sencillo en apariencia que fue elegido como tema inicial de tesis.

A Malgorzata Lekka y su grupo en Cracovia, Polonia, que me permitió dar el salto de la proteína a la célula.

A Amalia, por acompañarme (y soportarme) durante buena parte del tiempo y por los proyectos de futuro.

A mi Familia, que siempre está ahí para apoyarme, aunque haya un océano por medio.

A todos aquellos que han contribuido en mayor o menor medida a la culminación de este proyecto: Muchas gracias.

Los fondos iniciales para realizar este trabajo provinieron de un convenio de colaboración entre el CSIC (España) y el CITMA (Cuba). En una segunda etapa,

más extensa, provienen de una beca JAE-Predoc del CSIC, financiada mayoritariamente por el Fondo Social Europeo.

Glosario de abreviaturas y símbolos

A_c :	Amplitud crítica. Valor de amplitud libre para el cual se pasa de oscilar en régimen atractivo a régimen biestable en una curva de fuerza A vs. z_p .
AFM:	Microscopio/microscopía de fuerza (en inglés, Atomic Force Microscopy) ¹ .
AM-AFM:	Microscopía de fuerza modulada en amplitud (en inglés, Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy).
A_{sp}	Amplitud de trabajo en AM-AFM.
Bimodal-AFM:	Técnica en la cual se excitan los dos primeros modos de oscilación de la palanca. Se utiliza el primer modo para mantener constante la distancia a la muestra mientras se toman imágenes de amplitud y/o fase del segundo modo.
bR:	Bacteriorhodopsina: proteína transmembrana presente en la membrana púrpura.
Cyt-D:	Citocalasina D, droga que impide la polimerización de los filamentos de actina dentro de la célula sin afectar otros elementos del citoesqueleto.
C_m :	Concentración másica (unidades: g/L).
CP:	Cara citoplasmática de la membrana púrpura.

¹Para mayor comprensión, se han respetado siglas en inglés. La traducción literal de AFM sería microscopía de fuerza atómica, pero en el texto se refiere como microscopía de fuerza, porque esto se corresponde mejor con la realidad.

E:	Módulo de Young.
EC:	Cara extracelular de la membrana púrpura.
eEGFR:	Región extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
GD:	Glutaraldehído.
FFT:	Transformada rápida de Fourier.
HD:	Distorsión de armónicos.
HOPG:	Grafito pirolítico altamente organizado (en inglés Highly Ordered Pyrolytic Graphite).
HR:	Humedad relativa.
M_m :	Masa molecular (unidades: Da).
ME:	microscopía electrónica.
PB:	Polibutadieno.
PDB:	En inglés, Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).
PM:	Membrana púrpura: membrana de <i>Halobacterium salinarum</i> consistente en un arreglo bidimensional de trímeros de bacteriorodopsina, rodeados por lípidos y agua.
PS:	Poliestireno.
PSD:	Densidad espectral de potencia (en inglés, Power Spectral Density).
SEM:	Microscopía electrónica de barrido (en inglés Scanning Electron Microscopy).
SHO:	Oscilador armónico simple.
SD:	Desviación estándar (en inglés, Standard Deviation).
ϕ :	Desfase, diferencia de fase respecto a la señal de excitación de la palanca. En el texto, a veces se refiere como "fase".
[X]:	Concentración molar de la sustancia X (unidades: mol/L).

Resumen

El tema central de la tesis es la microscopía de fuerza aplicada al estudio de sistemas biológicos. Esta es una técnica de los 80 del pasado siglo, que se ha ido abriendo paso junto a técnicas más establecidas como la microscopía electrónica o la difracción de rayos X para el estudio de la materia a escala nanométrica.

La microscopía de fuerza ha contribuido grandemente al desarrollo de las nanociencias y la nanotecnología. La proliferación de modos de operación y campos de aplicación crece cada día. Los investigadores han dedicado grandes esfuerzos a la comprensión del proceso de interacción de la sonda, una punta muy afilada, con la muestra. A medio camino entre la física cuántica y el micromundo, entender el nanomundo requiere enfoques multidisciplinarios. La posibilidad de observar moléculas aisladas o estudiar las propiedades de células vivas despertan gran interés, entre otros campos, para las investigaciones médicas.

La tesis está dividida en dos partes. La primera parte (capítulos del 1 al 4) está enfocada a la microscopía de fuerza modulada en amplitud, aplicada al estudio de proteínas aisladas en aire y a la operación en medio líquido. La segunda parte (capítulo 5), al estudio de las propiedades mecánicas de células cancerosas y no-malignas.

El capítulo 1 sienta las bases del funcionamiento del microscopio de fuerza. Se introducen los modos de operación que se utilizarán y las estrategias de calibración del equipo.

En el capítulo 2 se discuten los aspectos fundamentales para tomar imágenes de alta resolución de moléculas aisladas en aire: cómo evitar la degradación de la punta, qué régimen de oscilación utilizar, humedad relativa, amplitud y frecuencia de trabajo entre otros. Como ejemplo, se muestran imágenes de alta resolución de anticuerpos IgG.

En el capítulo 3 se estudia el mecanismo de acción de un anticuerpo antitumoral tipo IgG y su blanco, una glicoproteína de estructura y tamaño similares. Como

soporte, se introducen conceptos de cinética química y se emplean técnicas de bioquímica para abordar el problema con un enfoque integral.

El capítulo 4 aborda la física de la interacción de la palanca con la muestra. Se discuten la relación entre la amplitud y la fase de la palanca (observables clásicos en la microscopía de fuerza modulada en amplitud) con la generación de armónicos superiores y cómo todo esto se relaciona con la energía disipada en medio líquido.

Finalmente, el capítulo 5 aborda el estudio de células por microscopía de fuerza desde dos puntos de vista. El primero es la visualización combinada por microscopía de fuerza y de fluorescencia de células fijadas. El segundo, la caracterización de las propiedades elásticas de las células vivas mediante espectroscopía de fuerzas. Se comparan 4 líneas celulares de origen epitelial, 3 malignas y una no-maligna.

Índice general

Glosario de abreviaturas y símbolos	IX
I Microscopía de fuerza modulada en amplitud	1
1. Introducción y motivación	3
1.1. Microscopía de fuerza en modo contacto	5
1.2. Microscopía de fuerza modulada en amplitud	6
1.3. Calibración de los piezoeléctricos	7
1.4. Procesamiento de las imágenes	9
1.5. Motivación	10
2. Alta resolución en aire	13
2.1. Evaluación del desgaste de la punta	15
2.2. Imágenes de anticuerpos IgG	20
2.3. Discusión	22
2.3.1. Consejos para obtener imágenes de alta resolución	24
2.4. Conclusiones	25
3. Mecanismo de acción del hR3	27
3.1. Introducción	27
3.1.1. Mecanismo de activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico	27
3.1.2. Anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (hR3)	28
3.1.3. Estructura del anticuerpo y el receptor	30
3.1.4. Cambios conformacionales durante la adsorción de las moléculas a la superficie	32
3.2. Estudios preliminares	33
3.3. Cinética química de las interacciones	35

3.4.	Desplegamiento de receptores depositados sobre mica	39
3.4.1.	Análisis basado en el área y la altura de las partículas	39
3.4.2.	Análisis basado en el volumen de las partículas	42
3.5.	Preparación de las muestras para conservar la estructura del receptor	45
3.6.	Microscopía de fuerza del complejo hR3:eEGFR	49
3.7.	Medidas en HOPG	51
3.8.	Medidas en medio líquido	53
3.8.1.	Dinámica de la deposición de receptores sobre mica	53
3.8.2.	Modificación mecánica de la estructura del receptor	53
3.9.	Discusión	56
3.10.	Conclusiones	58
4.	Contraste de fase en medio líquido	61
4.1.	Determinación de las propiedades de las palancas	62
4.2.	Modelo teórico de partida	65
4.3.	Contraste de fase en membrana púrpura	70
4.4.	Implementación experimental	75
4.4.1.	Contribución de los armónicos de cada modo a la amplitud total de la oscilación	75
4.4.2.	Mediciones fuera de resonancia	77
4.4.3.	Ecuación para la energía disipada fuera de resonancia	80
4.4.4.	Corrección de la sensibilidad del fotodiodo a cada modo	81
4.4.5.	Estimación de la energía disipada en muestras de membra- na púrpura depositadas sobre mica	83
4.4.6.	Mediciones en mezcla de poliestireno y polibutadieno	86
4.5.	Discusión	88
4.6.	Conclusiones	91
II	Caracterización de la elasticidad de células mediante mi- croscopía de fuerza	93
5.	Caracterización de las propiedades elásticas de células	95
5.1.	Materiales y métodos	98
5.1.1.	Montaje experimental	98
5.1.2.	Líneas celulares	98
5.1.3.	Microscopía de fluorescencia	99
5.1.4.	Microscopía de fuerza de las células	100
5.1.4.1.	Topografía de las células medidas por fluorescencia	100

ÍNDICE GENERAL	xv
5.1.4.2. Espectroscopía de fuerzas de células vivas	101
5.2. Resultados	102
5.2.1. Morfología de las células	102
5.2.2. Espectroscopía de fuerza para el estudio de propiedades elásticas	104
5.2.2.1. Determinación del módulo de Young de las células	104
5.2.2.2. Dependencia del módulo de Young con la profun- didad de indentación	105
5.2.2.3. Elasticidad de células tratadas con citocalasina D .	107
5.2.2.4. Análisis de varianza de las distribuciones	108
5.3. Discusión	110
5.4. Conclusiones	111
Conclusiones	113
Lista de Publicaciones	115
Bibliografía	115

Parte I

Microscopía de fuerza modulada en amplitud

Capítulo 1

Introducción y motivación

El microscopio de fuerza (AFM) surgió en 1986 para investigar materiales aislantes a escala nanométrica. Era una combinación de los principios del microscopio de efecto túnel (STM) y del perfilómetro de superficie. El AFM funcionaba en modo contacto: una palanca de oro con una punta afilada de diamante pegada en su extremo libre se movía sobre la superficie de la muestra. Los cambios en la deflexión de la palanca se transducían en una imagen topográfica de la muestra. Aquel primer AFM utilizaba un STM para medir la deflexión de la palanca [1].

Un año después apareció el primer modo dinámico de operación. Se observó que la amplitud de oscilación de una palanca disminuía al acercarla a la muestra. Se utilizó un ciclo de retroalimentación para mantener la amplitud (la fuerza aplicada) constante y a este método se le denominó microscopía de fuerza modulada en amplitud (AM-AFM). La palanca era de tungsteno y la punta era un hilo del mismo material. La deflexión de la palanca se determinó por interferometría láser [2, 3]. La ventaja del modo AM-AFM, también conocido como *tapping*, o *intermittent contact*, es que disminuye las fuerzas laterales ejercidas sobre la muestra.

Hubo dos grandes avances que contribuyeron a la expansión del AFM: la detección de la deflexión de la palanca basada en un láser que se reflejaba en la palanca y se registraba en un fotodiodo (en inglés: *laser beam deflection*) [4] y la producción masiva de micropalancas con una punta afilada a un precio asequible [5, 6].

La figura 1.1 muestra un esquema típico de los elementos fundamentales de un AFM. La muestra suele estar depositada sobre un sustrato plano y con baja rugosidad. Entre los materiales típicos utilizados como sustrato se encuentran la mica, el silicio, el vidrio y el grafito pirolítico altamente organizado (HOPG).

La sonda es una palanca terminada en una punta afilada que barre la superficie. Las palancas se caracterizan por su constante de fuerza k , que va desde cientos de pN/nm hasta decenas de nN/nm; su frecuencia de resonancia f_0 que en aire suele ser de decenas hasta cientos de kHz y por su radio en el extremo de la punta R , generalmente inferior a 20 nm.

En el sistema de detección más extendido, un láser se refleja en la parte trasera de la palanca y llega al fotodiodo [7, 8] que transduce la señal y la envía a la unidad de control. El sistema tiene un ciclo de retroalimentación que aumenta o disminuye la distancia punta-muestra para mantener constante la fuerza aplicada (en modo contacto), o la amplitud de la oscilación de la palanca (en la microscopía de fuerza modulada en amplitud).

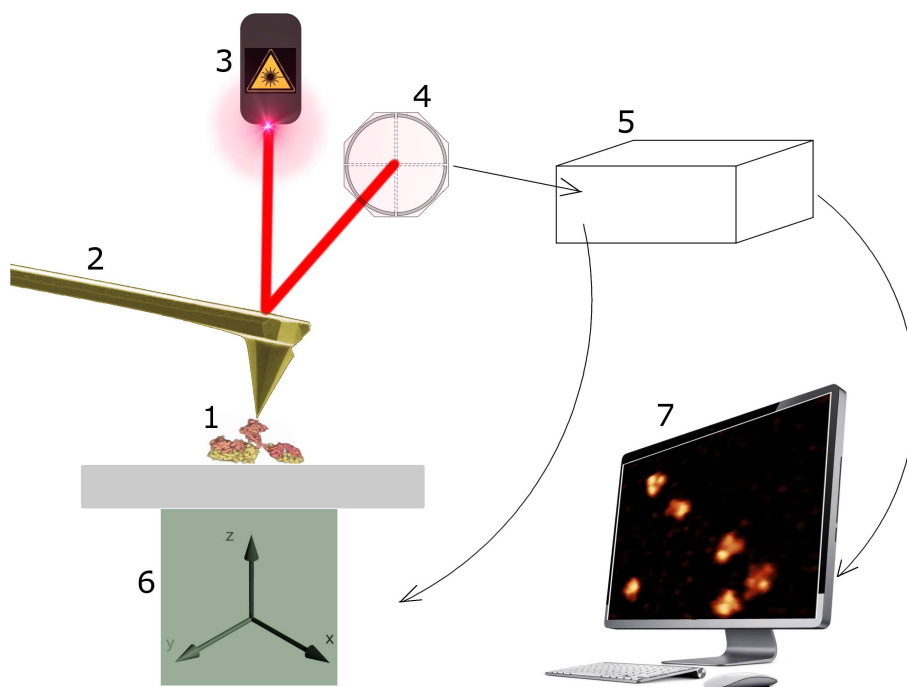


Figura 1.1 – Esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza. La muestra (1) se estudia mediante una palanca terminada en una punta afilada (2). La deflexión se registra con un láser (3) que se refleja en la palanca y llega al fotodiodo (4). La electrónica del sistema se encuentra en la unidad de control (5). La muestra se mueve en las tres direcciones espaciales mediante piezoelectricos (6). Los parámetros de operación se envían desde el ordenador (7) donde además se visualizan las imágenes.

1.1. Microscopía de fuerza en modo contacto

En este modo de operación la palanca barre la superficie aplicando una fuerza constante sobre la muestra. Es el modo más sencillo de operación. Para conocer la fuerza que ejerce la punta sobre la muestra hay que realizar curvas de calibración de la sensibilidad del fotodiodo.

En una curva de fuerza estática, la palanca se empuja sobre la superficie y luego se retrae. Si la superficie es rígida, durante la interacción habrá una región lineal donde el desplazamiento del piezoeléctrico (nanómetros) se puede relacionar con la variación señal que llega al fotodiodo (voltios) y, conocida la constante de fuerza de la palanca k , con la fuerza aplicada. La figura 1.2 muestra una curva de fuerza típica realizada sobre mica, en agua, con una palanca SNL (Bruker).

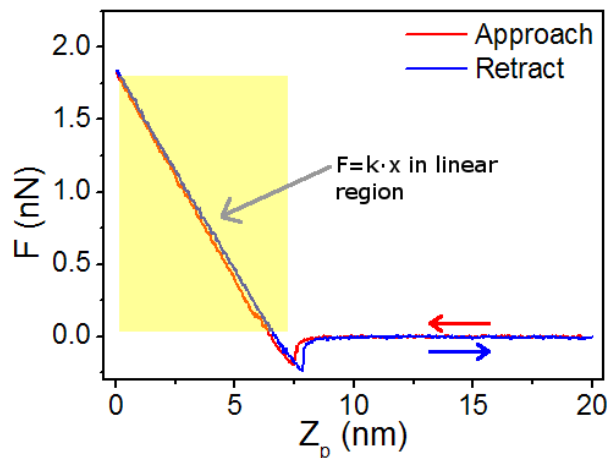


Figura 1.2 – Curva de fuerza estática típica sobre una superficie dura. La palanca se acerca y empuja sobre la superficie para luego retirarla. La fuerza F ha sido graficada frente al desplazamiento del piezoeléctrico Z_p . La punta está en contacto con la superficie para $Z_p < 7,5$ nm. La zona marcada en amarillo indica la región lineal que se utiliza para calibrar la sensibilidad del fotodiodo. Palanca SNL (Bruker) con $k = 0,3$ N/m y radio típico $R = 2$ nm. Muestra, mica en agua.

Como convenio, se asumirá que la fuerza menor que cero indica que la interacción es atractiva; cuando es mayor que cero, repulsiva.

Las curvas de fuerza estáticas y las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra han sido ampliamente estudiadas. Por este motivo no se profundizará en este tema en el texto. El lector interesado en los detalles sobre las curvas de fuerza puede remitirse a los trabajos de Cappella [9] y Butt [10] y al libro de Israelachvili [11] para profundizar en el tema de las fuerzas intermoleculares y superficiales.

En general, cuando se miden muestras biológicas por AFM se debe intentar que la fuerza aplicada sea inferior a 300 pN [12]. En el caso específico de las células fijadas con paraformaldehído que se muestran en el capítulo 5 se utilizó una fuerza de trabajo de 100 pN.

Existen varios métodos para determinar el valor de la constante de fuerza [13, 14, 15, 16, 17, 18]. En particular son muy populares el método de Sader y el basado en el ruido térmico. El método de Sader sirve para calibrar la constante de fuerza de palancas rectangulares si se conocen en las dimensiones de la palanca y las condiciones ambientales. La implementación de este método está disponible en el sitio web: <http://www.ampc.ms.unimelb.edu.au/afm/calibration.html#normal>

Por otra parte, el método del ruido térmico está implementado en la mayoría de los AFM comerciales y será abordado con detalle en el capítulo 4.

Las curvas de fuerza estáticas como la mostrada en la figura 1.2 se utilizan para obtener información relacionada con las propiedades mecánicas de la muestra. En el capítulo 5 se realizan curvas de fuerza estáticas para determinar el módulo de Young de células vivas. La indentación es proporcional a la rigidez celular. De ese modo se pueden comparar las propiedades mecánicas de tejidos y células [19, 20, 21, 22].

1.2. Microscopía de fuerza modulada en amplitud

Al acercar una palanca oscilante a la superficie de la muestra existe una reducción de la amplitud de la oscilación. En este modo de operación el ciclo de retroalimentación mantiene la amplitud a un valor constante. La ventaja es que se ejercen fuerzas laterales menores que en el modo contacto [3, 23].

La palanca se hace oscilar mediante una señal sinusoidal a una frecuencia cercana a su resonancia. La señal de excitación se produce generalmente por un piezoeléctrico que mueve la base de la palanca (excitación acústica). Otro método utiliza un solenoide que genera un campo magnético variable que, a su vez, actúa sobre un recubrimiento magnético de la palanca (excitación magnética). En cualquier caso habrá una diferencia de fase, o desfase, entre las señales de excitación y de respuesta que recibe el fotodiodo.

En general se fija la fase a 90° antes de que haya interacción con la superficie. Mientras la amplitud de la oscilación disminuye la fase cambia en dependencia del tipo de interacción que exista entre la punta y la muestra. Para un mismo valor de amplitud puede haber desfases diferentes en dos zonas distintas de la muestra.

Esto da origen al llamado contraste de fase que provee información acerca de la composición de la muestra.

En aire, el contraste de fase está relacionado con la energía disipada durante la interacción punta-muestra[24, 25, 26, 27]. En líquidos, el contraste de fase continúa siendo una pregunta abierta en muchos aspectos [28, 29, 30, 31]. Para comprender el contraste de fase en medio líquido y estimar la energía disipada, se debe tener en cuenta que se suele medir fuera de resonancia y los armónicos superiores generados producto de la interacción punta-muestra deben ser incluidos en el análisis. Estos temas se abordarán en el capítulo 4.

En la figura 1.3a se muestran curvas de amplitud contra movimiento del piezo. Se ha trasladado la posición del piezo a cero en el punto donde la amplitud se redujo hasta el 1 % de la amplitud libre. La flecha indica una zona donde hay un pequeño salto en la curva de amplitud. Este salto indica un cambio del régimen de oscilación al acercar la palanca a la superficie. Hasta este punto las fuerzas netas fueron atractivas durante un ciclo de oscilación. A partir de este punto las fuerzas netas que actúan sobre la palanca son repulsivas. En la figura 1.3b se ha mostrado la correspondiente curva de desfase contra desplazamiento del piezoelectrico en dirección vertical. Nótese cómo en el punto donde hay un pequeño salto en amplitud hay un marcado salto en la fase. Por este motivo es mejor utilizar el desfase como referente para conocer el tipo de régimen de oscilación de la palanca. En el próximo capítulo se utilizan las curvas de fuerza para optimizar las mediciones de alta resolución de biomoléculas en aire.

1.3. Calibración de los piezoelectricos

La microscopía de fuerzas reconstruye la topografía de la muestra basada en barridos sucesivos línea a línea sobre la superficie. Por ello, se requiere calibrar el movimiento de los piezoelectricos en los ejes X, Y y Z [32, 33].

Existen patrones de calibración que permiten asociar el voltaje aplicado al piezoelectrico con la distancia que este recorre. Como se sabe la distancia entre motivos y/o la altura del patrón de calibración hay que corregir las sensibilidades en nm/V, la histéresis, la ortogonalidad y otros parámetros para lograr que las dimensiones de la imagen de AFM se correspondan con las del patrón. La figura 1.4 muestra la imagen de un patrón después de corregir los parámetros de los piezoelectricos en X e Y. De manera general, el error máximo permitido durante la calibración es del 5 %. Los piezoelectricos deben ser comprobados periódicamente para verificar si necesitan ser recalibrados.

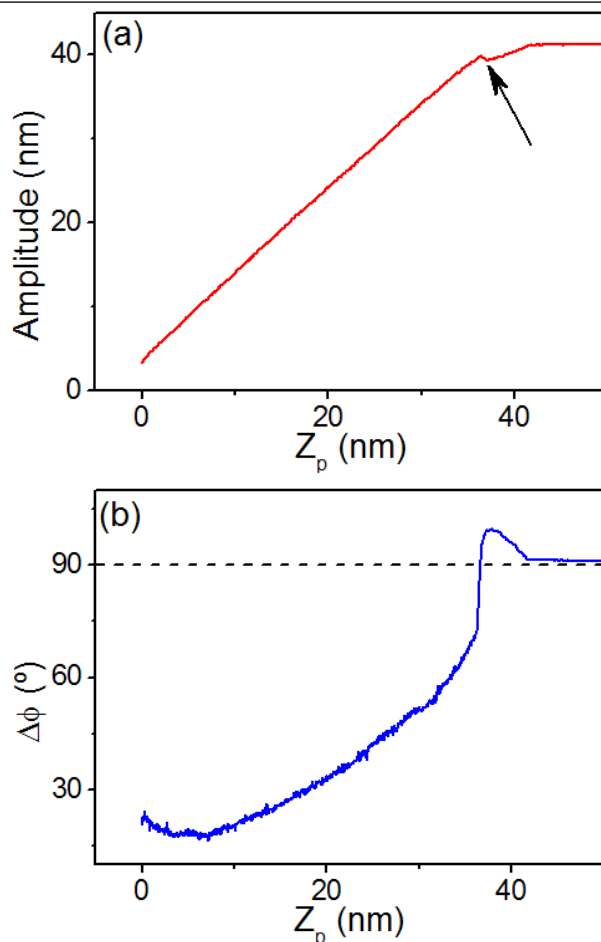


Figura 1.3 – Curvas de fuerza dinámicas típicas de amplitud (a) y de desfase $\Delta\phi$ (b) frente al movimiento del piezoeléctrico Z_p en la dirección vertical. La flecha en la curva de fuerza de amplitud indica el punto en el que el régimen de oscilación pasa de ser atractivo a repulsivo. Palanca TESP SSS (Nanosensors) k 2 N/m, $f_0 = 130$ kHz, $R < 5$ nm. Muestra mica en aire.

Los patrones de calibración comerciales tienen dimensiones en el rango de las decenas de nanómetros hasta algunos micrómetros. Por este motivo a veces se utilizan materiales cuyas distancias interatómicas o intermoleculares son conocidas (por ejemplo: la mica, la calcita, el HOPG y las bacteriorodopsinas de la membrana púrpura) para comprobar que los parámetros de calibración introducidos son correctos.

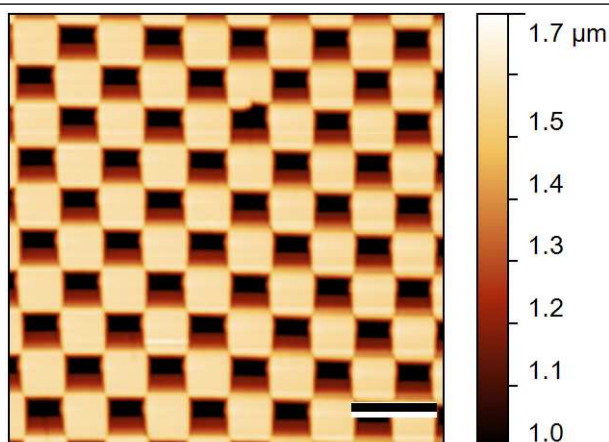


Figura 1.4 – Imagen AFM de un patrón TGX11 después de calibrar los piezoeléctricos en las direcciones X e Y. La distancia entre los motivos de patrón es de $10 \mu\text{m}$ y la profundidad es $1,8 \mu\text{m}$. Barra: $10 \mu\text{m}$.

1.4. Procesamiento de las imágenes

Las imágenes de AFM requieren un procesamiento para corregir las diferencias entre líneas de barrido provocadas por ruido térmico, por la trayectoria en forma de arco para barridos largos del piezoeléctrico y por el desalineamiento entre la punta y la superficie de la muestra entre otros factores. En general, todos los AFM comerciales traen su propio programa para la corrección de las imágenes. Adicionalmente existen programas gratuitos para el procesamiento de las imágenes. En este trabajo, además de los programas propios de los AFM, se han utilizado los programas libres Gwyddion (<http://gwyddion.net/>) e ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para procesar las imágenes.

Se puede decir que es apropiado hacer un procesamiento que no implique pérdida de información. En este caso se pueden indicar la sustracción de una superficie de orden 1 ó 2 en X e Y y la corrección línea por línea. También se suelen utilizar filtros pasa bajos, promediación, gaussianas, transformadas de Fourier y Wavelet, que deben utilizarse cuidadosamente para no introducir información falsa en la imagen obtenida.

La figura 1.5a muestra una imagen de topografía de la superficie de la membrana púrpura como se recoge en el AFM. Se puede ver que el rango en la dirección vertical es de 3 nm. La figura 1.5b muestra la imagen procesada mediante la sustracción un plano de orden 2, corrección de la mediana línea a línea y aplicación de un filtro gaussiano de 3×3 píxeles. Los trímeros de bacteriorhodopsinas

quedan expuestos con el arreglo bidimensional característico y una distancia promedio entre trímeros de 6,5 nm.

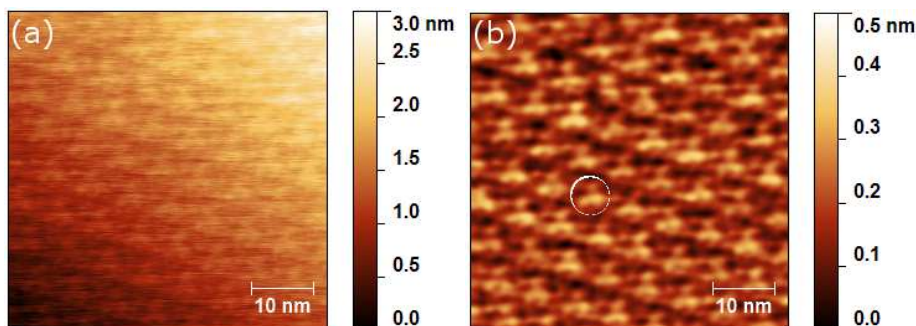


Figura 1.5 – (a) Superficie de la membrana púrpura tal y como fue recogida por el AFM. (b) Imagen corregida donde se pueden observar los trímeros de bacteriorodopsinas en un arreglo bidimensional, a una distancia de 6,5 nm. El círculo encierra un trímero de bacteriorodopsinas. Modo AM-AFM en medio líquido. Palanca MAC VI (Agilent).

1.5. Motivación

La primera parte de la tesis está dedicada a la microscopía de fuerza modulada en amplitud. Con esta técnica se pueden observar proteínas aisladas en condiciones ambientales con resolución submolecular [34]. Recientemente ha sido propuesto un método para determinar experimentalmente el grado de degradación de la punta de la palanca [35]. En este trabajo se discuten las condiciones necesarias para obtener imágenes de alta resolución de manera reproducible.

Por otra parte, las aplicaciones de la microscopía de fuerza a las investigaciones médicas son de alto interés. Este es el caso del estudio de la interacción del anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (CIM, La Habana) y su blanco, el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Llevar a cabo una investigación de este tipo implica apoyar la microscopía de fuerza con otras técnicas de análisis como son la descripción cinética del sistema, ensayos ELISA y electroforesis en gel de poliácridamida. La ventaja del microscopio de fuerzas es que permite realizar estudios estadísticos de la masa molecular de las partículas depositadas en la muestra [36] y, al mismo tiempo, individualizar en el estudio de los elementos de la población al visualizarlos con alta resolución.

La relación entre energía disipada y contraste de fase observado en las imágenes de microscopía de fuerza modulada en amplitud en aire ha sido estudiada y

descrita satisfactoriamente [37, 25, 38, 26]. En medio líquido esta relación requiere un análisis más complejo que en aire, porque se deben incorporar al análisis los armónicos generados [39, 29, 40, 31]. En la tesis se toma como punto de partida una de las aproximaciones al problema [31] y se desarrolla para ofrecer un método experimental para determinar la energía disipada en medio líquido.

En la segunda parte de la tesis se emplea la microscopía de fuerza a nivel celular. Se conoce que las células cancerosas son más blandas que las no-malignas. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de la relación entre las propiedades elásticas de las células y su grado de malignidad. En este trabajo se combinan las microscopías de fuerza y de fluorescencia para estudiar el citoesqueleto de actina de cuatro líneas de células de la vejiga de origen epitelial, una de ellas no-maligna, las otras con diferente grado de malignidad. La estimación de la elasticidad celular se hace mediante espectroscopía de fuerzas.

Capítulo 2

Microscopía de fuerza modulada en amplitud con alta resolución en aire

En este capítulo se discuten aspectos prácticos de la microscopía de fuerzas relacionados con la resolución en aire. Los temas que se abordan son la evolución del radio de la punta al medir con AM-AFM y las condiciones necesarias para lograr la mayor resolución posible al tomar imágenes con resolución submolecular. Se discute con mayor profundidad la estrategia para proteger la punta de la palanca del desgaste y se ofrecen algunas recomendaciones empíricas para aumentar la resolución cuando se mide en condiciones ambientales.

La aparición del microscopio de fuerza (AFM) [1] significó la apertura de las ciencias de la vida al mundo de la nanotecnología. La visualización y manipulación de biomoléculas y biosuperficies bajo condiciones fisiológicas ha revolucionado la manera en la que los investigadores estudian las estructuras biológicas a nivel molecular. El AFM provee imágenes tridimensionales de la superficie con gran resolución y sólo requiere métodos relativamente sencillos de preparación de la muestra [12]. Los estudios de reconocimiento molecular entre los receptores y sus ligandos son también de suma importancia en biología [41].

Alcanzar resolución molecular en sistemas biológicos es más difícil que en el caso de las superficies cristalinas inorgánicas [42]. En general, las fuerzas aplicadas deben ser inferiores a 300 pN [12]. A su vez, resulta más difícil visualizar moléculas aisladas que estructuras bidimensionales cristalinas o semicristalinas donde el empaquetamiento molecular alivia las fuerzas ejercidas por la punta sobre la muestra (ejemplo, las membranas celulares [12] y las proteínas chaperonas GroEL fijadas con glutraldehído [43]).

Una de las estrategias seguidas para minimizar la fuerza aplicada fue la implementación del modo microscopía de fuerza modulada en amplitud (AM-AFM), que ha sido estudiado exhaustivamente en el grupo de Ricardo García (CSIC, Madrid, España) [34, 44, 38, 26, 27, 31]. La AM-AFM es un modo de medición que está disponible actualmente en la mayoría de los AFM comerciales.

La figura 2.1a muestra un anticuerpo IgG reportado con resolución de 20 Å en el PDB (en inglés, *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)) [45]. Los IgG son proteínas de 150 kDa formadas por tres lóbulos, dos Fab y otro Fc. Cada lóbulo tiene aproximadamente 50 kDa por tanto no existe diferencia significativa en masa entre los fragmentos aunque el Fc tiene una pequeña cadena de carbohidratos en su estructura. La especificidad en el reconocimiento de los antígenos está determinada por pequeños cambios en la región variable de los Fab. La distancia medida entre los centros de los Fab fue de 10,2 nm. Las distancias relativas entre fragmentos no son fijas porque la región que los conecta tiene una gran flexibilidad. Además, el sustrato puede provocar cambios en la estructura de los anticuerpos [46, 47] que serán abordados en detalle en el próximo capítulo.

El trabajo publicado por San Paulo y García en el año 2000 [34] resulta de especial interés porque lograron obtener imágenes de IgG con resolución submolecular en condiciones ambientales (figura 2.1b). Varias moléculas de la imagen muestran los tres lóbulos expuestos. La conclusión a la que llegaron fue que había que intentar realizar las mediciones minimizando la fuerza aplicada. En este caso, midieron en modo atractivo con una amplitud libre $A_0 = 5$ nm y una amplitud de trabajo de $0,86A_0$. Cuando se realizó un barrido en modo repulsivo con amplitud $A \approx 0,5A_0$ las moléculas fueron destruidas.

Por otra parte, se sabe que la resolución está determinada por el radio de la punta. La imagen de AFM es una convolución de la punta y la muestra. Este fenómeno es más acusado cuando las dimensiones del objeto medido son menores que el radio de la punta; este es el caso de las proteínas. Los algoritmos para corregir este efecto requieren que se conozca la forma de la punta. Esto se logra tomando imágenes de microscopía electrónica de la punta, o midiendo una estructura nanométrica de forma conocida pero esto trae complicaciones experimentales que en muchos casos no se justifican [36].

Recientemente Santos *et al.* [35] publicaron un trabajo donde explican la relación existente entre la amplitud crítica a la cual ocurre la oscilación biestable de la palanca y el radio de curvatura. Dicha amplitud crítica es un observable que sirve para hacer un seguimiento del radio de la palanca.

La humedad relativa es otro factor a tener en cuenta. Las puntas comerciales

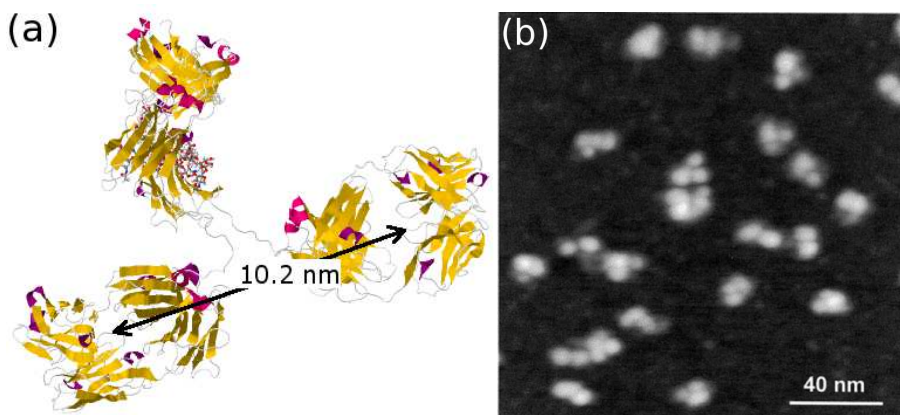


Figura 2.1 – (a) Representación gráfica de la estructura 1IGT del PDB de un anticuerpo tipo IgG. La distancia fue medida entre dos fragmentos Fab. (b) Imagen AM-AFM de anticuerpos IgG con resolución molecular. (Tomado de [34]).

son comúnmente de silicio (que tiene siempre una capa nativa de óxido) o de nitruro de silicio; las muestras están generalmente depositadas sobre silicio, mica o vidrio. Todos estos materiales son hidrofílicos. La humedad del ambiente se condensa sobre estas superficies formando capas de agua que pueden afectar la medición por AFM en aire. Cuando se acerca la punta a la muestra se condensa agua que da origen a las llamadas fuerzas capilares [48]. Disminuir la humedad relativa es una buena práctica para mejorar la calidad de las mediciones en aire [10]. No obstante se ha demostrado que para puntas muy afiladas (con radio $R < 15$ nm) la adhesión entre punta y muestra aumenta suavemente al disminuir la humedad relativa [49].

2.1. Evaluación del desgaste de la punta durante el barrido

Como se ha visto en el capítulo anterior, al realizar experimentos de AM-AFM se pueden tener dos tipos de regímenes: en uno la fuerza neta es atractiva durante el ciclo de oscilación, en el otro, la fuerza neta es repulsiva. El cambio de fase entre la señal de excitación y la respuesta de la palanca indica el tipo de régimen de oscilación en tiempo real. La figura 2.2a muestra una curva de fuerza atractiva ($\Delta\phi > 90^\circ$ para cualquier valor de amplitud A de trabajo). La curva corresponde a una palanca TESP-SS (Bruker) oscilando sobre mica, a temperatura ambiente y 35 % de humedad relativa.

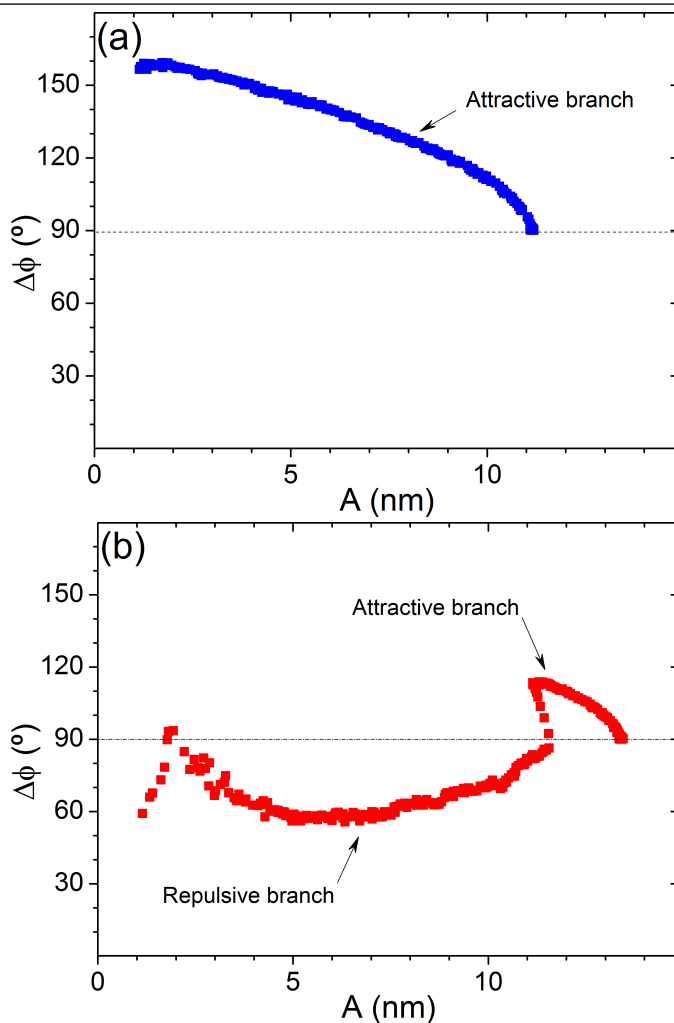


Figura 2.2 – Curvas de fuerza típicas de fase $\Delta\phi$ contra amplitud de la oscilación A . (a) La interacción neta entre la punta y la muestra es atractiva para cualquier valor de amplitud de trabajo ($\Delta\phi > 90^\circ$). (b) Coexistencia de dos regímenes de oscilación uno atractivo y otro repulsivo ($\Delta\phi < 90^\circ$). Palanca: TESP-SS (Bruker). Muestra: mica en aire.

En general, cuando se hace oscilar una palanca con una amplitud libre pequeña (digamos $A_0 < 5$ nm) sobre una superficie dura (mica, HOPG, Si) en aire, las curvas de amplitud y fase mostrarán que el régimen de oscilación es atractivo.

Si se aumenta paulatinamente la amplitud de la oscilación se llega a un punto en el que comienzan a verse dos tipos de curvas, las que presentan solo modo atractivo ($\Delta\phi > 90^\circ$), y otras en las que hay saltos al modo repulsivo ($\Delta\phi < 90^\circ$). En la curva mostrada en la figura 2.2b se ve cómo la fase era 90° a la amplitud

libre $A_0 = 13,4$ nm. Cuando la punta se acerca a la muestra la amplitud disminuye y el régimen es atractivo, pero al llegar a 11 nm la amplitud aumenta nuevamente hasta 12 nm. Nótese que en el rango de 11 – 12 nm de amplitud hay 2 ó 3 valores de fase. A estas curvas las vamos a llamar biestables.

Si se sigue aumentando la amplitud se llega a un punto en el que todas las curvas de fuerza que se realicen tendrán una región atractiva y otra repulsiva. El valor de amplitud libre en el que se tienen sólo curvas biestables fue denominado por Sergio Santos *et al.* [35] como amplitud crítica máxima A_c^{\max} . En este trabajo se tomó como criterio que al menos 10 curvas consecutivas fueran del mismo tipo para estimar A_c^{\max} . Al disminuir la amplitud libre se llega a un punto en el que nuevamente sólo tendremos curvas en el régimen atractivo. Este punto lo denominamos amplitud crítica mínima A_c^{\min} .

Santos *et al.* definen la amplitud crítica A_c como:

$$A_c = \frac{A_c^{\max} + A_c^{\min}}{2} \quad (2.1)$$

con un error¹ ΔA_c :

$$\Delta A_c = \frac{A_c^{\max} - A_c^{\min}}{2} \quad (2.2)$$

Desde el punto de vista experimental resulta relevante la relación que existe entre el radio de la punta R y la amplitud crítica A_c , que están relacionados por la ecuación empírica [35]:

$$R = CA_c^n \quad (2.3)$$

donde C y n son constantes determinadas experimentalmente y van a depender del tipo de palanca, de la muestra y de las condiciones ambientales. Sus valores fueron obtenidos ajustando los datos experimentales a la información recogida por microscopía electrónica de barrido (SEM). El valor del coeficiente n fue generalmente $n \approx 1,1$.

La ecuación (2.3) permite estimar la relación entre el radio de la punta usada R y la punta nueva R_0 como:

$$\frac{R}{R_0} = \left(\frac{A_c}{A_{c0}} \right)^{1,1} \quad (2.4)$$

donde se ha tomado $n = 1,1$.

¹El término "error" aquí es entendido como rango, ya que como se explicó, entre A_c^{\max} y A_c^{\min} podemos encontrar tanto curvas en régimen puramente atractivo como biestables.

Nótese que la ecuación (2.4) no depende de la constante C . Para su implementación se debe medir la amplitud crítica A_c y seguir su evolución al someter la punta a cargas cada vez mayores.

Las mediciones se llevaron a cabo en el AFM Dimension, con controlador Nanoscope V (Bruker) en condiciones ambientales. La muestra utilizada fue mica. Se estudiaron dos tipos de palancas comerciales: las TESP-SS (Bruker) y las NCH (Nanosensors). Ambos tipos de palancas tienen parámetros similares de frecuencia de resonancia $f_0 \approx 300$ kHz y constante de fuerza $k \approx 40$ N/m; difieren en el radio inicial que es $R_0 < 5$ nm (típico 2 nm) para las TESP-SS y $R_0 < 10$ nm (típico 7 nm) para las NCH.

A continuación se describe el protocolo para medir la amplitud crítica A_c mientras se va embotando la punta de la palanca paulatinamente. Es una adaptación de lo que proponen Santos *et al.* [35] para embotar la punta sin causarle grandes daños.

1. Se comienza a medir con una punta nueva a una amplitud baja ($A_0 < 5$ nm. A esta amplitud el régimen fue atractivo en todas las palancas estudiadas).
2. Se realizan curvas de fuerza aumentando ligeramente² la fuerza de excitación F_d hasta que las curvas consecutivas (al menos 10) sean biestables y se toma este valor como amplitud crítica máxima A_c^{\max} .
3. Se disminuye F_d hasta que las curvas consecutivas (al menos 10) presenten sólo régimen atractivo y se toma este valor como amplitud crítica mínima A_c^{\min} .
4. Se determina el valor de la amplitud crítica y su error utilizando las ecuaciones (2.1) y (2.2) respectivamente.
5. Para embotar la punta sin causar grandes daños, se barre un área de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ a 1 Hz en modo repulsivo: $A_{sp} = 0,7A_0$, siendo la amplitud libre un 50% mayor que la amplitud crítica máxima ($A_0 = 1,5 A_c^{\max}$).
6. Se repite el proceso desde el paso número 2. Si la amplitud crítica no cambia se aumenta la carga aplicada, de modo que en el paso 5 $A'_0 = 1,5A_0$ (nótese que la nueva amplitud libre será $2,25A_c$) y así sucesivamente.

El barrido en modo repulsivo embota la punta de manera controlada y esto provoca que la amplitud crítica aumente paulatinamente. En este capítulo nos referire-

²En este caso se aumentaba la fuerza de excitación de modo que la variación de la amplitud libre resultante fuera menor que 0,5 nm.

mos a este barrido como la carga aplicada a la palanca y lo vamos a caracterizar por la amplitud libre A_0 del paso número 5.

La figura 2.3 muestra cómo cambia la amplitud crítica en función de la carga aplicada para una palanca TESP-SS (Bruker). Al inicio, cada nuevo barrido en modo repulsivo provocaba un aumento de la amplitud crítica y por tanto del radio de la punta (ecuación (2.3)). La punta fue muy estable cuando la amplitud crítica llegó a 12 nm. El radio no cambió tras sucesivos barridos con amplitudes cada vez mayores en modo repulsivo. Finalmente la amplitud crítica volvió a aumentar al barrer la superficie con una amplitud $A = 44$ nm ($A_0 = 63$ nm). El mismo procedimiento se aplicó a otra palanca TESP-SS (Bruker) y a 4 palancas NCH (Nanosensors).

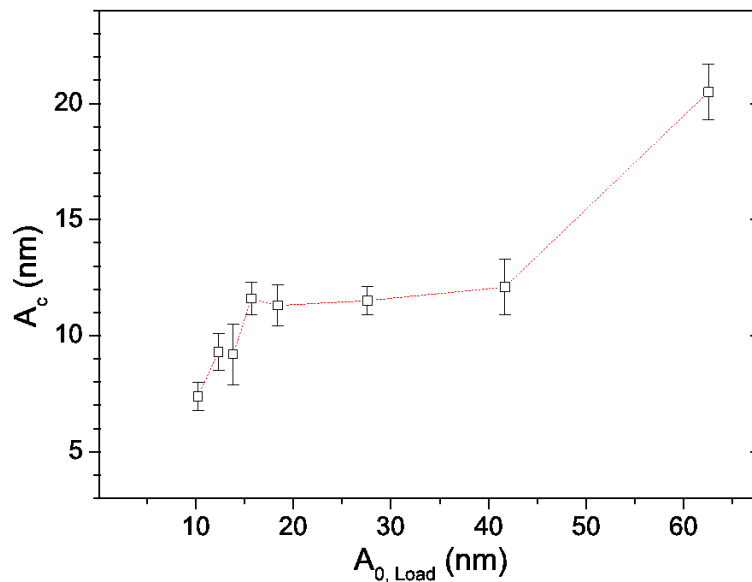


Figura 2.3 – Amplitud crítica A_c estimada tras someter la palanca a barridos en modo repulsivo a amplitud de $0,7A_{0, Load}$. Palanca TESP-SS (Bruker), muestra mica en aire.

La amplitud crítica de por sí no ofrece mucha información. En la práctica resulta más útil calcular el radio normalizado respecto a su valor inicial (R/R_0) mediante la ecuación (2.4). La figura 2.4 muestra la evolución del radio de la punta de las palancas estudiadas. Como se puede observar para todos los puntos $R/R_0 > 1$. En las condiciones en las que se realizó el experimento el radio de la punta de todas las palancas aumentó. De hecho, la tendencia general del radio es a aumentar paulatinamente. Sin embargo, las flechas indican puntos para los cuales al aumentar la carga el radio de la punta disminuye. Esto significa que ocasionalmente al medir en modo repulsivo la punta se “afila”.

Según la figura 2.4b el radio final de la punta NCH 4 fue $\sim 5,5$ veces el radio inicial. La figura 2.5a muestra una imagen SEM de esta palanca, tomada después del experimento. La flecha indica la zona de la punta que interactúa con la superficie. En el barrido de mayor resolución (figura 2.5b) se puede apreciar el embotamiento de la punta de la palanca. En vez de una punta afilada, se tiene una pirámide truncada en el extremo. El área medida de la zona triangular que funciona como punta es de 3222 nm^2 . Si tomamos como referencia una geometría circular, el radio equivalente sería de 32 nm. De acuerdo a las estimaciones de la figura 2.4b el radio había aumentado alrededor de 5,5 veces. De este modo se puede inferir que el radio inicial de esta palanca $R_0 = R_{eq}/5,5 = 5,8 \text{ nm}$. Esto coincide con los valores del fabricante que garantiza un radio menor que 10 nm, típico 7 nm.

Los resultados indican que no hay mejor punta que una punta nueva. No obstante a ello, también se puede inferir que si se trata con mucho cuidado, una palanca comercial puede dar buenos resultados para medir con alta resolución. Durante el proceso de fabricación a veces quedan asperezas que pueden funcionar como puntas. En la próxima sección se muestra cómo se pueden obtener imágenes de alta resolución al medir anticuerpos IgG con puntas NCH (Bruker) cuyo radio típico es de 7 nm.

2.2. Imágenes de anticuerpos IgG con resolución submolecular

Para preparar las muestras de anticuerpos IgG, se depositó una gota de una solución de anticuerpos Nimotuzumab (CIM, Habana) con concentración $0,25 \mu\text{g/mL}$ en mica recién exfoliada durante 30 s. Se lavó con agua milliQ para eliminar las moléculas débilmente pegadas a la superficie. Finalmente se secó la muestra con nitrógeno (gas).

Las mediciones se realizaron en un AFM Dimension con controlador Nanoscope V (Bruker). Se utilizó una palanca nueva de tipo NCH (Bruker) para medir los anticuerpos. Antes de medir, se bajó la humedad relativa de la cámara del AFM hasta que el valor fue $\text{HR} < 5\%$ y luego se hizo un falso enganche y se estuvo midiendo media hora dando tiempo a que se estabilizara el sistema. En el falso enganche los piezos mueven la muestra como si fuera un barrido real, pero la punta se encuentra lejos de la superficie.

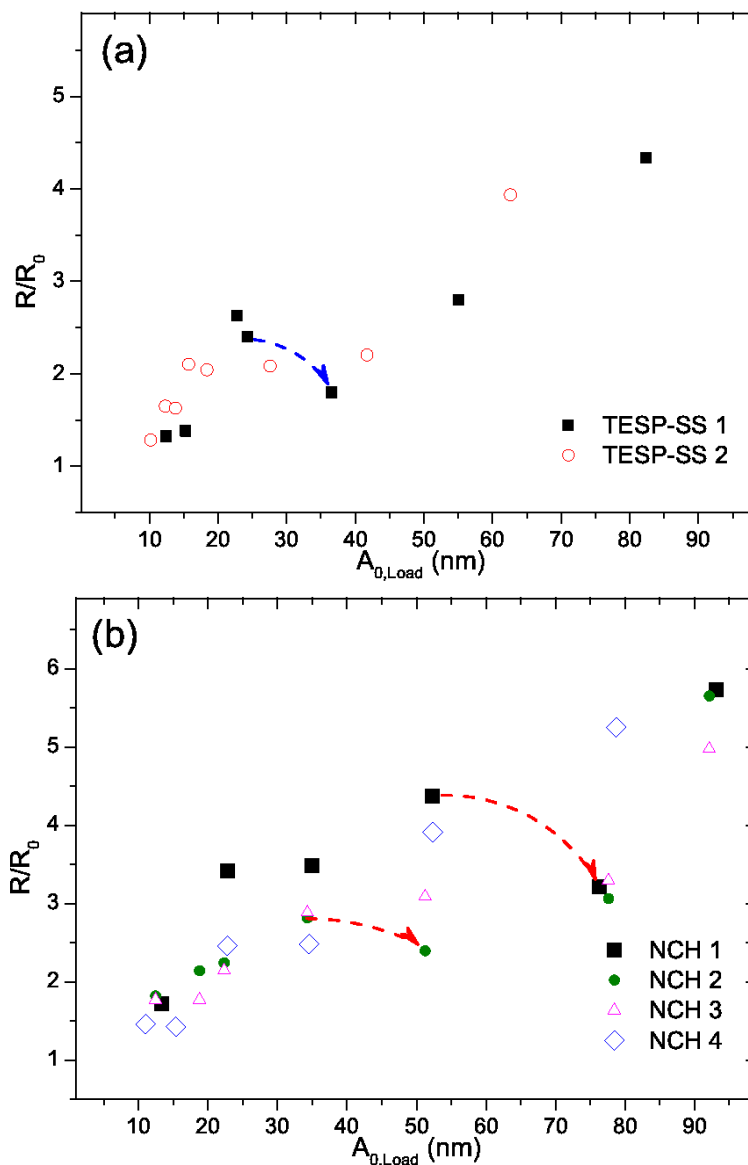


Figura 2.4 – Radio de la punta normalizado a su valor inicial R/R_0 calculado después de someter la palanca a un barrido en modo repulsivo al 70% de la amplitud libre $A_{0,Load}$. (a) Palanca TESP-SS(Bruker) con radio típico $R_0 = 2$ nm. (b) Palanca NCH (Nanosensors) con $R_0 = 7$ nm. Las flechas indican puntos en los que el radio de la punta disminuyó tras el barrido en modo repulsivo. Mediciones al aire, sobre mica, a temperatura ambiente y 35% de humedad relativa.

Al utilizar un valor bajo de humedad relativa la estructura de la proteína no se ve afectada pero se evita que se formen capas de agua sobre la muestra que

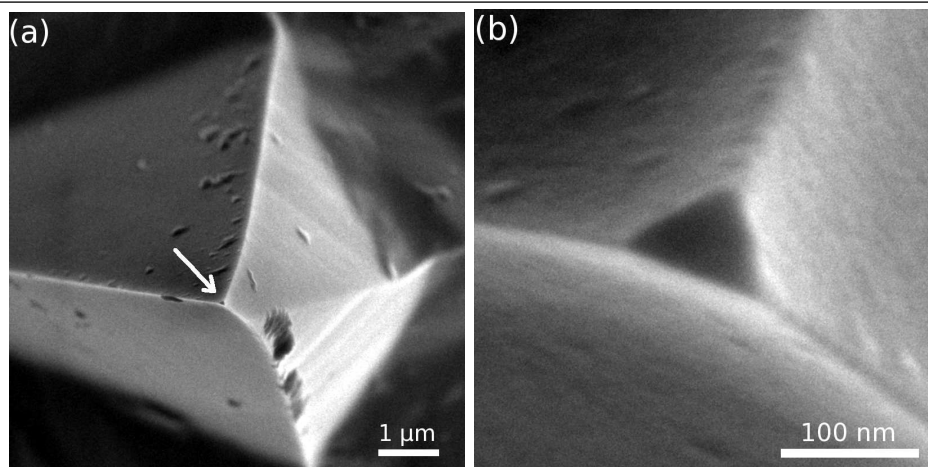


Figura 2.5 – (a) Imagen SEM de la punta de la palanca NCH 4 de la figura 2.4b. (b) Barrido de mayor resolución en la zona del extremo de la palanca marcada con una flecha en (a). (Imagen cortesía del grupo de Yves Huttel, ICMM,CSIC, España).

podieran dificultar la resolución lateral de la medición.

La figura 2.6(a-c) muestra los anticuerpos IgG visualizados con una palanca NCH (Bruker). Se debe recordar que esta palanca tiene la punta con radio típico $R = 7$ nm y sin embargo se ven varios anticuerpos con los tres lóbulos expuestos y con resolución lateral igual de buena que la de otras mediciones realizadas con puntas muy afiladas (radio típico de 2 nm) en AM-AFM [34] (figura 2.1b) y AFM bimodal [27]. La altura medida de los anticuerpos es menor que la esperada (figura 2.6d). Esto es común que ocurra cuando se miden biomoléculas. Una explicación razonable es que la altura aparente está influenciada por las interacciones de Van der Waals entre la punta y el sustrato que soporta la proteína [50, 36].

2.3. Discusión

La microscopía de fuerza modulada en amplitud ha permitido visualizar moléculas aisladas con alta resolución. Los IgG han sido estudiados regularmente por AFM. En el trabajo de San Paulo y García [34] se proponía minimizar la fuerza aplicada para visualizar las moléculas sin dañar su estructura. Para ello recomendaban medir los IgG en modo atractivo. En este capítulo se ha profundizado en otros factores que contribuyen a que se puedan medir exitosamente los anticuerpos IgG en condiciones ambientales.

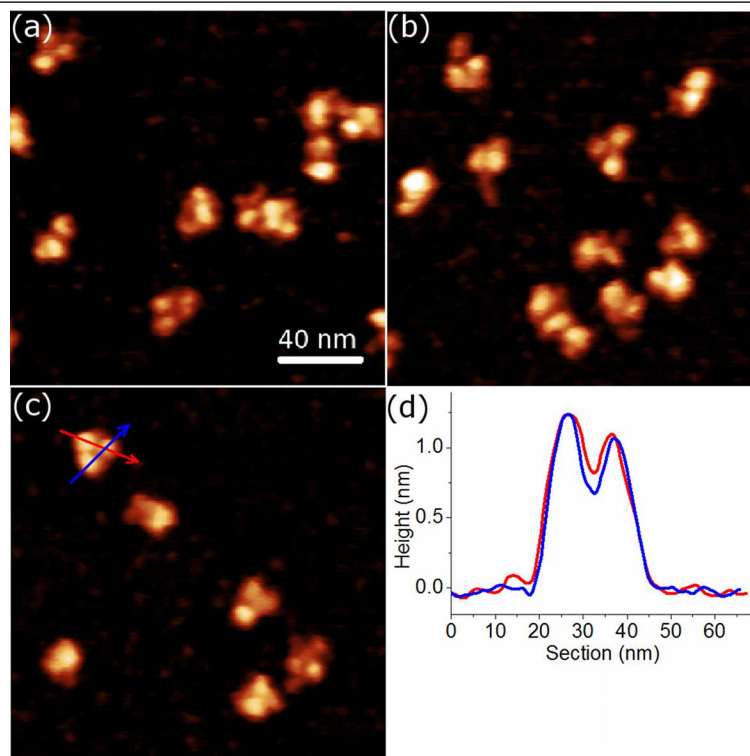


Figura 2.6 – (a-c) Imágenes AM-AFM de IgGs con alta resolución tomadas con palancas NCH (radio típico $R = 7\text{nm}$) en aire a $\text{HR} < 5\%$. La amplitud libre fue $A_0 = 13\text{ nm}$ y la amplitud de trabajo $A_{\text{sp}} = 0,95A_0$. Barrido a $1,95\text{ Hz}$ con resolución de 1 nm/px . La escala vertical es $1,5\text{ nm}$. (d) Perfiles a lo largo de las secciones mostradas en (c).

Uno de los factores fundamentales que determinan la resolución es el radio de la punta. Resulta relevante que Santos *et al.* [35] hayan podido correlacionar la amplitud crítica con el radio de la punta. La posibilidad de adquirir curvas de fuerza de amplitud y fase está implementada en los AFM comerciales, de modo que determinar la amplitud crítica de las palancas es una tarea que se puede llevar a cabo de manera rutinaria. Si se conoce el valor de amplitud crítica inicial se puede evaluar la degradación de una palanca en específico durante las sesiones de experimentos. Basta medir la amplitud crítica inicial y la amplitud crítica durante los experimentos para tener una estimación rápida de cuánto ha variado el radio de la punta mediante la ecuación (2.4).

El protocolo propuesto por Santos *et al.* [35] se adaptó para medir la amplitud crítica en palancas comerciales. Los resultados de la figura 2.4 muestran que en general la amplitud crítica aumenta con el uso. En algunos casos la punta se “afila”

pero nunca llega a los valores iniciales. Esto implica que no hay mejor palanca que una palanca nueva. Existen métodos para limpiar la contaminación orgánica de las palancas. Sin embargo estos métodos no pueden regenerar el radio de la punta. En específico las puntas de silicio tienden a romperse formando una estructura similar a un cono truncado [49]. Esto se verificó en una de las puntas comerciales utilizadas que fue posteriormente medida por SEM. El radio inicial de la punta estimado coincidió con el valor que provee el fabricante.

Para proteger las palancas, se recomienda utilizar amplitudes de trabajo cercanas a la amplitud libre (85 – 99 % de la amplitud libre) de modo que se contrarreste el daño que se le pueda causar a la palanca durante la medición. Por otra parte se recomienda que las amplitudes de trabajo sean las más pequeñas posibles. Si se analiza en detalle, estos principios están presentes en el trabajo de San Paulo y García (como por ejemplo los IgG mostrados en la figura 2.1b) en el que usaron amplitudes libre de 5 – 6 nm y amplitudes de trabajo mayores que el 85 % de la amplitud libre.

Para demostrar la validez de los conceptos antes expuestos se midieron IgGs con una palanca comercial NCH (Nanosensors) cuyo radio típico $R = 7$ nm. La figura 2.6 muestra que es posible tener resolución submolecular con puntas que se espera sean relativamente gruesas si se eligen cuidadosamente los parámetros experimentales.

2.3.1. Consejos para obtener imágenes de alta resolución

Llegado este punto, se pueden emitir algunos consejos relacionados con la operación en modo modulación de la amplitud con alta resolución. No es un protocolo porque no son pasos fijos que se puedan seguir y, por otra parte, seguirlos al pie de la letra no garantiza el éxito. Los puntos que se enumeran pueden servir de complemento a los manuales de usuario de los AFM comerciales.

- Siempre que sea posible utilizar una palanca nueva para medir con alta resolución ya que el desgaste hace que el radio de la punta aumente y, aunque a veces con el uso el radio de la punta disminuye, nunca se recupera el valor inicial.
- Dejar que el sistema se termalice. Se recomienda hacer un barrido en “falso enganche”³ durante al menos media hora antes de pasar a medir.

³En inglés, *false engage*. Se indica al sistema que ya ha alcanzado la superficie, cuando todavía se encuentra muy lejos de esta.

- Utilizar amplitudes libres pequeñas (en mi experiencia 5 – 10 nm) y amplitudes de trabajo altas. Pudiera ser en modo repulsivo (debe notarse que mientras más afilada la punta, menor será la amplitud crítica).
- Corregir la posición del pico de resonancia cerca de la superficie y corregir la posición del pico mientras se mide. Una desviación de 100 Hz cuando se mide a 300 kHz representa el 0.03 % de la frecuencia de resonancia. Sin embargo en la práctica unos pocos hertzios pueden significar la diferencia entre una buena y una mala imagen.
- Controlar la humedad relativa. En Madrid la humedad suele ser del 35 % (aceptable) durante buena parte del año, pero en La Habana suele ser de más del 80 % (inaceptable, se crean capas de agua sobre la muestra que afectan la resolución). Se puede disminuir la humedad relativa con nitrógeno. Se ha comprobado que los anticuerpos IgG no pierden su conformación tridimensional a humedades relativas inferiores al 5 %.

2.4. Conclusiones

La microscopía de fuerza modulada en amplitud permite obtener imágenes de anticuerpos IgG con resolución molecular en condiciones ambientales. Para lograr tal objetivo se deben cuidar las condiciones experimentales. Entre los puntos más importantes resaltan utilizar palancas nuevas, amplitudes libres bajas y amplitudes de trabajo cercanas a la amplitud libre. De esta manera se garantiza que el radio de la punta se mantenga lo más pequeño posible y que la fuerza aplicada sobre la molécula sea baja.

Los resultados obtenidos con los IgG se pueden extrapolar al estudio de otras moléculas aisladas en condiciones ambientales. En el próximo capítulo se aplican los conocimientos de este capítulo para estudiar el anticuerpo, su diana terapéutica (el receptor del factor de crecimiento epidérmico), el factor de crecimiento epidérmico y los complejos que forman.

Capítulo 3

Estudio del anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (hR3) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico

3.1. Introducción

En el capítulo anterior se discutieron las condiciones necesarias para medir proteínas aisladas con alta resolución en condiciones ambientales. De hecho, las imágenes de IgG mostradas en la figura 2.6 corresponden al anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (también conocido como hR3). En este capítulo se muestran resultados experimentales de mediciones por microscopía de fuerza, combinada con técnicas bioquímicas con las cuales se busca dilucidar el mecanismo de acción del anticuerpo.

3.1.1. Mecanismo de activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico

El crecimiento descontrolado de las células tumorales está soportado por un incremento de producción de factores de crecimiento epidérmico y una sobreexpresión de sus receptores afines localizados en la membrana celular. Ambos fenómenos activan vías de señalización en cascada que implican la proliferación de las células cancerosas e inducen procesos de angiogénesis y metástasis. La mayoría de los cánceres humanos epiteliales presentan una marcada sobreexpresión de factores de crecimiento [51].

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como HER-1 y ErbB-1, es una proteína de membrana que tiene una función esencial en el proceso mitogénico de las células de origen epitelial. Su activación puede ser desencadenada por varias moléculas, entre ellas el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [51, 52, 53].

La figura 3.1 muestra el mecanismo de acción del receptor. Existen dos conformaciones fundamentales que puede adoptar el EGFR: una inactiva, y otra activa. Cuando se encuentran dos receptores en conformación activa se forma un dímero que a su vez genera una señal de crecimiento celular. El papel del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es estabilizar la conformación activa del receptor. De este modo, el EGF favorece el equilibrio a favor de la conformación activa [54]. En estado basal, ambas conformaciones se encuentran en equilibrio en la membrana celular con aproximadamente el 85% de las moléculas de EGFR en la conformación inactiva, y el 15% en la conformación activa o de dimerización.

Se ha reportado una sobreexpresión de este tipo de receptor en células de diversos tumores humanos. Por este motivo el receptor constituye un blanco molecular importante para las terapias del cáncer [55]. En años recientes han sido esclarecidos varios mecanismos mediante los cuales diferentes anticuerpos monoclonales inhiben la transducción de la señal de crecimiento a través del EGFR. Por ejemplo, el anticuerpo Cetuximab se une al dominio III, bloqueando la unión del EGF e interfiriendo con la conformación activa del EGFR [56]. El anticuerpo Nimotuzumab también se une al dominio III, aunque el sitio de unión es ligeramente diferente al del Cetuximab [52].

3.1.2. Anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (hR3)

El Nimotuzumab (CIM, Habana) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio extracelular del EGFR e inhibe la unión del EGF. Al Nimotuzumab también se le conoce como hR3 y en el texto se la llamará indistintamente de uno u otro modo. Su uso para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello ha sido aprobado en varios países y se encuentra en fase de ensayo clínico para varios tipos de tumores. Una de las mayores ventajas del Nimotuzumab es la ausencia de efectos adversos severos; esto marca una gran diferencia respecto a la mayoría de los medicamentos que tienen como blanco al receptor del EGF [52, 51].

Modelaciones computacionales avaladas por un conjunto de datos experimentales [52] muestran que Nimotuzumab se une al dominio III del EGFR inhibiendo la unión del EGF, pero a la vez su orientación es compatible con la conformación

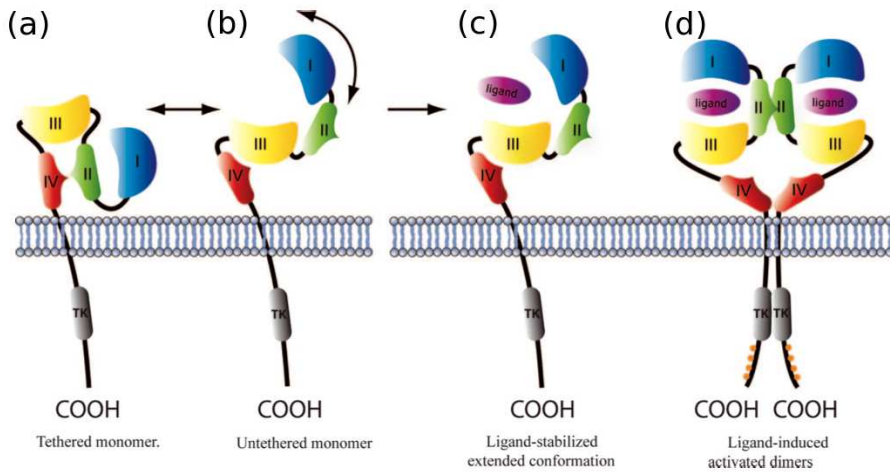


Figura 3.1 – Modelo del mecanismo de activación del EGFR. La región extracelular del EGFR está formada por cuatro dominios (I-IV), mientras que la región intracelular contiene un dominio tirosina-quinasa (TK). (a) Conformación inactiva del EGFR, en la cual los dominios I y III se encuentran separados y el dominio II se encuentra unido al IV. (b) Conformación activa, con los dominios I y III formando el sitio de unión del EGF, y el dominio II expuesto. (c) La unión del EGF estabiliza la conformación activa. (d) Dos moléculas de EGFR en la conformación activa forman un dímero, a través de la interacción de sus dominios II y IV. En esta conformación, los dominios TK interactúan entre sí, produciendo una reacción de fosforilación que desencadena la señal de crecimiento celular (tomado de [57]).

activa y la dimerización del EGFR. La figura 3.2 muestra el resultado de las simulaciones. Tres de los 4 dominios del receptor han sido representados en su conformación activa. El EGF se acopla en la hendidura que queda entre los dominios I, II y III. Al mismo tiempo se ha representado la zona de unión del anticuerpo al receptor por el dominio III. Existe un solapamiento espacial en las regiones que ocupan el anticuerpo y el EGF al unirse al receptor. Esto significa las dos moléculas no pueden estar unidos al receptor al simultáneamente. De esta manera el anticuerpo inhibe la unión del EGF al receptor. Hasta aquí el mecanismo es similar al del Cetuximab [56].

El Nimotuzumab se puede unir a células normales y cancerosas. Al inhibir la señal de división el tratamiento afecta también a las células sanas. Según el modelo computacional, el anticuerpo se puede unir al EGFR tanto en su conformación activa como en la inactiva, sin afectar el equilibrio natural existente entre ambas. Esto permite que las células sanas sobrevivan, pero no permite que las células cancerosas crezcan de manera aberrante. De este modo el anticuerpo “congela” el crecimiento tumoral [52].

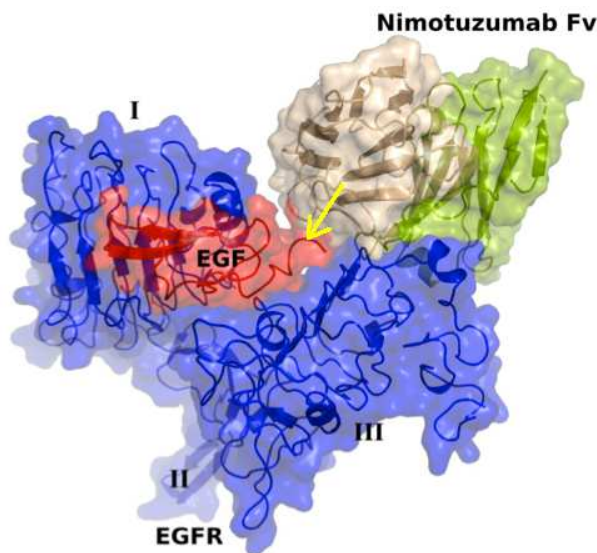


Figura 3.2 – Modelo computacional del complejo Nimotuzumab-EGFR. Se han representado en azul los dominios I, II y III del receptor en configuración activa, unidos al EGF (rojo). También se ha representado la zona variable del Fab (F_v) del anticuerpo (gris y verde). El anticuerpo se une al receptor por el dominio III. En la zona indicada por la flecha hay un solapamiento del EGF y el anticuerpo. Esto significa que por razones estéricas ambas moléculas no pueden estar unidas al receptor al mismo tiempo (adaptado de [52]).

El objetivo final de la investigación por AFM sería validar experimentalmente la hipótesis planteada a partir de los resultados de las simulaciones mostrados en la figura 3.2. Para ello se debe visualizar las conformaciones activa e inactiva del receptor, los dímeros de receptor, el complejo anticuerpo-receptor e identificar si el anticuerpo se puede unir tanto a la conformación activa como a la inactiva.

3.1.3. Estructura del anticuerpo y el receptor

La figura 3.3 muestra reconstrucciones del anticuerpo y el receptor basadas en estructuras reportadas en el *Protein Data Bank*. Las imágenes y la barra de escala se han generado utilizando el programa Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Debe tenerse en cuenta que solo se muestra una proyección bidimensional de las moléculas. Los pseudocolores permiten tener una mejor idea de la topografía de las moléculas pero no se corresponden con alturas. La figura 3.3a es un anticuerpo IgG (estructura 1IGT del PDB). Se indican cuáles son los fragmentos Fab y el Fc. La figura 3.3b es un receptor en conformación inactiva (estructura 1NQL del PDB). Se ha indicado la posición de los dominios I, II, III y IV del receptor. Nótese

como el dominio II, que tiene el brazo de dimerización, queda protegido en el interior de la estructura. Finalmente la figura 3.3c representa los dominios I al III de receptores formando un dímero de receptores (estructura 1IVO del PDB). Para mayor claridad solo se ha representado el *backbone* de uno de los receptores en conformación activa. En el otro se puede ver cómo en la conformación activa y durante la dimerización, el dominio II deja expuesto el brazo de dimerización. La línea discontinua representa la zona que ocuparía el dominio IV. Tanto en la conformación inactiva como en la activa el EGF se une al receptor en la zona que queda entre los dominios I y III.

Todas las moléculas representadas en la figura 3.3 han sido reportadas en el PDB con resolución subnanométrica. El tamaño del anticuerpo es ligeramente mayor que el del receptor tanto en conformación activa, como en conformación inactiva y el dímero podría ocupar un área similar. Esto de por sí hace que *a priori* la discriminación por microscopía de fuerza sea un problema de cuidado.

Por otra parte en el PDB se reportan estructuras obtenidas a partir de la cristalización de proteínas. Esto quiere decir que las moléculas están en posiciones congeladas. Se sabe que los anticuerpos IgG tienen una gran movilidad y que no tienen una posición preferente para caer sobre el sustrato (mica).

Sobre el receptor, se conocen sus configuraciones activa e inactiva pero ir de una posición a la otra implica un cambio conformacional cuyas posiciones intermedias (al ser inestables) no están reportadas (figura 3.1b). Estas conformaciones intermedias desconocidas en principio podrían aparecer en las imágenes de AFM.

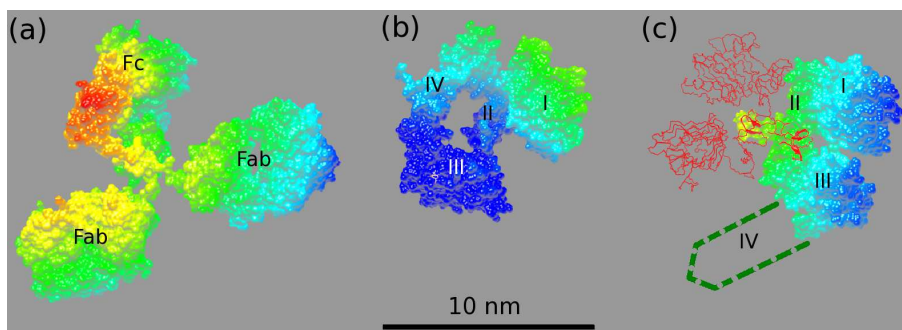


Figura 3.3 – Estructura del anticuerpo (a) el receptor en conformación inactiva (b) y un dímero (c) tomados de las estructuras 1IGT, 1NQL y 1IVO del PDB, respectivamente. De uno de los receptores del dímero se representa sólo el *backbone* para que se pueda apreciar, en el otro, la estructura del receptor en conformación activa. Los números romanos indican la posición de los dominios del receptor. La zona que ocupa el dominio IV del receptor en conformación activa se representa con líneas discontinuas.

3.1.4. Cambios conformacionales durante la adsorción de las moléculas a la superficie

En esta sección se abordan brevemente elementos relacionados con la adsorción de proteínas en la superficie. Cuando una proteína se adsorbe sobre una superficie puede sufrir cambios en su estructura. Las proteínas en su conformación nativa son estructuras altamente ordenadas. Cambios en las condiciones del medio como el pH, la concentración de sales o la temperatura podrían inducir un desplegamiento de la proteína e incluso llegar a su desnaturalización. En este caso vamos a entender como desplegamiento al proceso reversible y desnaturalización al proceso de desplegamiento irreversible [47].

Las proteínas están compuestas por una o más cadenas de polipéptidos conectadas internamente por puentes disulfuro y enlaces no covalentes. La estructura primaria está determinada por la secuencia de aminoácidos; la secundaria, viene dada por ordenamientos no covalentes entre aminoácidos de la cadena que forman estructuras ordenadas, principalmente α -hélices y β -láminas; la estructura terciaria está relacionada con el ordenamiento tridimensional de la proteína que, en general, en ambientes acuosos tiene un empaquetamiento de los residuos hidrófobos que evita el contacto con el agua y los residuos cargados expuestos al agua. Finalmente la estructura cuaternaria es la asociación de más de dos o más cadenas de polipéptidos. Por ejemplo el IgG está formado por cuatro cadenas, dos pesadas y dos ligeras [47].

Comencemos por la adsorción de los IgG en interfases líquido-sólido. Este es un fenómeno ampliamente estudiado porque los anticuerpos IgG han sido utilizados en numerosos ensayos clínicos y en biosensores. Las fuerzas predominantes durante la adsorción son las hidrofóbicas y las electrostáticas. La afinidad de los anticuerpos con superficies hidrófobas es muy alta, incluso en condiciones electrostáticas desfavorables. En superficies hidrófilas la afinidad está más determinada por las interacciones coulombianas. Esto es, por el pH y la fuerza iónica. Si las condiciones son favorables la afinidad es muy alta, pero si la superficie y el anticuerpo se repelen mutuamente la afinidad puede ser poca o incluso nula [47, 46].

Las interacciones hidrofóbicas ocurren entre las partes apolares de la proteína y del sustrato; a menudo implican cambios en la conformación de las moléculas. Al ser adsorbida, una parte de la proteína que estaba rodeada de agua queda en contacto con la superficie. La estructura de los anticuerpos unidos a la superficie se puede relajar adoptando una conformación energéticamente favorable o expandirse para maximizar los contactos entre la molécula y la superficie [47, 46].

Los cambios que sufren las proteínas pueden verse reflejados en la estructura secundaria. En general hay un aumento de α -hélices a coste de la disminución β -láminas, especialmente cuando la superficie es hidrófoba.

Se ha reportado que varias proteínas tienen un desplegamiento parcial denominado estado globular fundido (en inglés *molten globular state*) en el que se conserva buena parte de la estructura secundaria y el volumen aumenta aproximadamente en un 50 %. Este es el caso de un tipo de estado no-nativo en el cual se conserva buena parte de la estructura secundaria pero se pierde la estructura terciaria [47].

Los IgG depositados sobre superficies hidrofílicas (como la mica) se unen preferentemente por la zona de los Fab, que son los encargados del reconocimiento de los antígenos [47, 46]. Este es un factor que en principio puede afectar la observación del complejo antígeno anticuerpo.

Por otra parte la observación del receptor se ve afectada por la influencia del sustrato como se verá más adelante. En mica aparecen conformaciones alargadas que no se corresponden con la imagen esperada para la proteína nativa mostrada en la figura 3.3 e indican que la proteína sufre un proceso de despliegue total durante la interacción con el sustrato.

3.2. Estudios preliminares

Se realizaron experimentos en colaboración con el grupo de Juan Carlos Alonso (CNB, Madrid) y en coordinación con el Centro de Inmunología Molecular (CIM, La Habana) para verificar cualitativamente la actividad biológica de las moléculas mediante un ensayo de inmunodetección ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y para determinar la masa molecular del receptor mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

En el ELISA se fijó el receptor al sustrato, se incubó con el hR3 y luego con un anticuerpo secundario que reconoce IgG humano. Se disponía de anticuerpo hR3 y tres lotes de receptor. En una placa se depositaron 50 μ L/pocillo de receptor con concentración de 10 μ g/mL en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma) durante 1 h a 37°C. Se lavó con PBS + Tween 20 (Sigma) al 0,05 % (PBS/T20). Se bloqueó con PBS/T20 + FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma) al 5 % por 1 h a 37°C. Se añadieron 50 μ L/pocillo de hR3 (1 μ g/mL) durante 1 h a 37°C. Luego se lavó 3 veces con PBS/T20 y se añadió un anticuerpo secundario anti IgG humano (ab6864, Abcam).

Se realizaron réplicas del experimento en 3 pocillos para cada lote de receptor y uno se dejó en blanco (con PBS, sin receptor) a modo de control. La figura 3.4 muestra como las tres filas donde se había añadido receptor (A, B y C) hubo reconocimiento indicado por el color amarillo, mientras en la fila D (blanco) no hubo reconocimiento. Aunque solo se utilizó la concentración de receptor propuesta por los especialistas del CIM, el ensayo permitió verificar cualitativamente que los receptores y anticuerpos que se utilizarían en los experimentos estaban biológicamente activos.

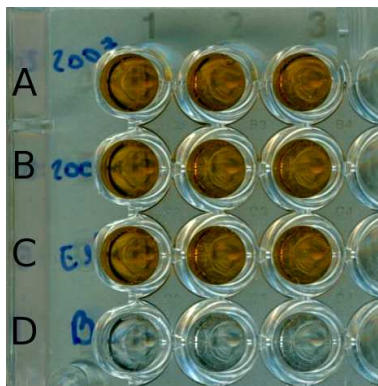


Figura 3.4 – Ensayo ELISA para la determinación cualitativa del reconocimiento entre el anticuerpo y los 3 lotes de receptor que estaban disponibles. Las filas A, B y C tenían receptor depositado. La fila D se dejó sin receptor (control).

La masa molecular del receptor se determinó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se emplearon geles al 6% de poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie, específico para la detección de proteínas. Las imágenes escaneadas fueron procesadas con el programa ImageJ. Se estudiaron el receptor solo, y los dímeros de receptores inducidos por la presencia de EGF e inmovilizados covalentemente.

La figura 3.5 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida de mezclas de receptor con el EGF (1:1) con diferentes concentraciones de glutaraldehído (GD) y ácido subérico que actúan como agentes entrecruzantes. En las condiciones del experimento la mayoría de los receptores deberían estar formando dímeros [58, 59]. En ausencia de agente entrecruzante no se observan dímeros (carril 2); sólo se observa una banda bien definida, de masa molecular aproximada a las 97 kDa correspondiente a la masa molecular del receptor. La hormona EGF no se observa porque su masa molecular es muy baja ($M_m = 6$ kDa). En los carriles 3 – 6 se observa la banda cercana a 97,4 kDa y dímeros de más de 200 kDa.

Los carriles tratados con ácido subérico (líneas 5 y 6) presentan dos bandas en la zona cercana a los 200 kDa. Una de ellas coincide con la banda de las moléculas tratadas con GD.

El valor de la masa molecular del receptor obtenido por electroforesis es algo menor que el esperado. De acuerdo con el proveedor (CIM, La Habana) deberían ser 105 kDa de los cuales aproximadamente 75 son proteína y 30 kDa son carbohidratos.

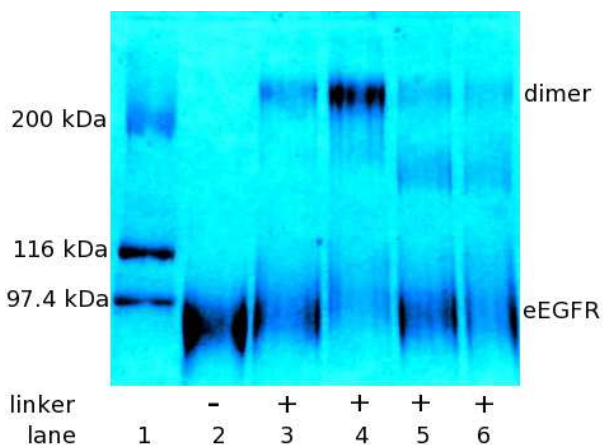


Figura 3.5 – Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de los receptores y dímeros mediados por el EGF. Los carriles son: 1. Patrón de pesos moleculares 200, 116 y 97,4 kDa. 2. eEGFR+EGF. 3 eEGFR+EGF, 0,2% glutaraldehído. 4 eEGFR+EGF, 0,5% glutaraldehído. 5 eEGFR+EGF, 0,5 mM ácido subérico. 6 eEGFR+EGF, 1,0 mM ácido subérico.

3.3. Cinética química de las interacciones

Resulta de interés medir los complejos anticuerpo-receptor (hR3:eEGFR) receptor-receptor (eEGFR:eEGFR, dímero) y el dímero estabilizado por la hormona. La masa molecular del anticuerpo es $M_m = 150$ kDa; la de la región extracelular del receptor $M_m = 105$ kDa¹²; finalmente el factor de crecimiento epidérmico tiene masa molecular $M_m = 6$ kDa.

En general las reacciones involucradas se pueden describir de la siguiente manera:

¹Se utilizará el valor que reporta el proveedor en el CIM (La Habana).

²En los cálculos, debe tenerse en cuenta que 1 kDa = 1000 g/mol



donde A y B son las moléculas independientes y AB es el complejo que forman; k_{on} y k_{off} son las constantes de ritmo de asociación y disociación. También resulta de interés conocer el valor de la constante de disociación $K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$. El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que describe estos procesos es [60]:

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_{\text{on}}[A][B] + k_{\text{off}}[AB] \\ \frac{d[B]}{dt} = -k_{\text{on}}[A][B] + k_{\text{off}}[AB] \\ \frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}}[A][B] - k_{\text{off}}[AB] \end{cases} \quad (3.2)$$

donde los corchetes indican concentración molar. Para solucionar este sistema de ecuaciones en los casos particulares que se discuten más adelante, se creó un código de MatLab R2009a (MathWorks) basado en la función `ode45` que implementa el algoritmo Runge-Kutta de cuarto y quinto orden para encontrar soluciones numéricas.

Cuando se alcanza el equilibrio se cumple que:

$$k_{\text{on}}[A][B] = k_{\text{off}}[AB] \quad (3.3)$$

El cumplimiento de esta condición se usó en las simulaciones numéricas como criterio de que ya se había alcanzado el equilibrio.

El proceso de unión/separación del anticuerpo al receptor puede escribirse como:



donde $k_{\text{on}} = 5,2 \times 10^4$ 1/Ms y $k_{\text{off}} = 1,1 \times 10^{-3}$ 1/s. La constante de disociación $K_D = 2,1 \times 10^{-8}$ M [52]. Cuando se alcanza el equilibrio:

$$[\text{hR3}][\text{eEGFR}]k_{\text{on}} = [\text{hR3} : \text{eEGFR}]k_{\text{off}} \quad (3.5)$$

Tomemos como caso de estudio que tenemos dos viales con anticuerpo y receptor. La concentración de anticuerpo es de $[\text{hR3}] = 1$ mg/mL y la del receptor es $[\text{eEGFR}] = 0,85$ mg/mL. El rango de concentración para obtener una densidad

superficial de anticuerpos para realizar AFM debe estar entre $0,2 - 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}^3$. Si ponemos en un vial $997 \mu\text{L}$ de agua, y añadimos $0,5 \mu\text{L}$ de anticuerpo y $2,5 \mu\text{L}$ de receptor, las concentraciones máscas de anticuerpo y receptor serán $0,5 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ y $2,125 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ respectivamente.

Si se conoce la masa molecular (M_m) y la concentración máscas de las proteínas (C_m), se puede calcular la concentración molar $[X]$ mediante :

$$[X] = \frac{C_m[X]}{M_m[X]} \quad (3.6)$$

La solución de anticuerpo y receptor tendrá las concentraciones iniciales $[\text{hR3}] = 3,3 \text{ nM}$ y $[\text{eEGFR}] = 20,24 \text{ nM}$. Esto significa que por cada anticuerpo hay 6 receptores aproximadamente. La figura 3.6 muestra la concentración de complejo anticuerpo-receptor en función del tiempo para estas concentraciones iniciales. Al cabo de una hora ya se ha alcanzado el equilibrio. Las concentraciones finales de son $[\text{hR3}] = 1,77 \text{ nM}$, $[\text{eEGFR}] = 18,68 \text{ nM}$ y $[\text{hR3:eEGFR}] = 1,56 \text{ nM}$.

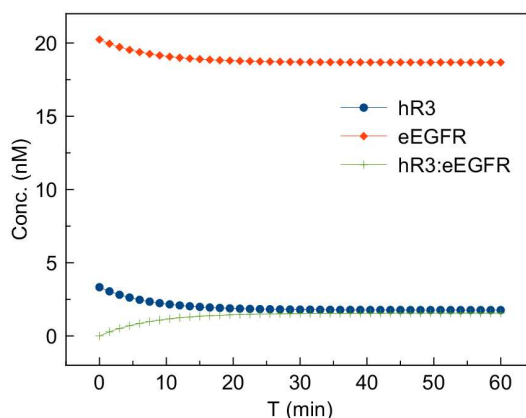


Figura 3.6 – Formación del complejo hR3:eEGFR al mezclar anticuerpo $[\text{hR3}] = 3,3 \text{ nM}$ con receptor $[\text{eEGFR}] = 20,24 \text{ nM}$.

Al tener un exceso de receptores uno podría pensar que todos los anticuerpos deberían estar unidos a receptor. Sin embargo como se observa en la figura 3.6 al alcanzar el equilibrio el número de anticuerpos libres y ligados al receptor es aproximadamente el mismo. Esto quiere decir que cuando se observe la muestra por AFM se verán pocos anticuerpos unidos a receptores.

Consideremos ahora un caso diferente a la hora de preparar la muestra. Si depositamos en un vial $0,5 \mu\text{L}$ de anticuerpo y $2,5 \mu\text{L}$ de receptor al cabo de 40 s prácticamente todos los anticuerpos están unidos a receptores (figura 3.7a).

³Estos números vienen de mi experiencia particular cuando he depositado una gota ($20 - 50 \mu\text{L}$) de anticuerpos en mica durante 30 s.

Sin embargo las concentraciones en el orden de micromolares no son adecuadas para preparar muestras para AFM. Supongamos que agregamos $997 \mu\text{L}$ de agua a la mezcla. La figura 3.7b muestra como inmediatamente la concentración de anticuerpos unidos a receptores comienza a disminuir. Eventualmente al cabo de 90 min se recuperan los valores de concentración de equilibrio de la figura 3.6, aunque el gráfico se ha mostrado solo hasta los 20 min. La figura 3.7b indica que debería prepararse la muestra a los pocos segundos de diluirla.

Como se verá más adelante, los anticuerpos se unen a la mica con mayor facilidad que los receptores. Por este motivo al observar por AFM las proporciones de anticuerpos, receptores y sus complejos estas serán diferentes de las mostradas en los gráficos de las figuras 3.6 y 3.7. Habrá menos receptores que los esperados.

Finalmente, se debe aclarar que el proceso se ha mostrado simplificado. En realidad al tener juntos anticuerpos y receptores se pueden formar dímeros de anticuerpos, un anticuerpo se podría unir a un dímero (si fuera cierto que se puede unir a la confirmación activa del receptor) y también un anticuerpo podría unirse a dos receptores simultáneamente. Un abordaje integral de todas estas posibles situaciones el problema se vuelve más complejo desde el punto de vista analítico.

El análisis realizado permite llegar a la conclusión de que para observar complejos moleculares el tiempo de preparación de la muestra debe minimizarse tanto como sea posible (en el orden de segundos).

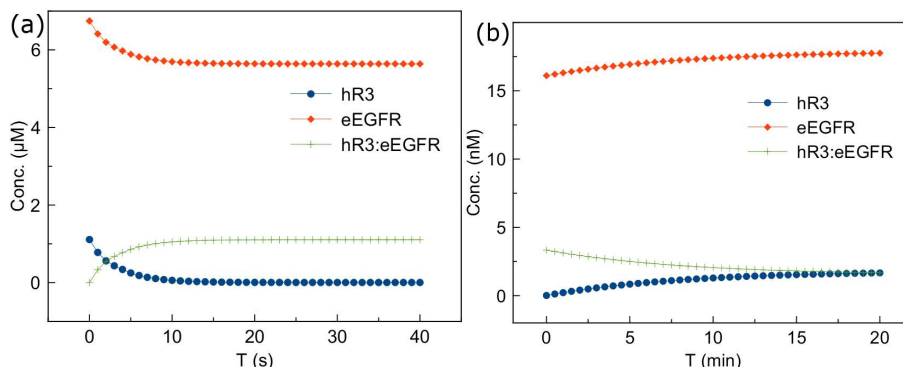


Figura 3.7 – (a) Formación del complejo hR3:eEGFR al mezclar anticuerpo [hR3] = $1,1 \mu\text{M}$ con receptor [eEGFR] = $6,75 \mu\text{M}$. Al cabo de 40 s se ha alcanzado el equilibrio y prácticamente todos los anticuerpos están unidos a receptores. (b) Evolución del sistema al diluir (a) en equilibrio al 0,3%.

3.4. Desplegamiento de receptores depositados sobre mica

Se prepararon muestras de anticuerpo hR3 y de la región extracelular del receptor (eEGFR) que fueron medidas en las mismas condiciones: AFM Agilent 5500, amplitud libre $A_0 < 10$ nm y amplitud de trabajo $A_{sp} > 0,95A_0$. Se utilizó la misma palanca SSS-SEIHR (Nanosensors) con radio típico $R = 2$ nm, constante de fuerza $k = 15$ N/m y frecuencia de resonancia de $f_0 = 130$ kHz. Las imágenes se tomaron a 1,7 línea/s, 500 nm y 512 px/línea.

Para preparar las muestras se depositó una gota de solución en mica recién exfoliada por 30 s. Se lavó la superficie con agua milliQ para eliminar las moléculas débilmente pegadas y se secó con nitrógeno (gas). La concentración de anticuerpo utilizada fue de $C_m(\text{hR3}) = 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ y la de receptor fue $C_m(\text{eEGFR}) = 2$ $\mu\text{g/mL}$. A esto corresponden concentraciones molares $[\text{hR3}] = 3,3$ nM y $[\text{eEGFR}] = 19$ nM.

Los resultados de la figura 3.8 muestran que los anticuerpos tienen mayor afinidad por la mica que los receptores. Aunque el tiempo de incubación fue el mismo y la concentración de receptores fue 6 veces mayor que la de anticuerpo, el número de anticuerpos sobre la mica supera con creces el número de receptores. En la figura también se observa que en general los anticuerpos son más altos que los receptores y su estructura es más compacta.

3.4.1. Análisis basado en el área y la altura de las partículas

Se seleccionaron 30 anticuerpos de la figura 3.8a y 30 receptores de la figura 3.8b. En el programa Gwyddion (<http://gywddion.net>), se aplicó una máscara a las moléculas seleccionadas para estimar su altura máxima y su radio equivalente a la mitad de la altura (esto es, el radio que tendría un círculo de área similar a la de la partícula a la mitad de su altura). El procesamiento estadístico de la información obtenida se realizó utilizando el programa Origin 8.5 (OriginLab Corporation).

Los diagramas de cajas de la figura 3.9 muestran las distribuciones de altura y radio equivalente a la mitad de la altura de los anticuerpos y receptores. Al realizar un análisis de varianza, se llegó a la conclusión de que las diferencias entre las medias de la altura y el radio equivalente eran diferentes. Esto quiere decir que la población de anticuerpos es más alta que la de receptores y que el radio equivalente a la mitad de la altura de los receptores es mayor que la de los anticuerpos.

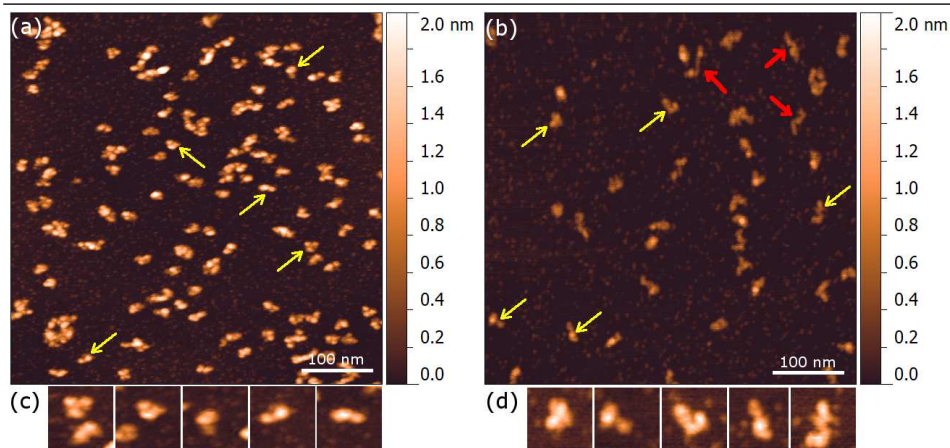


Figura 3.8 – Imágenes de topografía en AM-AFM del anticuerpo (a) y el receptor (b). La densidad superficial de anticuerpos es mayor que la de receptor. Los receptores marcados con flechas rojas han perdido explícitamente la conformación nativa. (c) Aumento de anticuerpos marcados con flechas en (a) (d) Aumento de receptores marcados con flechas amarillas en (b). Las imágenes de proteínas individuales mostradas en (c) y (d) tienen un ancho de 40 nm.

Sin embargo esto no es suficiente para discriminar anticuerpos de receptores en caso de tener una muestra con ambos tipos de moléculas. Como se puede apreciar, se han trazado líneas discontinuas que engloban zonas en las que hay solapamiento en las distribuciones. La mitad inferior de las alturas de los anticuerpos ocupan la misma región que la mitad superior de las alturas de los receptores. Cuando se analizan los radios equivalentes a la mitad de la altura la situación es más crítica: todos los radios equivalentes de anticuerpos caen en zonas en las que podrían haber sido receptores.

Adicionalmente, las imágenes ampliadas del anticuerpo (figura 3.8c) y el receptor (figura 3.8d) muestran que hay al menos dos configuraciones típicas del anticuerpo que son muy parecidas a dos de las configuraciones típicas del receptor. Estas son: la del anticuerpo con los tres lóbulos expuestos y la del anticuerpo con dos lóbulos expuestos, que tienen sus homólogos topográficos en el receptor. Nótese que los tres primeros receptores que fueron ampliados podrían perfectamente ser tomados por anticuerpos. La similitud en las imágenes de anticuerpo y receptor constituye un obstáculo para abordar el problema. Incluso teniendo imágenes con resolución submolecular si no se pueden distinguir las moléculas la investigación llega a un callejón sin salida.

Si se comparan las imágenes de AFM de los receptores aislados se observa que algunos tienen configuraciones demasiado alargadas. De acuerdo con la

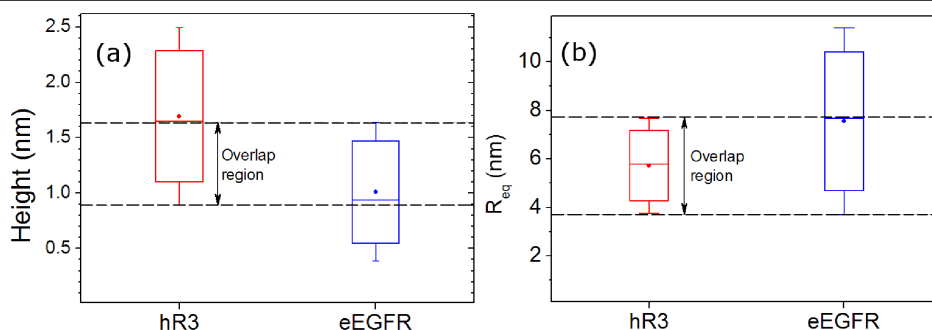


Figura 3.9 – Diagrama de cajas de la altura (a) y el radio equivalente a la mitad de la altura (b) de anticuerpos y receptores aislados seleccionadas en la figura 3.8. Las cajas tienen como límites el intervalo de confianza al 95 % y los bigotes al 99 %. La línea dentro de la caja representa la mediana y el punto el valor medio. Las líneas discontinuas indican la zona en la que hay un solapamiento entre los valores de altura y radio equivalente de las moléculas.

figura 3.3 los receptores deben ser ligeramente más pequeños que los anticuerpos. De los eEGFR seleccionados en la figura 3.8d sólo el primero y el segundo parecen tener un tamaño apropiado, los otros parecen demasiado grandes si se toman como referencia las figuras 3.3b y c. En el caso de los receptores marcados con flechas rojas en la figura 3.8b el desplegamiento es evidente. Hay al menos tres explicaciones para que los receptores se vean más grandes que lo que deberían:

1. Además de la conformación inactiva y la activa deben existir conformaciones intermedias que podrían ser más alargadas.
2. Existen cadenas de carbohidratos que salen de 7 puntos de la estructura del receptor e intervienen en el correcto plegamiento de la proteína. La heterogeneidad y flexibilidad de los carbohidratos podrían perjudicar la visualización por AFM.
3. En las condiciones en las que se mide, la estructura terciaria puede haber degenerado debido a las condiciones del medio o a la influencia del sustrato y por eso las moléculas aparecen estiradas.

El primer punto no tiene discusión. Se sabe que de alguna manera el anticuerpo cambia de conformación pero de momento no se ha reportado cómo son los estados intermedios. Sobre el segundo punto, se podría intentar eliminar parte de los carbohidratos pero esto podría comprometer la estructura terciaria de la proteína.

La atención en lo que resta de capítulo se centrará en el punto 3. Como se vio en la sección 3.1.4 la estructura terciaria de la proteína se puede ver afectada por cambios en las condiciones del medio y/o por cambios que ocurren durante el proceso de adhesión y relajación en el sustrato.

Los receptores mostrados en la figura 3.8b provenían de un vial con 850 $\mu\text{g/mL}$ de concentración. Una alícuota fue diluida con agua milliQ hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$. Esto provoca un cambio en la concentración de sales del medio que puede comprometer la estructura terciaria de los receptores. Bajo estas condiciones habría que comprobar por medios alternativos que las propiedades de las moléculas no han cambiado (tamaño, cuantificación de α -hélices y β -láminas en la estructura secundaria).

Aclarar este punto permitiría determinar hasta dónde los cambios conformacionales se deben a las condiciones del medio o a la interacción con el sustrato. Una estrategia para evitar este problema sería medir en condiciones fisiológicas, pero la medición en medio líquido tiene sus propias limitaciones que serán abordadas más adelante. Otra estrategia podría ser minimizar el tiempo que el anticuerpo está expuesto a alta dilución.

3.4.2. Análisis basado en el volumen de las partículas

El volumen de las proteínas medidas por AFM se ajusta linealmente a su masa molecular esperada. Esto ha sido comprobado para proteínas con masas moleculares entre 38 y 900 kDa, incluyendo anticuerpos IgG e IgM [61]. Existen varios métodos para determinar el volumen de las proteínas; Fuentes-Pérez *et al.* [36] los dividen en geométricos y directos. Los métodos geométricos estiman el volumen a partir de las dimensiones medidas asumiendo que las proteínas tienen forma de cascarón esférico, de esferoide aplastado, o de elipsoide. Los métodos directos calculan el volumen a partir de la altura de los píxeles en la imagen de AFM.

El volumen medido por AFM va a estar afectado por las condiciones específicas del experimento. Entre otros factores, influirán el tipo de palanca y el radio de la punta. Para homogeneizar los resultados y disminuir el error se puede utilizar una molécula de propiedades conocidas (como puede ser un fragmento de DNA) y tomarlo como referencia [62, 36].

En este trabajo se decidió utilizar como referencia al anticuerpo hR3. Los IgG tienen una masa conocida de 150 kDa. El problema al medirlos junto a receptores es que como se ha visto, hay conformaciones del receptor que podrían confundirse con anticuerpos. Una manera de evitar este problema es realizar las medi-

ciones en las mismas condiciones de amplitud libre, amplitud de trabajo, palanca, temperatura humedad y, de ser posible, el mismo día.

En este trabajo se ha calculado el volumen de la partícula V_i de manera similar a la propuesta por Fuentes-Perez *et al.* [62]:

$$V_i = V_{T,i} - V_{Bk,i} \quad (3.7)$$

donde $V_{T,i}$ es el volumen total que incluye a la partícula y al fondo $V_{Bk,i}$.

El volumen del fondo $V_{Bk,i}$ se calcula a partir de la relación entre el volumen V_{Bk} y el área A_{Bk} de una región de la imagen donde no hay proteínas, multiplicadas por el área de total de la región donde se encuentra la partícula $A_{T,i}$:

$$V_{Bk,i} = \frac{V_{Bk}}{A_{Bk}} A_{T,i} \quad (3.8)$$

Se utilizó el Gwyddion para la estimar los volúmenes y las áreas. Las figuras 3.10a y b muestran un ejemplo de cómo quedan las regiones marcadas para el procesamiento. Los resultados fueron exportados a Origin para implementar la ecuación (3.7) y proceder a su análisis estadístico (figura 3.10c).

En la figura 3.10c se muestra el resultado del análisis volumétrico de los anticuerpos de la figura 3.8a. El primer pico se encuentra a $180 \pm 20 \text{ nm}^3$ y el segundo, de menor altura, en $360 \pm 20 \text{ nm}^3$.

Cuando se realizó el análisis de la figura 3.8b se encontró solo un pico en $170 \pm 20 \text{ nm}^3$. Esta información se ha representado en la figura 3.10d, donde se representan los volúmenes normalizados respecto a la masa molecular del anticuerpo, utilizada como referencia. La masa molecular de los anticuerpos es de 150 kDa, la del receptor es aproximadamente 100 kDa. Se ve que el receptor muestra un aumento del volumen cercano al 50% lo cual indica que hay despliegamiento o desnaturalización de la proteína.

La existencia del segundo pico en la figura 3.10c indica que es probable dos anticuerpos caigan juntos. La figura 3.11 muestra imágenes de parejas de anticuerpos de la figura 3.8a. Esto no significa que haya involucrado un proceso de reconocimiento entre dos hR3. Debe tenerse en cuenta si se comparan los picos de distribución de anticuerpos de la figura 3.10c, hay más anticuerpos solitarios que parejas de anticuerpos.

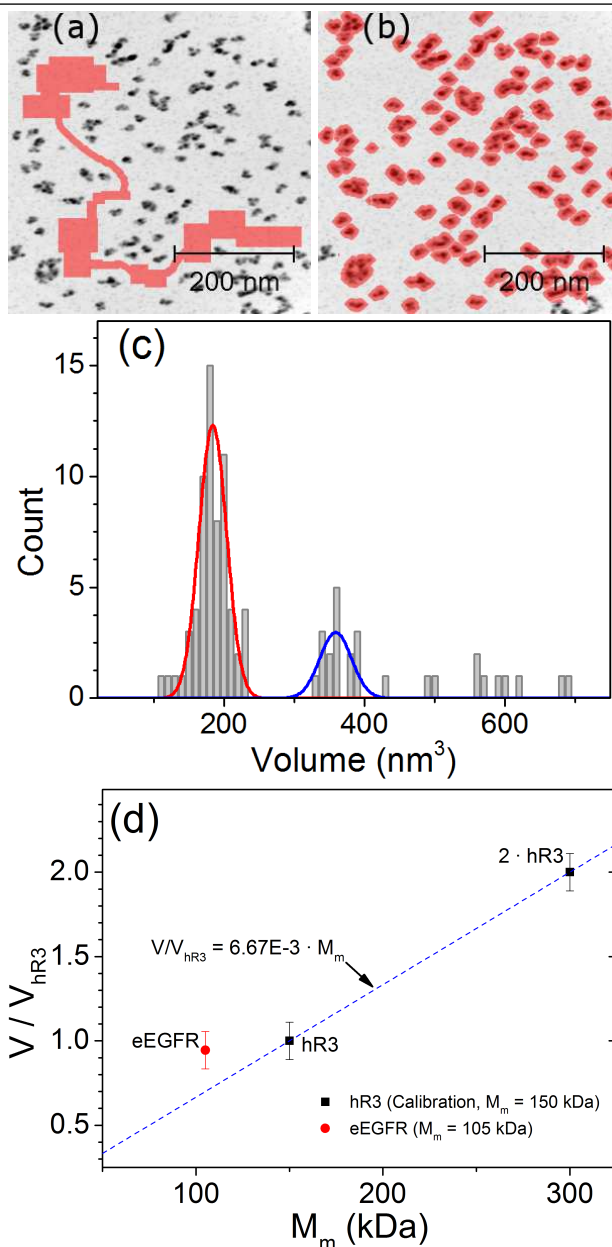


Figura 3.10 – Análisis volumétrico de los anticuerpos y receptores mostrados en la figura 3.8 (a) La región marcada en rojo se utilizó para determinar el área A_{Bk} y el volumen V_{Bk} del fondo en la muestra de anticuerpos. (b) Las partículas marcadas se utilizaron en el análisis del volumen. Se excluyeron las que tocan los bordes de la imagen. (c) Histograma de distribución de volúmenes de las partículas marcadas en (b) con 2 picos ajustados a gaussianas. (d) Volumen normalizado contra masa molecular de los anticuerpos y parejas de anticuerpos de la muestra. Se ha incluido el volumen de los receptores mostrados en la figura 3.8b.

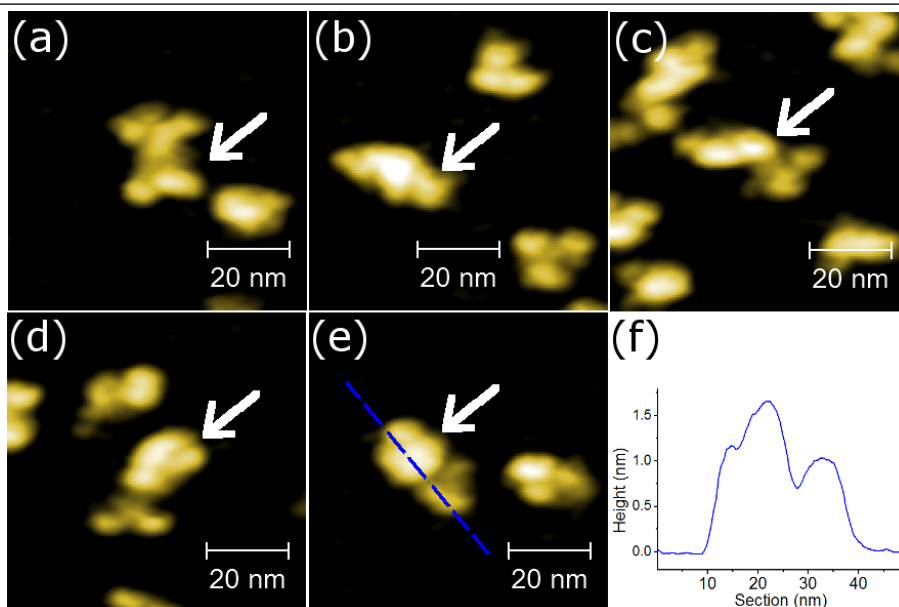


Figura 3.11 – (a) - (e) Parejas de anticuerpos de la figura 3.8a identificados mediante análisis volumétrico. Las parejas de anticuerpos han sido marcadas con flechas blancas. En algunas imágenes se pueden ver también anticuerpos aislados. Escala vertical 1,8 nm (f) Sección a lo largo de la trayectoria marcada en (e).

3.5. Preparación de las muestras para conservar la estructura del receptor

Teniendo en cuenta que los estudios de cinética química indican que los complejos anticuerpo-receptor se separan a los pocos segundos de ser diluidos hasta concentraciones de nanomolares y que los receptores pierden su estructura terciaria por influencia del medio y/o del sustrato, se decidió cambiar la manera en la que se preparan las muestras.

Se incubaron anticuerpos solos ($1,1 \mu\text{M}$), receptores solos ($6,8 \mu\text{M}$) a 37°C por 30 min antes de depositar las moléculas. Se exfolió la mica (disco de 5 mm de diámetro) y se depositó una gota de agua de $50 \mu\text{L}$ encima. A esto se añadió $1 \mu\text{L}$ de la solución con las moléculas por 30 s. Se lavó con agua y se secó con nitrógeno (gas). De esta manera el tiempo que las moléculas están diluidas es a lo sumo de 30 s.

Las muestras preparadas con este método presentan una distribución heterogénea de moléculas en la superficie. En la zona central del disco de mica, donde se lanzó la gota de $1 \mu\text{L}$, la concentración es muy alta. Cuando nos alejamos del

centro la concentración va disminuyendo de modo que en la zona cercana a los bordes no hay ninguna partícula. Haciendo barridos cuidadosos para explorar la superficie se pueden encontrar zonas donde la densidad superficial de moléculas es aceptable para hacer mediciones por AFM. Los experimentos se realizaron en el AFM Dimension con controlador Nanoscope V (Bruker) a temperatura ambiente y humedad relativa del 35 – 40%. Se midió en modo AM-AFM con amplitud libre $A_0 \approx 4$ nm y amplitud de trabajo $A > 0,85A_0$. Se utilizó una palanca TESP-SS (Bruker) con $f_0 = 300$ kHz, $k = 40$ N/m y radio de la punta $R < 5$ nm. Las imágenes se tomaron barriendo a 2 Hz, $1 \mu\text{m}$ y 1024 px/línea.

Las figuras 3.12a y b muestran los anticuerpos y receptores visualizados por AM-AFM en aire. Esta vez la estructura de los receptores aparece más compacta. El procedimiento descrito en la sección anterior permitió obtener la distribución de volúmenes de las moléculas (figura 3.12c) y, con esta, estimar la masa molecular de los receptores en 96 kDa (figura 3.12d). Este valor es cercano a los 105 kDa que indican los proveedores y coincide con el valor estimado durante la electroforesis en gel de poliacrilamida (sección 3.2). Se puede concluir entonces que el método de preparación de muestras propuesto en esta sección permite visualizar los receptores en conformaciones más cercanas a la nativa.

La figura 3.13 muestra imágenes de anticuerpos aislados de la figura 3.12a, seleccionados en la zona central del pico del análisis volumétrico. La configuración más representativa es la que tiene los 3 fragmentos expuestos. Sin embargo hay otras conformaciones posibles; se ha tratado de englobar la mayor parte de las configuraciones que pueden aparecer al depositar los anticuerpos en mica. Por otra parte, se eligieron receptores en la figura 3.12b y algunas de las conformaciones típicas se han representado en la figura 3.14. Estos receptores tienen todos el mismo volumen y, por tanto, la misma masa molecular.

La ventaja del método volumétrico para el análisis de las partículas es que permite discriminar por volumen (o lo que es lo mismo, por masa molecular) si se está en presencia de un receptor o un anticuerpo.

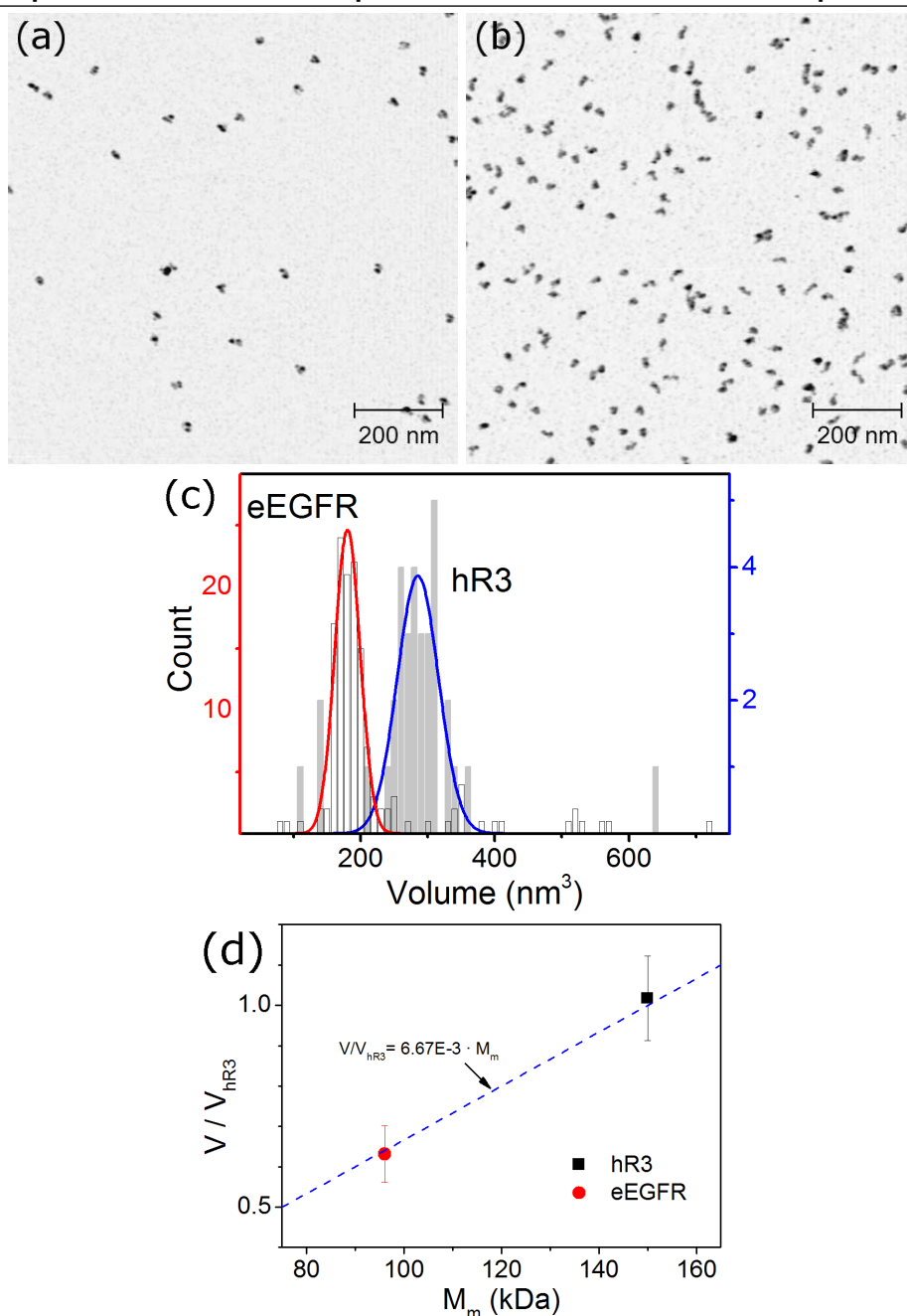


Figura 3.12 – Imágenes de topografía en AM-AFM de anticuerpos hR3 (a) y receptores eEGFR (b) depositados sobre mica con el nuevo método de preparación de la muestra. (c) Histogramas de distribución del volumen de las partículas mostradas en (a) y (b). Los receptores han sido representados con barras vacías y su ajuste gaussiano con una línea roja. Los anticuerpos se representan con barras grises y su ajuste con una línea azul. Los ajustes indican que el volumen del receptor es de $180 \pm 20 \text{ nm}^3$ y el del anticuerpo es de $290 \pm 30 \text{ nm}^3$. (d) Volumen de los anticuerpos y receptores normalizado a la masa molecular de los anticuerpos.

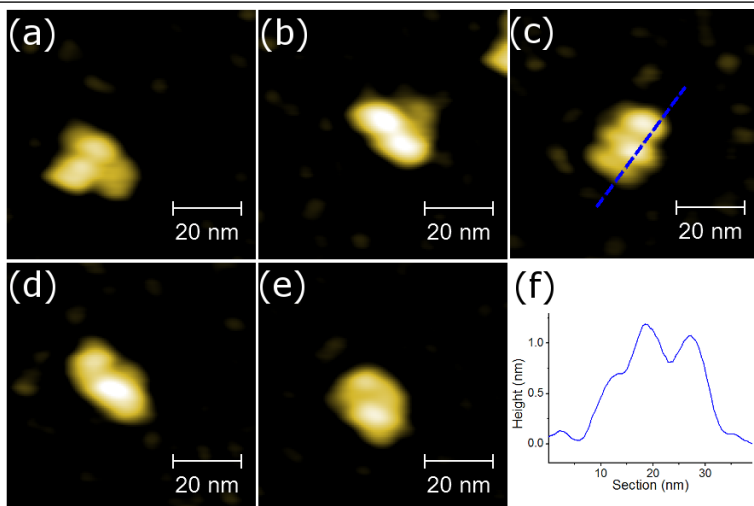


Figura 3.13 – (a) - (e) Imágenes topográficas de conformaciones típicas de anticuerpos hR3 depositados en mica. Modo AM-AFM. Palanca TESP-SS (Bruker) con $R < 5$ nm, $f_0 = 300$ kHz, $k = 40$ N/m. $A_0 = 4$ nm, $A_{sp} = 0,85A_0$. (f) Perfil a lo largo de la sección marcada en (c).

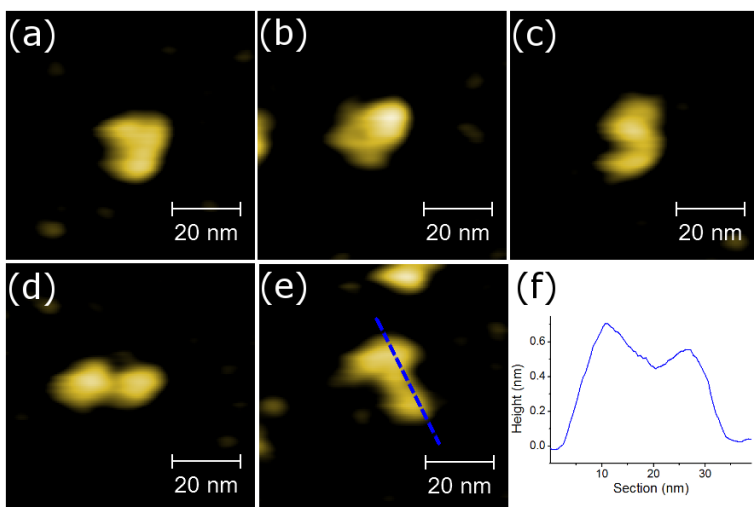


Figura 3.14 – (a) - (e) Imágenes topográficas de conformaciones típicas de receptores eEGFR depositados sobre mica. Modo AM-AFM. Palanca TESP-SS (Bruker) con $R < 5$ nm, $f_0 = 300$ kHz, $k = 40$ N/m. $A_0 = 4$ nm, $A_{sp} = 0,85A_0$. (f) Perfil a lo largo de la sección marcada en (e).

3.6. Microscopía de fuerza del complejo hR3:eEGFR

Se preparó una muestra de hR3-eEGFR (1:6) como en la sección anterior y se midió el mismo día, con la misma palanca, y en condiciones de amplitud libre, de trabajo, temperatura y humedad. Al depositar simultáneamente anticuerpos y receptores el problema se hace más complejo, dado el gran número de asociaciones de partículas que pueden ocurrir.

Como los experimentos se realizaron en las mismas condiciones de la sección anterior se utilizaron los valores esperados de volumen para estimar el volumen de las posibles asociaciones de proteínas que se pueden encontrar en este tipo de muestra. Los volúmenes estimados se han resumido en la tabla 3.6.1.

Tabla 3.6.1 – Volúmenes y masas moleculares estimadas de las proteínas y asociaciones de proteínas en la muestra de receptores y anticuerpos.

Proteína/Complejo	M_m (kDa)	V(nm ³)
eEGFR ¹	96	180 ± 20
hR3 ¹	150	290 ± 30
2 × eEGFR	192	360 ± 30
hR3 + eEGFR	246	470 ± 40
3 × eEGFR	288	540 ± 30
2 × hR3	300	580 ± 40
hR3 + (2 × eEGFR)	342	650 ± 40
(2 × hR3) + eEGFR	396	760 ± 50
3 × hR3	450	870 ± 50

¹ Se utilizaron los valores de las muestras de anticuerpos y receptores aislados (sección 3.5) para calcular los volúmenes medios de los complejos y sus desviaciones estándar.

Cuando se realizaron las mediciones por AM-AFM se confirmó que aparece un abanico de asociaciones entre las proteínas (figura 3.15a). La información de la tabla 3.6.1 se incorporó al histograma de distribución de volúmenes en la muestra. Se identificaron las fracciones de volumen que corresponden a un tipo específico de proteínas o asociaciones de proteínas. La tabla da los valores medios del volumen con su distribución estándar (SD). Se utilizó como criterio que no existiese solapamiento con las regiones de otras especies a un ancho de dos veces la desviación estándar. Esto implica que hay solapamiento entre varias asociaciones, pero sin embargo la que reviste mayor interés, la del complejo hR3:eEGFR se puede identificar en el rango de 425 – 485 nm³. Debe apuntarse que en la región 485 – 510 nm³ pudiera haber complejos anticuerpo-receptor pero solapa con los posibles tríos de receptores (490 – 610 nm³).

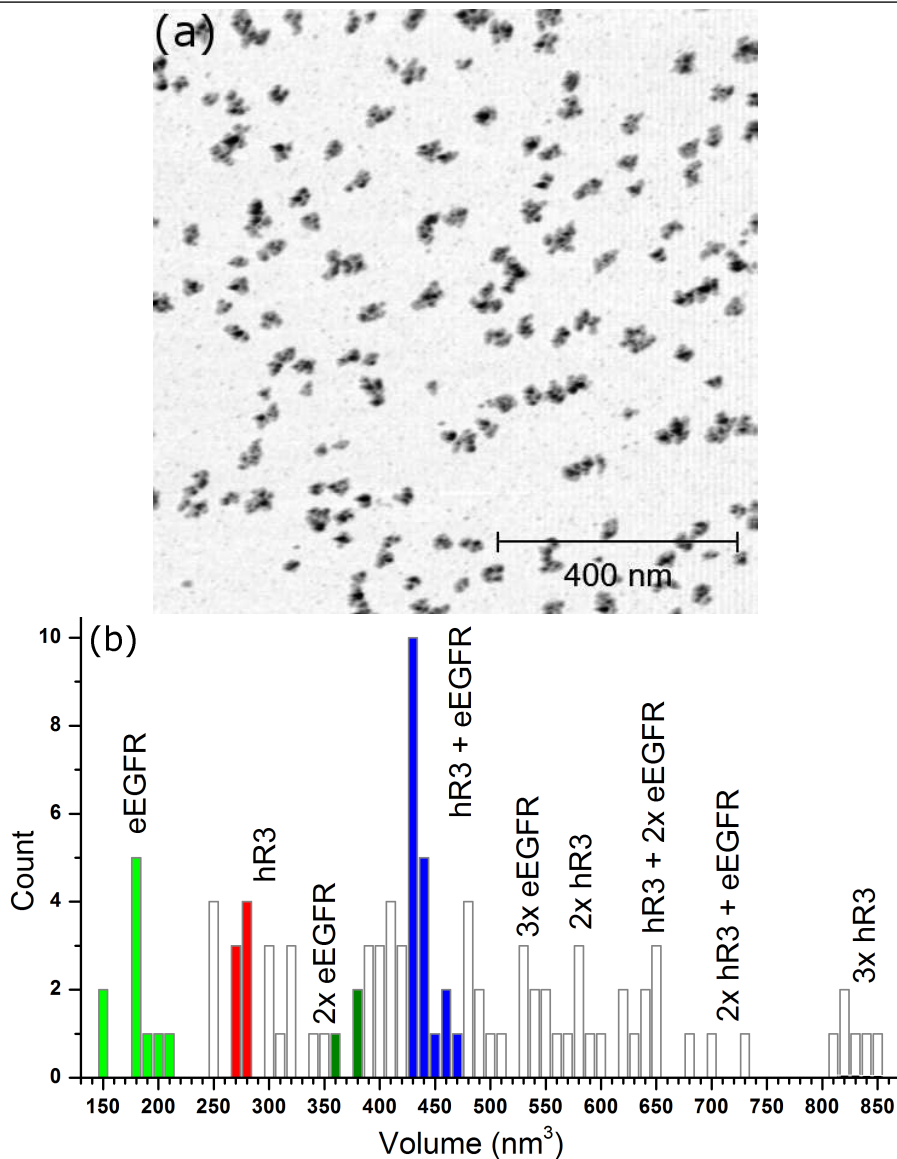


Figura 3.15 – (a) Muestra topográfica de anticuerpos y receptores depositados simultáneamente. Modo AM-AFM. Palanca TESP-SS (Bruker) con $R < 5$ nm, $f_0 = 300$ kHz, $k = 40$ N/m. $A_0 = 4$ nm, $A_{sp} = 0,85A_0$. Escala vertical 1,8 nm. (b) Histograma de distribución de volúmenes de las partículas mostradas en (a). Las barras coloreadas indican que hay un 95% de certeza de que las partículas sean correctamente identificadas. Las barras en blanco indican que hay solapamiento y por tanto hay un alto grado de incertidumbre en la identificación. Se pueden identificar 10 receptores (verde), 3 parejas de receptores (verde oscuro), 7 anticuerpos (rojo) y 19 complejos anticuerpo receptor (azul).

La formación predominante en la muestra son asociaciones anticuerpo-receptor. Esto es relevante pues al analizar muestras muy pobladas de anticuerpos (figura 3.8a) y de receptores (figura 3.12b) el pico mayor correspondía a proteínas aisladas. En este caso, predomina el complejo anticuerpo-receptor lo cual indica que su asociación no es inespecífica como en el caso de las parejas de anticuerpos mostradas en la figura 3.11.

La figura 3.16 muestra complejos anticuerpo-receptor cuyo volumen se encuentra en el rango $425 - 435 \text{ nm}^3$ de la figura 3.15a. En general, los complejos hR3:eGFR aparecen como si una de las proteínas estuviera encima de la otra, aunque definir hasta dónde llega el receptor y comienza el anticuerpo podría resultar arriesgado; se observa, además, cierta similitud con las parejas de anticuerpo mostradas en la figura 3.11. Sin embargo el análisis volumétrico descarta esta posibilidad.

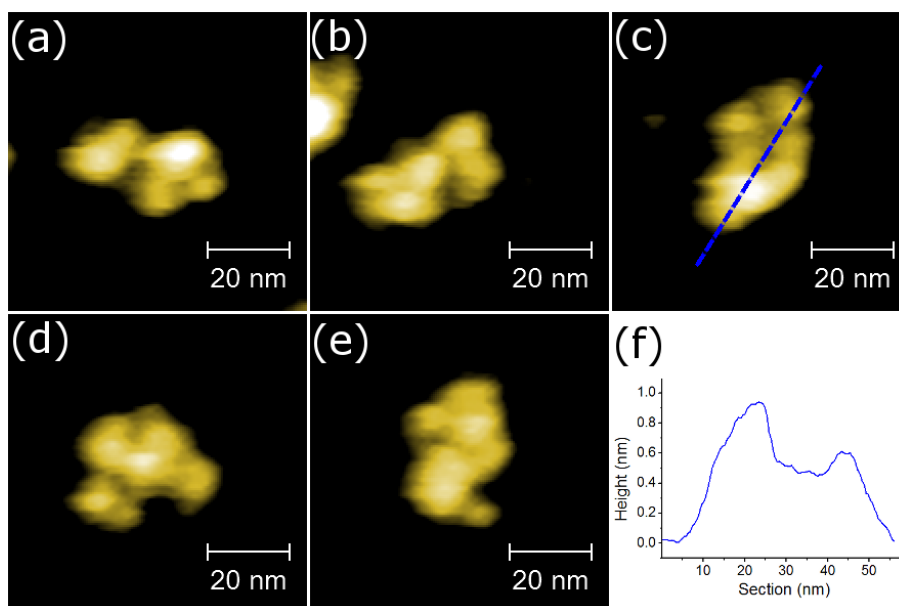


Figura 3.16 – (a)-(e) Imágenes de topografía de complejo anticuerpo-receptor (con volumen entre $425 - 435 \text{ nm}^3$) seleccionados en la figura 3.15a. (f) Perfil a lo largo de la sección marcada en (c).

3.7. Medidas en HOPG

Los experimentos sobre mica mostrados en las secciones anteriores indican que los receptores tienden a deformarse, dando lugar a estructuras no nativas.

Esto, en parte, podría deberse a que las interacciones electrostáticas en mica suelen ser grandes. Por este motivo se realizaron también experimentos en grafito pirolítico altamente organizado (HOPG) que es un sustrato hidrófobo en el cual las interacciones electrostáticas no deberían jugar un papel predominante.

Las muestras se prepararon depositando una gota de $50 \mu\text{L}$ con los receptores sobre HOPG recién exfoliado durante 30 s. Se lavó con agua milliQ y se secó con nitrógeno (gas). Se utilizaron 2 concentraciones de receptor $2 \mu\text{g/mL}$ y 50 pg/mL .

La figura 3.17a muestra que los receptores incubados a una concentración de $2 \mu\text{g/mL}$ forman islas (monocapas) sobre el HOPG. Hay que recordar que esta es la misma concentración utilizada para preparar las muestras que se midieron en mica (figura 3.8b). La distancia entre las terrazas del HOPG es de $\sim 0.4 \text{ nm}$ lo cual coincide con la altura entre las capas de grafito en este material.

Se disminuyó la concentración 40 veces y se preparó una nueva muestra de receptores (figura 3.17b) y como se puede ver ya no aparecen islas en estas condiciones pero aun así los receptores tienden a estar cerca unos de otros en grupos de 2 – 4. Como antes en la mica, se ven estructuras alargadas que no se corresponden con la conformación nativa de los receptores.

Los resultados muestran que el HOPG no es un sustrato deseable para el estudio de los receptores por AFM: tienden a aglomerarse y la estructura nativa no se conserva cuando están en contacto con el sustrato.

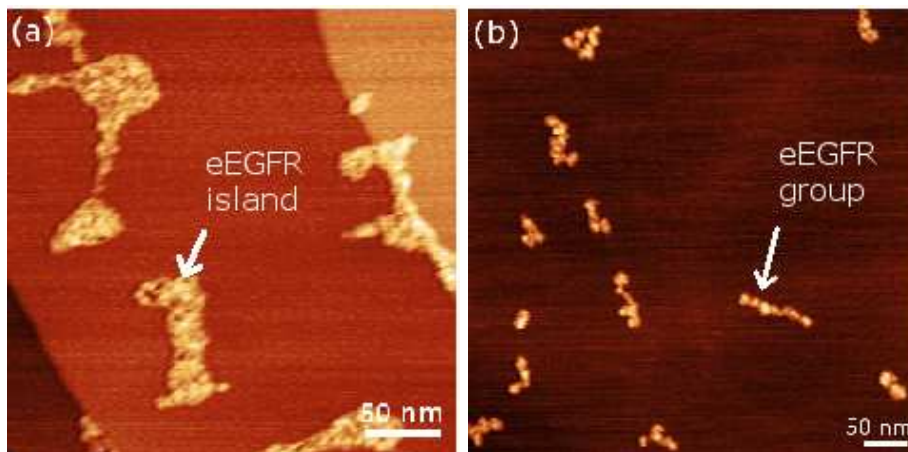


Figura 3.17 – Imágenes del receptor depositado sobre HOPG en condiciones ambientales. (a) A la concentración de $2 \mu\text{g/mL}$ se forman islas de receptores. $A_0 = 5 \text{ nm}$, $A_{\text{sp}} = 4,3 \text{ nm}$. (b) A una concentración de 50 pg/mL los receptores se agrupan; el HOPG deforma la estructura de los receptores. $A_0 = 1,8 \text{ nm}$, $A_{\text{sp}} = 0,8 \text{ nm}$. Palanca NCH (Nanosensors) $R = 7 \text{ nm}$, $f_0 = 290 \text{ kHz}$, $k = 40 \text{ N/m}$. Escala de color $1,8 \text{ nm}$.

3.8. Medidas en medio líquido

3.8.1. Dinámica de la deposición de receptores sobre mica

Se diseñó un experimento en dos etapas para intentar visualizar en tiempo real la unión de los receptores a los anticuerpos. En una primera etapa se preparó una muestra con anticuerpos a la que luego se inyectaron los receptores. Desafortunadamente los receptores no cayeron sobre los anticuerpos y una vez depositados sobre la mica quedaron fijos en sus posiciones.

Los experimentos se realizaron en el AFM Agilent 5000 con MAC III. Se utilizó una palanca SNL (Bruker) triangular con radio típico $R = 2$ nm y constante de fuerza $k < 1$ N/m. En la primera etapa se depositaron 100 μL de anticuerpo hR3 (40 pg/mL) a mica recién exfoliada durante 30 s y se lavó con agua para eliminar los anticuerpos unidos débilmente a la superficie. Se agregaron 500 μL de agua a la celda y se tomó un imagen de la superficie para tener a los anticuerpos como referencia. Posteriormente se agregaron 100 μL de eEGFR (1 $\mu\text{g/mL}$) al sistema y se realizaron barridos sucesivos para observar el proceso de deposición de los receptores sobre la superficie. Las imágenes se tomaron a baja resolución 4 nm/px, 512 px/línea.

La figura 3.18 muestra los resultados del experimento. El primer cuadro muestra los anticuerpos. A medida que transcurre el tiempo los receptores van cayendo sobre la superficie y allí donde caen, quedan fijados. Los cambios que se observan se deben a la deriva térmica del sistema, no a acción mecánica de la punta. Cada barrido tardaba 4,2 min. El ritmo de deposición de receptores en el período estudiado fue lineal. Desafortunadamente ningún receptor cayó encima de los anticuerpos.

3.8.2. Modificación mecánica de la estructura del receptor

Previamente se ha discutido que las proteínas pueden aparecer en las imágenes de AFM en conformaciones diferentes de la nativa. Como se verá a continuación, la punta de la palanca puede ser un factor que influya en la conformación de la proteína en medio líquido.

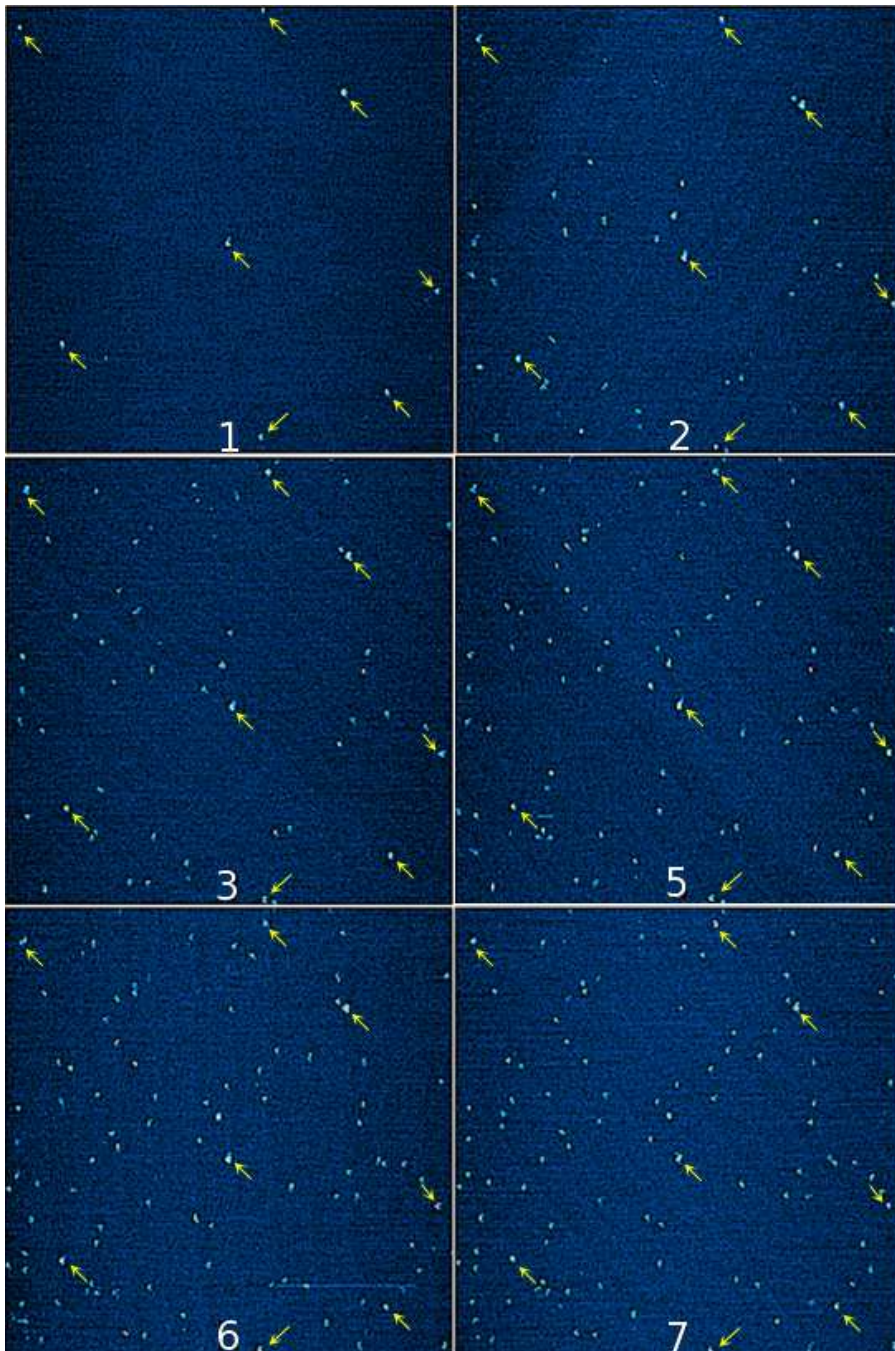


Figura 3.18 – Barridos sucesivos para estudiar la deposición de receptores sobre la mica en medio líquido. El número de cuadro coincide con el número de barrido. El cuadro número 1 muestra los anticuerpos antes de que se inyectaran los receptores. El cuadro 4 ha sido omitido por razones de espacio. Las flechas indican la posición de los anticuerpos. El resto de moléculas que se observan son receptores. Cada cuadro tiene un área de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

Por otra parte, Preiner *et al.* han reportado que el segundo armónico⁴ en medio líquido es sensible a las variaciones elásticas y geométricas de la muestra [63]. Xu *et al.* extendieron el análisis hasta el armónico 15 [64]. En esta sección se utilizó la información del segundo armónico para visualizar los receptores en medio líquido.

Se depositaron 100 μL de receptor (1.3 $\mu\text{g/mL}$) sobre mica recién exfoliada durante 30 s, se lavó con agua y se midieron en el AFM Agilent 5500 con una palanca SNL (Bruker) $k = 0,2 \text{ N/m}$, $R = 2 \text{ nm}$ bajo agua. Las imágenes del segundo armónico fueron procesadas con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La amplitud del segundo armónico sobre la proteína fue menor que sobre la mica. Este tema se discute en profundidad en el próximo capítulo.

La figura 3.19 muestra una sucesión de imágenes de receptores. En la primera imagen se ven un receptor solitario y una partícula mayor que podría estar formada por 2 ó 3 receptores. La segunda muestra cómo algo fue arrastrado del aglomerado marcado con la flecha azul oscuro. En la cuarta imagen se ve que el aglomerado se ha separado definitivamente en 2 receptores aislados, marcados con flechas en azul claro. En la última imagen se ven los 3 receptores pero su conformación ha cambiado. Esta secuencia indica cómo la punta de la palanca puede modificar la conformación de los receptores depositados sobre la superficie de mica. En aire este tipo de cambios no suele observarse, probablemente porque la fortaleza de interacción de los receptores con el sustrato sea mayor. Además, la unión de los receptores a la mica bajo PBS es más débil que bajo agua. Los experimentos realizados mostraron que muy pocos se unían a la superficie.

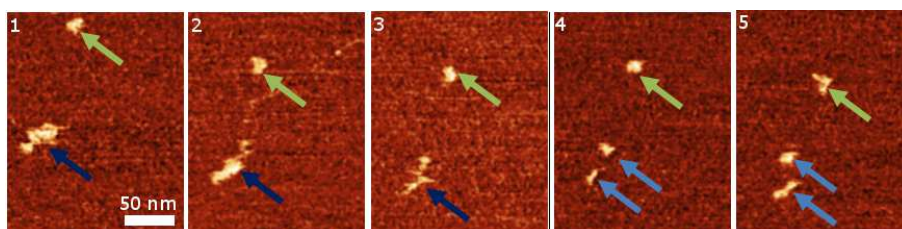


Figura 3.19 – Secuencia de imágenes de receptores depositados en mica bajo agua. Las flechas verdes marcan un receptor aislado. Las flechas de color azul oscuro marcan un dímero que se separa en dos receptores (flechas de color azul claro) debido a la acción mecánica de la palanca. Imágenes del segundo armónico. Escala vertical 8 mV. Palanca triangular SNL (Bruker) $k = 0,2 \text{ N/m}$, $R = 2 \text{ nm}$. Amplitud libre 4 nm, amplitud de trabajo 3 nm.

⁴Se trata del segundo armónico, no confundir con el segundo modo de oscilación de la palanca.

3.9. Discusión

El anticuerpo antitumoral Nimotuzumab (hR3) se ha empleado en la terapia del cáncer de manera satisfactoria y no provoca efectos adversos graves a los pacientes [52, 51].

Se sabe que el anticuerpo se une al dominio III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [52]. Sin embargo, una parte de su mecanismo de acción continúa sin ser esclarecida. La falta de efectos adversos graves podría deberse a que tiene una constante de afinidad menor que la de otros anticuerpos antitumorales (por ejemplo el Cetuximab, que también se une al dominio III) pero también podría deberse a otra causa. Las simulaciones computacionales de Talavera *et al.* [52] mostraron que la unión del anticuerpo al receptor impide la unión al EGF pero (a diferencia de lo que ocurre con Cetuximab) permite que el receptor adopte la conformación activa. Por eso sigue habiendo una señal basal de división y las células sanas no se ven tan dramáticamente afectadas.

El reto desde el punto de vista de la microscopía de fuerza consiste en visualizar la unión del anticuerpo al receptor y así validar, o rechazar, el modelo de la figura 3.2. Se deben distinguir las conformaciones activa, inactiva y los dímeros del receptor. Luego habría que distinguir el anticuerpo unido a conformaciones activa e inactiva. Para esto habría que garantizar que las moléculas de las que se disponía continuaban biológicamente activas. Para verificar este aspecto se realizó un ensayo ELISA que mostró, cualitativamente, que todas las moléculas estaban en buen estado.

La electroforesis en gel de poliacrilamida mostró que los receptores tienen una masa molecular cercana a 97 kDa. Además, se utilizaron dos candidatos para unir covalentemente los dímeros de receptor: glutaraldehído y ácido subérico. Los dímeros de receptor estabilizados por el factor de crecimiento epidérmico aparecen en una banda cercana a los 200 kDa. El mejor candidato para unir covalentemente los dímeros es el glutaraldehído al 0,5%.

Para visualizar las proteínas se utilizó la microscopía de fuerza modulada en amplitud que, como se discutió en el capítulo anterior, ha demostrado ser una herramienta eficaz para visualizar proteínas con resolución submolecular de manera reproducible en condiciones ambientales.

Los anticuerpos y los receptores fueron visualizados sobre mica en condiciones ambientales. Las imágenes de alta resolución mostraron que hay conformaciones del anticuerpo que tienen formas muy parecidas a las del receptor (figura 3.8). Por otra parte, la estructura de muchos receptores aparece más alargada de lo que cabría esperar. Esas moléculas alargadas se desplegaron y perdieron

su conformación nativa. El desplegamiento puede deberse a las condiciones del medio, a la interacción con el sustrato, o por ambas causas.

Los receptores que provee el CIM (La Habana) se encuentran en un medio con una concentración de sales optimizada para que se mantenga la conformación nativa de las proteínas. Para medir los receptores por AFM, se necesita disminuir la concentración de receptor cientos de veces. Cuando se utiliza agua milliQ para diluir los receptores, la concentración de sales disminuye a niveles que pueden comprometer la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas. Adicionalmente, las interacciones electrostáticas de los receptores con la mica pueden modificar la estructura de los receptores. En estas condiciones, el volumen de la población de receptores se incrementó casi en un 50 % (figura 3.10).

Adicionalmente, los estudios de cinética química sugieren que incluso teniendo un exceso de receptores respecto al número de anticuerpos (6:1), las concentraciones finales de proteína utilizadas para preparar las muestras es tan baja que solo la mitad de los anticuerpos estará unido a receptores (figura 3.7b).

El protocolo de preparación de muestras se modificó para garantizar que la mayoría de los anticuerpos estén unidos a receptores. Se colocó primero el agua (50 μL en un disco de mica recién exfoliada de 5 mm de diámetro) y luego una gota concentrada (1 μL) de moléculas incubadas a sus concentraciones originales (cercanas a 1 mM).

Este método minimiza el tiempo de dilución y se pueden observar muchos más complejos. La desventaja es que habrá zonas de la muestra superpobladas y otras vacías. Sin embargo entre medias se puede encontrar zonas con una densidad superficial de moléculas aceptable para realizar estudios por microscopía de fuerzas.

Los estudios de muestras de hR3 y eEGFR por separado mostraron que el método funcionaba correctamente: la masa molecular del receptor estimada por análisis volumétrico fue de 96 kDa. Se observaron además anticuerpos (figura 3.13) y receptores (figura 3.14) con alta resolución. Aunque seguía habiendo conformaciones similares, al calcular el volumen se pudo determinar si se está en presencia de un anticuerpo o un receptor.

Al depositar una mezcla de receptores y anticuerpos apareció un gran número de partículas que iba desde receptores y anticuerpos aislados hasta grupos de 3 anticuerpos. Sin embargo el mayor número de conteos correspondió a una fracción que se corresponde al complejo anticuerpo-receptor. Que esta fracción fuera mayor que las de anticuerpos y receptores aislados indica que la unión entre ambas proteínas era específica antes de llegar a la superficie. La clasificación según el volumen permitió definir que los complejos mostrados en la figura 3.16 son

hR3 unidos a eEGFR y no otra combinación de moléculas. Sin embargo, continúa siendo difícil definir en el complejo qué es receptor y qué anticuerpo.

Como la mica es un sustrato con mucha carga electrostática, se intentó medir los receptores sobre HOPG, pero los resultados mostraron que este tampoco es un sustrato deseable para visualizar los receptores: pues estos tienden a aglomerarse y además su estructura se despliega.

Los estudios en medio líquido mostraron que los receptores en condiciones fisiológicas tienen una baja afinidad por la superficie de mica en PBS, así que se realizaron los estudios en agua. Debe señalarse que aunque se utilice agua, siempre hay una pequeña cantidad de sales en el medio proveniente de las soluciones originales de las proteínas.

Se intentó visualizar el proceso de unión del receptor al anticuerpo en tiempo real. Primero se depositaron los anticuerpos y luego se inyectaron los receptores. Desafortunadamente la influencia con el sustrato era más fuerte y ningún receptor fue atrapado por un anticuerpo.

La vía propuesta abre interrogantes: En el caso de la mica los receptores tienden a unirse por los fragmentos Fab ¿queda expuesto el sitio de unión? De ser así ¿es la unión al anticuerpo lo suficientemente fuerte para que la punta no los separe mecánicamente?

La acción mecánica de la palanca es un factor importante a considerar. En las imágenes de la figura 3.19 se ve cómo la conformación del receptor aislado cambia, y cómo receptores que estaban unidos se separan tras barridos sucesivos. En las imágenes en condiciones ambientales no se observaron estos cambios de conformación.

3.10. Conclusiones

El estudio del mecanismo de acción del anticuerpo antitumoral hR3 al unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico constituye un problema de difícil solución por microscopía de fuerza.

Al realizar mediciones de microscopía de fuerza modulada en amplitud en condiciones ambientales la estructura terciaria de los receptores tiende a desplegarse debido a la influencia del medio y/o del sustrato. Esto se ve reflejado en un aumento del volumen medido respecto al valor esperado.

Se ideó un método de preparación de la muestra en el cual los receptores mantienen su conformación en condiciones cercanas a la nativa. Este método

permite también obtener muestras en las que se pueden observar y discriminar los complejos anticuerpo-receptor de otras asociaciones de proteínas.

Observar las proteínas en medio líquido resulta más complejo que en condiciones ambientales. La afinidad de las proteínas por el sustrato es menor y, por ende, es más fácil arrastrar las partículas que en aire.

En general, se han sentado las bases para el estudio del mecanismo de acción del anticuerpo hR3. Sería recomendable discriminar las conformaciones activa e inactiva del receptor, estudiar los dímeros del receptor y comparar las imágenes de microscopía de fuerza del complejo hR3:eEGFR con las de otros anticuerpos IgG que tengan como blanco al receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Capítulo 4

Contraste de fase, energía disipada y armónicos superiores en medio líquido

En este capítulo se discute un método para determinar la energía disipada en medio líquido. Se parte de un modelo que toma en cuenta los dos primeros modos de oscilación de la palanca y los armónicos generados por la no linealidad de la interacción con la muestra [31]. Luego se introducen en el modelo correcciones para su implementación experimental: la sensibilidad del fotodiodo a los modos de oscilación de la palanca y la disminución del factor de calidad cuando la palanca se acerca a la muestra. Se propone una expresión para estimar la energía disipada experimentalmente y se aplica a dos materiales: membrana púrpura y mezcla de polímeros.

Los términos fase, desfase, o el cambio de fase en AFM se refieren al mismo fenómeno físico: la diferencia de fase entre la oscilación de la palanca y la señal de excitación. En una imagen de contraste de fase en microscopía de fuerza modulada en amplitud (AM-AFM) se dibuja el cambio de fase mientras se forma una imagen de la superficie manteniendo la amplitud constante. Las imágenes de fase proporcionan información de la composición y la disipación de energía con resolución nanométrica [3, 24, 37, 25].

En 1998 Cleveland *et al.* proponen un método para determinar la potencia disipada en AM-AFM [37] y se refiere a las imágenes de fase como mapas de disipación. Curiosamente, Cleveland hace referencia a los armónicos generados pero dice que son muy pequeños para tenerlos en cuenta y considera que se puede asumir que la oscilación se mantiene aproximadamente sinusoidal. Ese mismo año Tamayo y García [25] proponen una expresión para obtener la ener-

gía disipada en AM-AFM. El modelo propuesto estaba basado en ambos casos en un oscilador armónico amortiguado y forzado. Las ecuaciones propuestas eran válidas en condiciones ambientales donde el factor de calidad es alto $Q \approx 10^2$. Tamayo reescribe la ecuación para determinar la energía disipada en medios con bajo factor de calidad en 1999 [39]. La razón es que en medio líquido el factor de calidad es menor de 10 y los armónicos que había descrito Cleveland no pueden ser despreciados. De acuerdo a su criterio, la contribución de los armónicos superiores debe tenerse en cuenta para determinar la energía disipada [3].

El método para determinar la energía disipada en aire tiene la ventaja de ser fácil de implementar. Para ello solo se toman curvas de amplitud y fase frente al desplazamiento del piezo para cuantificar la energía disipada. Adicionalmente, la forma de las curvas de energía disipada permite identificar la naturaleza de la interacción entre la punta y la muestra [38, 65, 66, 67]. La existencia de armónicos superiores no despreciables en medio líquido hace que el proceso de análisis sea más complejo.

La palanca es una estructura con autofrecuencias a las que le corresponden formas modales de oscilación (autovectores). La palanca no se comporta como un oscilador armónico debido a las no linealidades en la interacción punta-muestra que introduce armónicos superiores (múltiplos enteros de la frecuencia fundamental de oscilación) y a la excitación de los modos superiores. La relación entre los armónicos superiores y las propiedades de la muestra no están del todo entendidas [68, 69]. No obstante, aprovechando el hecho de que los armónicos en líquido son un orden de magnitud mayor que en aire, Preiner *et al.* [63] utilizaron el segundo armónico para medir membranas biológicas con una resolución lateral inferior a 1 nm. De hecho, las imágenes del segundo armónico tenían mayor resolución que las de topografía. Por su parte, Basak y Raman propusieron que el segundo modo de oscilación de la palanca se excita momentáneamente durante la interacción entre la punta y la muestra en medio líquido y utilizan este hecho para estimar la amplitud y la fase de la palanca a diferentes amplitudes de trabajo [70]. Hasta la fecha, el grupo de Raman en la Universidad de Purdue, USA, ha publicado varios trabajos donde se discute la relación entre los armónicos, los modos de oscilación y el contraste de fase en medio líquido [29, 64, 71, 72].

4.1. Determinación de las propiedades mecánicas de las palancas

En esta sección se describe el proceso de obtención de los espectros de ruido térmico para la determinación de las propiedades mecánicas de las palancas y,

dado que el montaje experimental es el mismo, se extenderá la explicación al estudio de los armónicos generados durante la oscilación de la palanca.

El dibujo de la figura 4.1 muestra un esquema del montaje experimental. La señal de la oscilación que llega al fotodiodo se envía a un osciloscopio. Para su análisis se realiza la transformada rápida de Fourier (FFT) en el mismo osciloscopio o, *a posteriori*, en el ordenador. El resultado es la señal en el espacio de frecuencias. Los armónicos aparecen definidos y son cuantificables en el espectro de frecuencias. Para obtener los resultados experimentales que se muestran en este capítulo se utilizaron dos sistemas de microscopía de fuerza: un Multimode 8 con controlador Nanoscope V (Bruker) y un Agilent 5000 con módulo MAC III (Agilent). El osciloscopio utilizado para recoger la señal es un DPO 7054 (Tektronix) con ancho de banda de 2,5 GHz y capacidad de muestreo hasta 10 GS/s. El software que trae incorporado el osciloscopio permite promediar y realizar la transformada de Fourier de la señal en tiempo real.

Los microscopios Multimode y Agilent tienen incorporado el principio descrito en la figura 4.1 para determinar las propiedades mecánicas de la palanca. El choque de las moléculas del medio con la palanca excita sus modos de oscilación. A partir de la FFT se obtiene la densidad espectral de frecuencias (PSD) cuyo análisis permite determinar la constante de fuerza de la palanca k , de los modos k_j , las frecuencias de resonancia de los modos ω_j y sus factores de calidad Q_j .

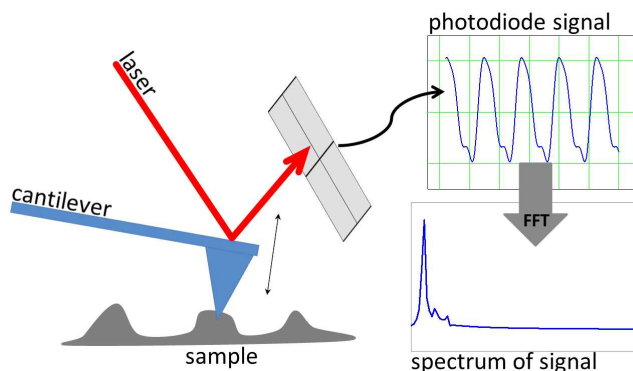


Figura 4.1 – Esquema del sistema utilizado para obtener los armónicos y los espectros de ruido térmico. Durante las mediciones la palanca oscila interactuando con la muestra. El láser se refleja en la palanca y llega al fotodiodo. La señal temporal se registra en un osciloscopio y se procesa mediante la transformada de Fourier (FFT) para llevarla al espacio de frecuencias.

Butt y Jaschke [13] calculan el ruido térmico considerando todos los posibles modos de oscilación de la palanca. Su propuesta para determinar la constante de

fuerza k de una palanca rectangular fue la ecuación:

$$k = C_{ni}k_i \quad (4.1)$$

donde $C_{ni} = \frac{12}{\alpha_i^4}$ es una corrección por el modo de oscilación; α_i para los modos 1 y 2 vale 1,875 y 4,694 respectivamente; k_i es la constante de fuerza de cada modo:

$$k_i = \frac{k_B T}{\chi_i^2 \langle z_i^{*2} \rangle} \quad (4.2)$$

aquí k_B es la constante de Boltzmann ($k_B \approx 1,3806 \times 10^{-23}$ J/K); T es la temperatura absoluta (K); χ_i es la relación entre las sensibilidades dinámica y estática del fotodiodo. Las sensibilidades son diferentes porque el fotodiodo no mide desplazamientos, sino ángulos de deflexión. El ángulo depende del modo de oscilación. En una palanca rectangular $\chi_1 = 1,090$ y $\chi_2 = 0,3138$. Finalmente, $\langle z_i^{*2} \rangle$ es el área bajo la curva medida en la PSD.

Si se ajustan las resonancias de la PSD ¹ a un oscilador armónico simple (SHO):

$$\text{PSD} = B + \frac{a_{0i} f_i^4}{(f^2 - f_i^2)^2 + \left(\frac{f f_i}{Q_i}\right)^2} \quad (4.3)$$

donde f_i y Q_i son la frecuencia de resonancia y el factor de calidad, respectivamente; a_{0i} es la amplitud para $f = 0$ y B es el fondo. El área bajo la curva $\langle z_i^{*2} \rangle$ será [17]:

$$\langle z_i^{*2} \rangle = \frac{\pi a_{0i} f_i Q_i}{2} = \frac{a_{01} \omega_i Q_i}{4} \quad (4.4)$$

Sustituyendo (4.4) en (4.2) tenemos que:

$$k_i = \frac{4k_B T}{\chi_i^2 a_{0i} \omega_i Q_i} \quad (4.5)$$

Hasta el momento se ha considerado una palanca rectangular. Sin embargo en medio líquido es más popular el uso de palancas triangulares (en forma de V). Stark *et al.* [15] modelaron este tipo de palancas por elementos finitos y obtuvieron los parámetros adecuados para corregir la sensibilidad del fotodiodo y los modos de oscilación. La tabla (4.1.1) muestra un resumen de los parámetros

¹La PSD se debe haber convertido previamente de V^2/Hz a m^2/Hz mediante la sensibilidad estática a la deflexión.

χ adecuados para cada tipo de palanca y las expresiones para determinar las constantes de fuerza. En la sección 4.4.5 se realiza una caracterización completa de una palanca triangular SNL (Bruker) por el método del ruido térmico.

Tabla 4.1.1 – Parámetros para determinar las constantes de fuerza de micropalancas rectangulares y triangulares basados en la ecuaciones (4.5) y (4.1).

Geometría	χ_1	χ_2	k_1	k_2	k^*	
					modo 1	modo 2
Rectangular	1,090	0,3138	$\frac{3,37k_B T}{a_{01}\omega_1 Q_1}$	$\frac{40,6k_B T}{a_{02}\omega_2 Q_2}$	$0,971k_1$	$0,025k_2$
Triangular	1,125	0,3479	$\frac{3,16k_B T}{a_{01}\omega_1 Q_1}$	$\frac{33,0k_B T}{a_{02}\omega_2 Q_2}$	$0,963k_1$	$0,036k_2$

* Tanto el primero como el segundo modo pueden ser utilizados para determinar la constante de fuerza de la palanca [13, 16]

El trabajo de Cook *et al.* [17] resulta especialmente útil en la implementación práctica del método del ruido térmico. Hasta el momento se ha considerado, por ser la práctica más extendida en la operación de los AFM, que el láser se enfoca en el extremo de la palanca. Cuando el láser no se enfoca en el extremo de la palanca los coeficientes de corrección de la sensibilidad del fotodiodo para la determinación del la constante de fuerza son diferentes. El lector interesado en este tema puede remitirse al trabajo de Schäffer de la referencia [73] .

4.2. Modelo teórico de partida

Para estudiar la relación entre el la energía disipada, la fase y los armónicos generados en medio líquido se parte del modelo desarrollado por Amir F. Payam y Ricardo García para explicar el contraste de fase en AM-AFM [31]. La figura 4.2 muestra un esquema del balance energético de una palanca que oscila en un medio (aire o líquido) e interactúa con una muestra. Se considera la palanca como una viga continua con dos modos de oscilación [70, 29, 64, 72]. Una parte de la energía mecánica externa W_{ext} se transfiere al medio por amortiguación hidrodinámica W_{med} y otra parte se disipa en la muestra durante la interacción con la punta E_{dis} ; en promedio se cumple que:

$$W_{ext} = W_{med} + E_{dis} \tag{4.6}$$

La energía externa suministrada a la palanca durante un período de oscilación será:

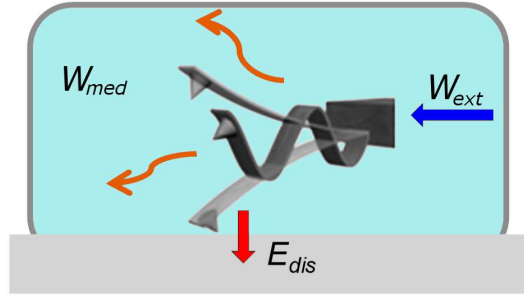


Figura 4.2 – Esquema del balance de energía para una palanca con dos modos de oscilación. Se consideran 3 tipos de contribuciones energéticas: la energía externa suministrada al sistema (W_{ext}), la energía transferida al medio por amortiguación hidrodinámica (W_{med}) y la energía disipada durante la interacción con la muestra (E_{dis}).

$$W_{\text{ext}} = \int_0^T F_0 \cos(\omega t) \dot{q}(t) dt \quad (4.7)$$

aquí F_0 es la fuerza de excitación de la palanca a la frecuencia ω y q es la deflexión total de la palanca, que se puede describir en función de los armónicos A_n y su desfase ϕ_n :

$$q(t) = \sum_{n=1}^N A_n \cos(n\omega t - \phi_n) + q_0 \quad (4.8)$$

Al derivar respecto al tiempo la expresión anterior se obtiene:

$$\dot{q}(t) = \sum_{n=1}^N n\omega A_n \sin(\phi_n - n\omega t) \quad (4.9)$$

Sustituyendo (4.9) en (4.7) tenemos que:

$$W_{\text{ext}} = F_0 \sum_{n=1}^N n\omega A_n \int_0^T \cos(\omega t) \sin(\phi_n - n\omega t) dt = F_0 \sum_{n=1}^N n\omega A_n I \quad (4.10)$$

La integral $I = 0$ para todo $n > 1$, cuando $n = 1$ vale $I = \frac{\pi}{\omega} \sin\phi_1$. La expresión final para W_{ext} es:

$$W_{\text{ext}} = \pi F_0 A_1 \sin \phi_1 \quad (4.11)$$

Por otra parte, la energía transferida al medio por amortiguación hidrodinámica para los dos primeros modos es:

$$W_{\text{med}} = \sum_{j=1}^2 \frac{k_j}{Q_j \omega_j} \int_0^T \dot{q}_j^2 dt \quad (4.12)$$

donde el subíndice j es el número de modo, k_j , Q_j y ω_j son la constante de fuerza, el factor de calidad y la frecuencia de resonancia de cada modo, respectivamente.

Hasta este punto el trabajo propuesto por Payam *et al.* [31] coincide con la propuesta que se abordará en la sección 4.4.2. De aquí en adelante la mayor diferencia estriba en la manera en la que se estiman la deflexión total y la de los modos. En el modelo de Payam se considera que la deflexión asociada a cada modo se puede expresar como:

$$q_j(t) \approx \sum_{n=1}^N A'_n(j) \cos(n\omega t - \phi'_n(j)) \quad (4.13)$$

donde la prima (') de A'_n y ϕ'_n indican que son referidos al modo, no debe confundirse con el símbolo de derivación.

Si se considera que la deflexión del segundo modo q_2 se puede expresar como la diferencia entre la deflexión total q y la del primer modo q_1 se obtiene:

$$q_2 = q - q_1 = \sum_{n=1}^N \left(A_n \cos(n\omega t - \phi_n) - A'_n(1) \cos(n\omega t - \phi'_n(1)) \right) \quad (4.14)$$

Sustituyendo (4.9), (4.11), (4.12) y (4.14) en (4.6), asumiendo que la fase de los armónicos del primer modo estará dominada por la del primer armónico ($\phi'_n(1) \approx \phi_n$) y que se mide en resonancia ($\omega = \omega_1$), se llega a la siguiente expresión para el seno de la fase:

$$\sin \phi_1 = \frac{1}{\pi F_0 A_1} \left[\frac{\pi k_1}{Q_1} \sum_{n=1}^N n^2 A_n'^2 + \frac{\pi k_2 \omega_1}{Q_2 \omega_2} \sum_{n=1}^N n^2 [A_n - A'_n]^2 + E_{\text{dis}} \right] \quad (4.15)$$

donde ϕ_1 , A_1 , k_1 , Q_1 y ω_1 son la fase, la amplitud, la constante de fuerza, el factor de calidad y la frecuencia de resonancia del modo 1, respectivamente. Los parámetros análogos del segundo modo tienen el subíndice 2. $F_0 \approx k_1 A_0 / Q_1$ es la fuerza de excitación. E_{dis} es la energía transferida de la palanca a la muestra. A_n y A'_n son los armónicos totales y del primer modo, respectivamente. El modelo

es válido para mediciones en aire y líquido y asume que el sistema se excita a la frecuencia de resonancia del primer modo ($\omega_{\text{exc}} = \omega_0$).

La ecuación (4.15) implica que hay dos factores que contribuyen al seno de la fase:

1. La fortaleza de los armónicos superiores generados; estos se originan por la no-linearidad en la interacción punta-muestra.
2. La cantidad de energía mecánica transferida de la palanca a la muestra (disipación²).

La contribución conservativa de la fuerza de interacción punta-muestra se puede extraer de los armónicos superiores [74, 75] incluso cuando el ciclo de retroalimentación mantiene fija la amplitud de trabajo ($A = \text{constante}$). Esta es la diferencia clave del modelo respecto a aquellos basados en el modelo de masa puntual [25, 37]. No obstante, si se considera que $A_n \approx A'_n$ se llega una expresión similar a la obtenida por Tamayo [39] a partir de un modelo de masa puntual:

$$\sin \phi_1 = \frac{1}{\pi F_0 A_1} \left[\frac{\pi k_1}{Q_1} \sum_{n=1}^N n^2 A_n^2 + E_{dis} \right] \quad (4.16)$$

A su vez, en condiciones ambientales donde los valores de Q están en el orden de 10^2 , los armónicos superiores tienen una amplitud despreciable respecto a A_1 y la expresión (4.15) se ve reducida a la conocida ecuación [37, 25, 65, 38]:

$$\sin \phi_1 = \frac{1}{\pi F_0 A_1} \left[\frac{\pi k_1}{Q_1} A_1^2 + E_{dis} \right] \quad (4.17)$$

La validez de la ecuación (4.15) fue comprobada con simulaciones (realizadas por Amir F. Payam) y experimentos. En las simulaciones se consideró la interacción punta muestra mediante el modelo Derjaguin-Muller-Toporov (DMT)[76] F_{DMT} y la fuerza de viscosidad F_{vis} se derivó a partir del modelo de Voigt asumiendo un contacto tipo Hertz como hicieron García *et al.* en la referencia [38]:

$$F_{\text{DMT}} = E^* R^{1/2} \delta^{3/2} - 4\pi R \gamma_{a,r} \quad (4.18)$$

$$F_{\text{vis}} = -\eta \sqrt{R\delta} \frac{\partial \delta}{\partial t} \quad (4.19)$$

donde E^* es el módulo de Young efectivo entre la punta y la muestra, R el radio de la punta, δ es la profundidad de la indentación; γ_a y γ_r son las energías

²También se considera "disipada" la energía transferida al medio por la amortiguación hidrodinámica, pero esa ya está contemplada en los factores de calidad Q_1 y Q_2 .

superficiales del contacto punta muestra durante el acercamiento y la separación, respectivamente; finalmente, η es el coeficiente de viscosidad. Según este modelo, los materiales quedan descritos a partir de su módulo de Young (E) y su viscosidad (η). Es importante señalar que la viscosidad depende tanto de la deformación como de la velocidad a la que la deformación cambia [3].

El módulo de Young efectivo de la interacción E^* se puede calcular como:

$$\frac{1}{E^*} = \left(\frac{1 - \nu_t^2}{E_t} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} \right) \quad (4.20)$$

donde ν es el coeficiente de Poisson y los subíndices t y s representan a la punta y la muestra, respectivamente.

La distorsión de los armónicos (HD) es una magnitud útil que proporciona información sobre el grado de anarmonicidad de la señal; se define como:

$$HD = \frac{1}{A_1^2} \sum_{n=2}^N n^2 A_n^2 \quad (4.21)$$

La figura 4.3 es un ejemplo de cómo se comportarían la fase, la distorsión de armónicos y la energía disipada para diferentes materiales. Los valores mostrados corresponden a una palanca oscilando a una amplitud $A_{sp} = 0,7A_0$, $A_0 = 10$ nm. Las columnas vacías representan un material ideal, en el que la interacción punta-muestra es perfectamente elástica. Las rayadas y las llenas se corresponden con materiales con viscosidad de 10 y 100 Pa·s, respectivamente.

La figura 4.3a muestra cómo los valores de desfase se incrementan monótonamente con la rigidez del material en el caso ideal de ausencia de disipación (columnas vacías) y cuando la viscosidad $\eta = 10$ Pa·s (columnas rayadas) . Sin embargo, la situación cambia drásticamente para $\eta = 100$ Pa·s (columnas llenas). La fase presenta un mínimo cuando $E = 500$ MPa. Este tipo de comportamiento fue verificado experimentalmente y será discutido en la sección 4.4.5.

La figura 4.3b muestra la evolución de la distorsión de los armónicos. Esta aumenta monótonamente con el módulo de Young con independencia de la viscosidad de la muestra. En la figura 4.3c se aprecia que la disipación es considerablemente mayor cuando $\eta = 100$ Pa·s y sin embargo para este tipo de material la HD también crece con E . Esto último también ha sido corroborado experimentalmente y será discutido en las secciones 4.4.5 y 4.4.6.

Las simulaciones presentadas en la figura 4.3 sirven como referente a la hora de analizar los resultados experimentales desde un punto de vista cualitativo. En la práctica, no existe un material puramente elástico, y no se han considerado las fuerzas de adhesión durante la interacción punta-muestra. Las fuerzas de

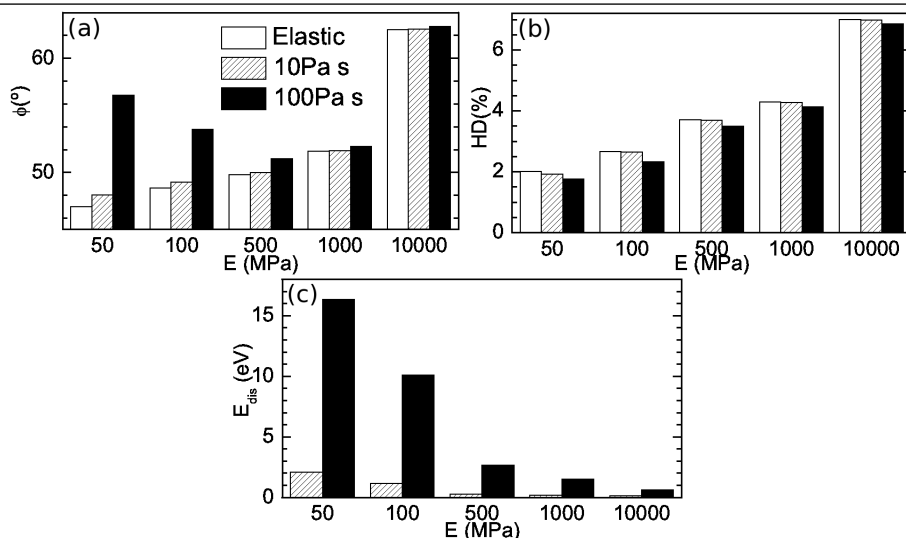


Figura 4.3 – Resultado de las simulaciones de fase (a), distorsión de armónicos (b) y energía disipada (c) para materiales de diferentes viscosidad en función del módulo de Young (E). Las columnas vacías son puramente elásticas, las rayadas tienen viscosidad $\eta = 10 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y las llenas tienen $\eta = 100 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. $A_0 = 10 \text{ nm}$ y $A_{sp} = 0,7A_0$.

Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) están presentes en líquido, pero se ha considerado que la concentración de iones es lo suficientemente alta como para apantallarlas [29]. No obstante a todas las limitaciones mencionadas, el modelo describe adecuadamente los resultados experimentales que serán discutidos más adelante en este capítulo.

4.3. Estudio cualitativo del contraste de fase en membrana púrpura depositada sobre mica

Las membranas biológicas están compuestas por una gran variedad de lípidos y proteínas. Por muchos años se pensó que los lípidos solo tenían la función de aislar y permitir la difusión, mientras que las proteínas se consideraban responsables de las propiedades y la función de la membrana. En realidad, son las interacciones entre proteínas y lípidos a nivel molecular las que determinan la función de las membranas. Comprender dichas relaciones constituye un gran reto para quienes se dedican al estudio de la estructura y la función de las membranas [77].

La membrana púrpura (PM) de *Halobacterium salinarum* ocupa hasta el 50% de su área superficial [78]; su función es convertir la luz en un gradiente de pro-

tones y de este modo la bacteria obtiene energía. El estudio de la PM es particularmente interesante porque *in vivo* existe como zonas cristalinas bidimensionales de proteínas y lípidos con una composición química bien definida [77]. Esto también la convierte en superficie modelo para los estudios por AFM: la proteína forma una red 2D con arreglo hexagonal. Su uso es común para calibrar la resolución lateral de los AFM en medio líquido [79].

La figura 4.4 muestra un esquema de la forma en la que se organizan la proteína y los lípidos en la membrana. Hay un solo tipo de proteína, la *bacteriorodopsina* (bR), que se organiza en trímeros y ocupan el 75 % de la masa de la membrana. El resto está formado por 30 moléculas de lípido (6 dentro del trímero, 24 fuera). Los lípidos que los rodean tienen una importancia vital en el ordenamiento de las proteínas e influyen en las propiedades físicas de cada cara: la estructura cristalina de la cara citoplasmática (CP) es más flexible que la extracelular (EC). A este resultado se ha llegado a partir del estudio de la estructura cristalográfica [77] y se ha medido mediante dispersión de neutrones [80] y AFM [78]. No obstante, los estudios mediante espectroscopía de fuerza (curvas de fuerzas estáticas) indican que la cara CP es más rígida que la EC [28, 81].

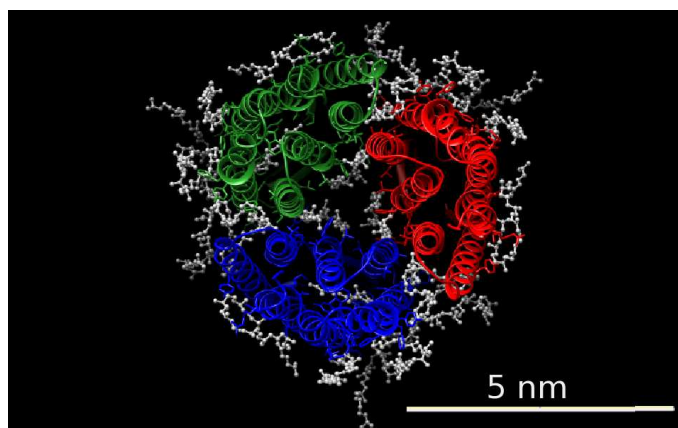


Figura 4.4 – Esquema de los trímeros de la membrana púrpura (PM). Las *bacteriorodopsinas* han sido representadas en verde, rojo y azul. Cada una está formada por 7 α -hélices rodeadas por lípidos (gris). Reconstrucción basada en la estructura 1QHJ del PDB.

Para identificar las caras EC y CP de la membrana se podrían utilizar anticuerpos específicos que se enlazaran al C-terminal de la cara citoplasmática [82, 83]. Sin embargo hay un método más sencillo propuesto por Voitchovsky *et al.* [28]. Se puede diferenciar la región EC de la CP en las imágenes de topografía. Era común observar que en ocasiones los parches presentan abultamientos deba-

jo de la superficie. Imágenes de alta resolución mostraron que esto ocurría solo cuando la cara CP estaba expuesta a la punta del AFM.

Por otra parte, Contera *et al.* [78] mostraron que la membrana crea una capa de iones que se condensa sobre la cara extracelular. La punta del AFM puede percibir los efectos de esta capa iónica. Por tal motivo las imágenes de topografía de la región extracelular aparecen ligeramente más altas que las de la región citoplasmática. Si se aumenta la condensación de sales del medio también aumenta la condensación de iones sobre la cara extracelular. En el trabajo de Contera *et al.* al aumentar paulatinamente la concentración de iones se llega a una concentración a la cual ya no se pueden visualizar los trímeros de la cara EC, pero sí se distinguen los de la cara CP. Esta capa condensada de iones no se puede explicar mediante la teoría clásica DLVO. Curiosamente, cuando se realizan los experimentos en modo contacto la capa iónica no se detecta [78, 84]. La capa iónica puede ser la responsable de que en la operación dinámica de la palanca perciba que la cara EC sea más rígida que la CP, mientras la espectroscopía de fuerza muestra lo contrario.

Para preparar las muestras, se depositó una gota de solución de PM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en solución tampón (10 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,1) durante 30 min, luego se lavó con la misma solución para remover los parches que habían quedado débilmente pegados. La misma solución fue utilizada para tomar las imágenes.

La Figura 4.5 muestra imágenes de PM recogidas en el AFM Agilent, con palancas tipo MAC VI y excitación magnética. En la imagen de topografía (figura 4.5a) se aprecian dos regiones de diferente altura correspondientes a las caras citoplasmática (CP) y extracelular (EC) de la membrana. La altura medida en la imagen de topografía de la figura 4.5a es inferior a 5 nm. La explicación es que la palanca comprime la membrana al medir, haciendo que su altura aparente sea menor que la real. A medida que se disminuye la amplitud de trabajo, se ejerce mayor fuerza sobre la membrana y por tanto la altura aparente es menor. La diferencia entre las caras de la membrana es también visible en el canal de fase (figura 4.5b). La cara CP aparece más oscura que la EC. $\Delta\phi_{\text{EC-CP}} \approx 2^\circ$, mientras la diferencia respecto a la mica es de más de 15° ($E_{\text{mica}} \approx 10 \text{ GPa}$).

Un barrido de mayor resolución en la zona marcada con un cuadro en la figura 4.5c muestra los arreglos de trímeros en el canal de fase. Específicamente, se pueden definir dos regiones con ordenamientos en diferentes direcciones (marcados con flechas). La zona intermedia, más oscura, contiene un mayor predominio de lípidos.

Las figuras 4.5d y e muestran imágenes de PM con resolución molecular tanto en topografía como en fase. Los trímeros de bR tienen un arreglo 2D con una

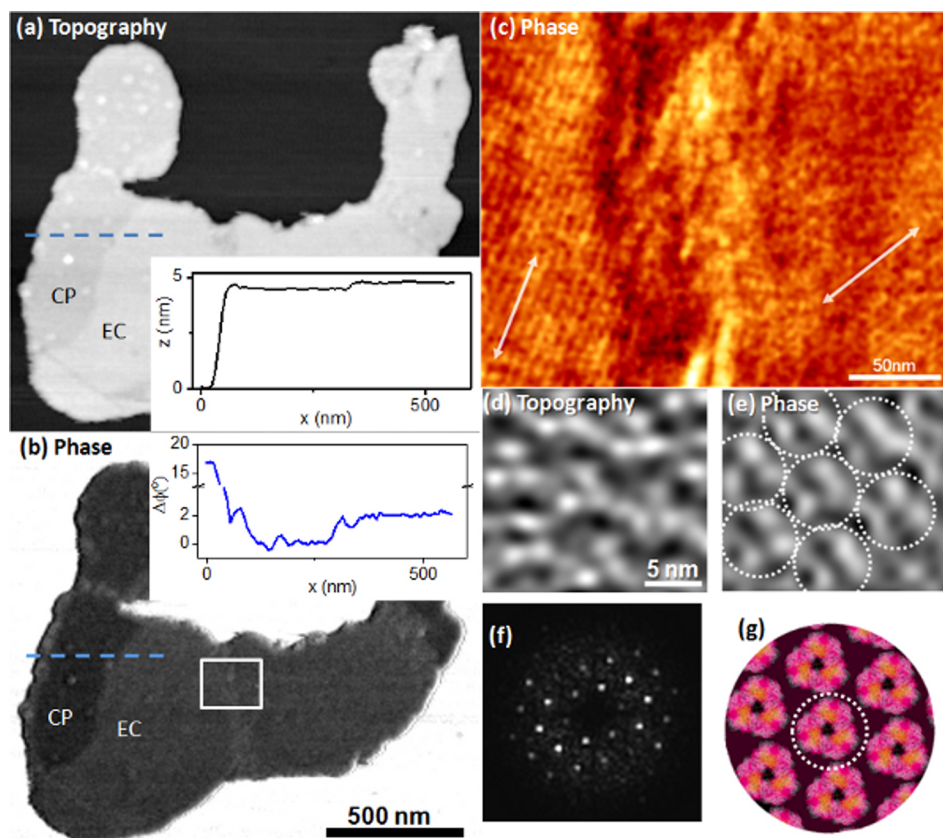


Figura 4.5 – Topografía y diferencia de fase entre un parche de PM y la mica. Imagen tomada en solución tampón (10 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,1). (a) Topografía. La sección a lo largo de la línea discontinua muestra el espesor medido de la PM. (b) Diferencia de fase ($\Delta\phi_{mica-PM}$). La sección muestra la diferencia de fase a lo largo de la línea discontinua. Nótese que la cara CP aparece más oscura. (c) Un acercamiento de la zona marcada en (b) muestra la interfase entre dos zonas con diferente orientación de la red de bR ($A_{sp} = 0,6A_0$, $A_0 = 8$ nm). (d) y (e) Imagen de los trímeros con alta resolución en topografía y fase, respectivamente. El diámetro de los círculos punteados es de 6,6 nm. (f) Espectro de potencia 2D de la imagen mostrada en el panel (e). (g) Reconstrucción de los trímeros de bR en la PM, creada a partir de la estructura 1ATB del PDB. El círculo encierra un trímero, similar a los marcados en el panel (e).

periodicidad de 6,6 nm (teórica, 6,5 nm). El orden se aprecia en la figura 4.5f , donde se ha representado la densidad espectral de potencia (PSD) de la imagen en el panel e. Finalmente, el dibujo de la figura 4.5g es una reconstrucción de la estructura de la región extracelular de la membrana púrpura, basado en la estructura 1AT9 del PDB [85].

En términos generales, los resultados muestran que la teoría desarrollada en la sección 4.2 describe cualitativamente el contraste de fase observado entre las caras de la membrana púrpura y la superficie de mica (figura 4.5b). Este análisis puede extenderse incluso a las regiones en las que ya es posible distinguir el ordenamiento de los trímeros de bR respecto a las zonas donde la concentración de proteínas es menor (figura 4.5c), pero no puede ser extendido a las imágenes con resolución molecular (4.5e).

Aunque los estudios de espectroscopía muestran que la bR es más rígida que los lípidos que la rodean [86], el espaciamiento entre los trímeros es del orden del radio de la punta ($R = 5 - 20$ nm). En este caso, el contraste de fase estará influenciado por las dimensiones de la punta, y por la dirección y la velocidad del barrido. De acuerdo a las estimaciones de Stark *et al.* [30] la topografía es responsable de al menos dos terceras partes del contraste de fase en las imágenes de alta resolución de membrana púrpura.

La figura 4.6 muestra cómo cambia la diferencia de fase $\Delta\phi$ entre la membrana púrpura y la mica en función de la amplitud de trabajo, normalizada a la amplitud libre. Las mediciones del contraste de fase se realizaron a cuatro diferentes amplitudes de trabajo A/A_0 y se realizaron simulaciones asumiendo que la interacción con la mica es perfectamente elástica ($\eta = 0$) y un módulo de Young ($E = 10$ GPa). Para la membrana púrpura se consideró $E = 50$ MPa y $\eta = 10$ Pa·s. La palanca es MAC VI y sus parámetros son los expuestos en la sección anterior. Estos valores de módulo de Young y viscosidad son similares a los reportados en la literatura [29]. En ningún caso se consideraron las energías superficiales de contacto, lo cual constituye una fuerte aproximación especialmente en el caso de la interacción con la mica. De este modo en vez de una interacción DMT de la ecuación (4.18) se modeló una interacción tipo Hertz ($\gamma_a = \gamma_r = 0$). Esto no resta validez al modelo propuesto por la ecuación (4.15) pero sí influye a la hora de realizar simulaciones: si se considera que $\eta_{\text{mica}} = 0$ y no se considera la adhesión punta-muestra, los armónicos calculados en las simulaciones serán mucho mayores que los que se midan experimentalmente.

En el experimento, a medida que A/A_0 disminuye $\Delta\phi$ aumenta hasta llegar a un máximo, y luego comienza a disminuir. No obstante a las aproximaciones, los resultados de la simulación ajustan bien los resultados experimentales obte-

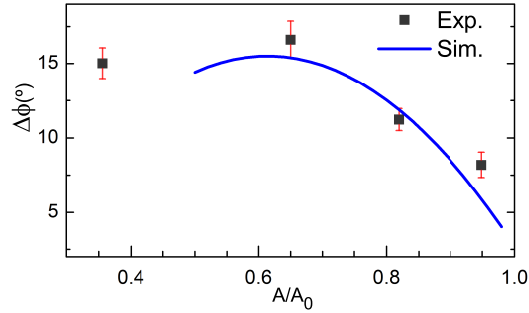


Figura 4.6 – Diferencia de fase ($\Delta\phi$) en la zona EC de la PM respecto a la mica. Los resultados experimentales se comparan con los valores simulados para una palanca MAC VI excitada magnéticamente. Se tomó $A_0 = 9,4$ nm, para la mica $E = 10$ GPa y para la PM $E = 50$ MPa, $\eta = 10$ Pa·s.

nidos. Las simulaciones llegaron hasta la mitad de la amplitud libre ($A_{sp} = 0,5A_0$) debido a que para menores amplitudes la influencia del sustrato era demasiado grande. Como barras de error de los puntos experimentales se tomó la desviación estándar de los histogramas de fase en la imagen (figura 4.5b).

4.4. Implementación experimental del cálculo de la energía disipada en medio líquido

4.4.1. Contribución de los armónicos de cada modo a la amplitud total de la oscilación

La figura 4.7a muestra la señal temporal de una palanca que oscila con amplitud $A_{sp} = 0,6A_0$; $A_0 = 11,5$ nm sobre la superficie de mica. La palanca es tipo MAC IC ($\omega_0 = 2\pi 40$ kHz, $k = 2,5$ N/m, $R = 10$ nm) excitada magnéticamente en medio líquido. El segundo modo de estas palancas se encuentra a una frecuencia $\omega_2 = 7,7\omega_0$. La transformada rápida de Fourier (FFT) de la señal (figura 4.7b) muestra que los armónicos crecen cerca del segundo modo, pero no se conoce cuál es la contribución de cada modo a los armónicos.

La señal temporal fue registrada con un osciloscopio DPO 7054 (Textronix) un paso temporal de 20 ns. Se recogieron aproximadamente 5×10^5 puntos con lo cual al realizar la FFT el ancho de banda era de 50 MHz. El paso en frecuencia al realizar la FFT era de 100 Hz. Se utilizó un código basado en la función “fft” de MatLab (MathWorks). Como la FFT no está promediada el ruido de fondo es alto. El nivel de ruido se puede disminuir si se utiliza el osciloscopio para obtener y

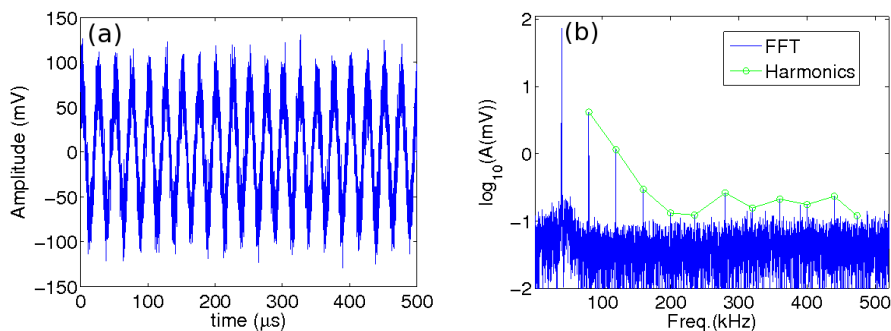


Figura 4.7 – (a) Señal de amplitud de la oscilación de la palanca recogida en el fotodiodo. La palanca oscila sobre mica en medio líquido a $A_{sp} = 0,6A_0$, $A_0 = 11,5$ nm. (b) FFT de la señal temporal. Se ha graficado el tramo de frecuencias hasta el 12^{mo} armónico. Los armónicos superiores están representados con círculos verdes, unidos por una línea sólida. Palanca MACIC , $\omega_0 = 2\pi 40$ kHz, $k = 2,5$ N/m, $R = 10$ nm.

analizar los armónicos y promediarlos en tiempo real, lo cual no afecta la amplitud de los armónicos pero da una señal más limpia.

Calcular la energía disipada mediante la ecuación (4.15) requiere conocer los valores de los armónicos totales y del primer modo; esto experimentalmente resulta difícil y por tanto hay que realizar aproximaciones.

En los trabajos de Stark *et al.* [87, 68] se estudia la función de transferencia de la palanca bajo diversas condiciones de excitación e interacción con la muestra. Llegan a la conclusión de que la amplitud de los armónicos en el entorno del modo 2 proviene fundamentalmente de este modo. A este mismo resultado llegan Xu *et al.* [64] al estudiar la excitación momentánea del segundo modo durante la interacción de la palanca con la muestra. Con estos referentes se propone una modificación a la ecuación (4.15) según la cual la amplitud de los armónicos del primero al p -ésimo armónico está determinada por el modo 1, y el resto por el modo 2:

$$\sin \phi_1 = \frac{1}{\pi F_0 A_1} \left[\frac{\pi k_1}{Q_1} \sum_{n=1}^p n^2 A_n^2 + \frac{\pi k_2 \omega_1}{Q_2 \omega_2} \sum_{n=p+1}^N n^2 A_n^2 + E_{dis} \right] \quad (4.22)$$

Esta ecuación será menos exacta que (4.15) pero experimentalmente se puede implementar. El mayor problema sería determinar el valor de p . En las secciones siguientes se discuten las correcciones que permiten estimar la energía disipada en medio líquido.

4.4.2. Mediciones fuera de resonancia

Hasta el momento se ha asumido que se mide en resonancia ($\omega_d = \omega_0$). Esta condición en medio líquido generalmente no se cumple. Existen dos formas establecidas comercialmente para excitar las palancas: acústica y magnética.

En la excitación acústica, se utiliza el movimiento de un piezo para mover la base de la palanca. Un ejemplo de este tipo de sistema es la celda de líquidos del AFM Multimode 8 (Bruker) que se muestra en la figura 4.8a. Los piezoeléctricos son materiales sensibles al agua y por tanto hay que protegerlos. En este caso el piezo está dentro del cuerpo de vidrio de la celda, por tanto toda la celda se mueve lo cual es un problema que será analizado más adelante.

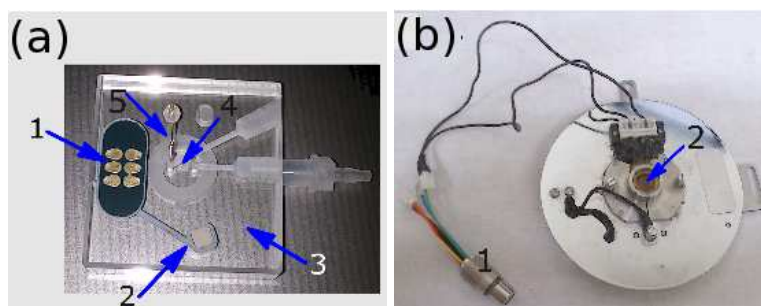


Figura 4.8 – (a) Celda de líquidos con excitación acústica del AFM Multimode 8 (Bruker). La señal de eléctrica llega a través del contacto 1 y se transmite al piezo 2. La vibración del piezo se transmite al cuerpo de la celda 3 y por extensión al chip de la palanca, que se monta en la ranura 4 y se sujeta con el muelle 5. (b) Vista inferior del soporte de la muestra con excitación magnética del AFM Agilent 5500. La señal de excitación magnética se logra haciendo pasar una señal eléctrica del conector 1 al solenoide 2, que genera el campo magnético variable que mueve la palanca.

En el ejemplo de la figura 4.8b, un solenoide debajo de la muestra crea el campo magnético capaz de mover la palanca (AFM Agilent). Este es un sistema más efectivo para medir en líquidos pero el recubrimiento magnético de las palancas lo hace más caro.

Con el método acústico se excitan simultáneamente la palanca, la celda y el líquido. Al realizar un barrido de frecuencias, aparecen varios picos (bosque de picos) [88, 40]. La figura 4.9 muestra este bosque de picos cuando se excita una palanca tipo SNL (corta) con la celda del AFM Multimode 8 en medio líquido (figura 4.8a). Se ha superpuesto la PSD del ruido térmico de la palanca a modo de referencia. Aunque sería tentadora la idea de imaginar que los picos altos son resonancias de la palanca, el recuadro con la imagen del barrido de frecuencia en aire indica claramente que las resonancias son las de la celda.

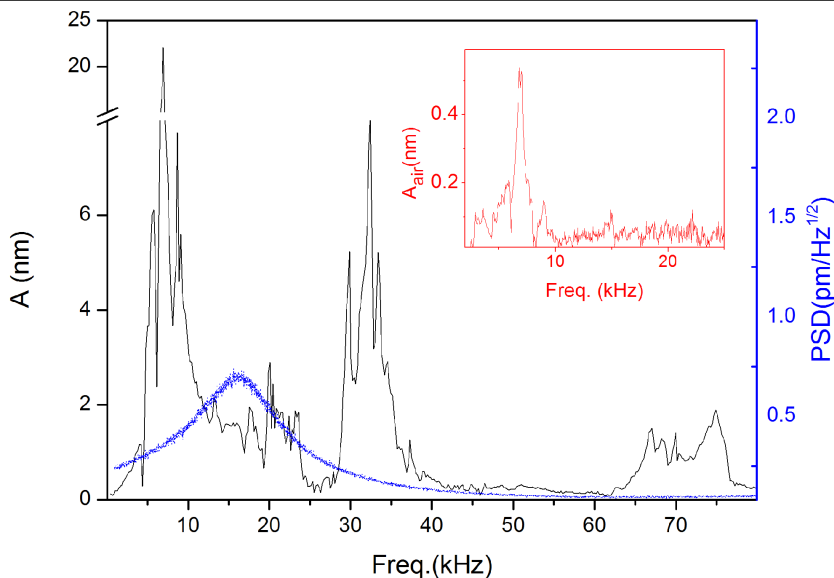


Figura 4.9 – Influencia de la excitación acústica sobre una palanca SNL (Bruker). El barrido de frecuencias en líquido (línea continua negra) muestra el bosque de picos. La línea de puntos (azul) es la PSD del ruido térmico. El recuadro muestra el barrido de frecuencias en aire (línea continua roja).

La amplitud de las resonancias de la celda en aire son 2 órdenes de magnitud menores que en líquido para la misma fuerza de excitación. En aire el movimiento de la base es pequeño comparado con la oscilación de la palanca. En líquidos, el movimiento de la base y la influencia de la excitación del fluido se pueden determinar experimentalmente a partir de las curvas de amplitud y fase [40].

En la práctica, al medir en medio líquido se busca un pico que se acerque a la resonancia del ruido térmico donde se obtengan las mejores imágenes. Por este motivo cuando se excita la palanca acústicamente se suele medir fuera de resonancia.

Cuando la palanca se excita magnéticamente hay una resonancia limpia (figura 4.10). En este caso, al acercar la palanca a la muestra, el factor de calidad Q y la frecuencia de resonancia ω_0 disminuyen [89]. En el ejemplo de la figura 4.10b se muestra como la frecuencia de resonancia ω_0 pasa de $2\pi 17$ kHz a $20 \mu\text{m}$ de la superficie a $2\pi 14,4$ kHz cerca de la misma; Q cae de 2,2 a 1,0. Las curvas de amplitud experimentales se llevaron a PSD y se normalizaron respecto al máximo a $20 \mu\text{m}$, luego fueron ajustadas a un oscilador armónico simple para obtener los valores de ω_0 y Q . En algunos casos la disminución es tal que el factor de calidad cae por debajo de 1 [90]. Nótese que si se ajusta la frecuencia de trabajo a 20

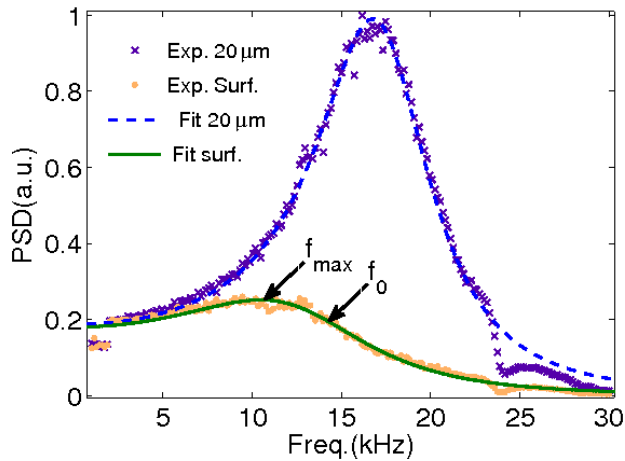


Figura 4.10 – La frecuencia de resonancia y el factor de calidad disminuyen cuando la palanca se acerca a la superficie. La PSD se obtuvo a partir de un barrido de frecuencia de una palanca MAC VI (Agilent) excitada magnéticamente. Las curvas experimentales fueron ajustadas al oscilador armónico simple.

μm o más de la superficie se medirá a una frecuencia mayor que la frecuencia de resonancia ($\omega_d > \omega_0$).

Por otra parte, si se mide en el máximo cerca de la superficie, se medirá a una frecuencia menor que la de resonancia. En el modelo SHO el máximo se encuentra desplazado a la izquierda de la frecuencia de resonancia. Este desplazamiento es pequeño para factores de calidad altos, pero puede ser considerable a bajo Q .

El fenómeno de la disminución de la frecuencia de resonancia y el factor de calidad es independiente del método de excitación ya sea acústico, magnético o térmico. La tabla 4.4.1 muestra las frecuencias y factores de calidad de los dos primeros modos de tres palancas comerciales: OMCL-RC800-PSA (Olympus, rectangular), OTR4 (Bruker, triangular) y SNL (Bruker, triangular). Los parámetros medidos a $200 \mu\text{m}$ son los que se utilizan para estimar la constante de fuerza por el método del ruido térmico. La frecuencia y el factor de calidad disminuyen cuando la palanca se acerca a la superficie. Se deben cuantificar las variaciones para cada tipo de palanca. Este tema se retomará más adelante al estimar la energía disipada en medio líquido.

Tabla 4.4.1 – Frecuencia de resonancia y factor de calidad de los dos primeros modos de palancas comerciales en función de la distancia a la muestra en agua.¹

Palanca/ Dist.	$\omega_1/2\pi$ (kHz)	Q_1	$\omega_2/2\pi$ (kHz)	Q_2	Valores normalizados ²			
					$\bar{\omega}_1$	\bar{Q}_1	$\bar{\omega}_2$	\bar{Q}_2
<i>RC800PSA</i>								
200 μm	20,9	3,6	134	8,1	1	1	1	1
20 μm	19,0	2,2	127	6,7	0,92	0,61	0,95	0,83
50 nm	18,6	1,9	126	6,0	0,89	0,52	0,94	0,74
<i>OTR4</i>								
200 μm	8,9	2,3	64,5	3,2	1	1	1	1
20 μm	8,3	1,4	63,6	3,2	0,93	0,61	0,99	1
50 nm	8,1	1,2	63,4	3,1	0,91	0,52	0,98	0,97
<i>SNL</i>								
200 μm	17,7	2,9	122	5,0	1	1	1	1
20 μm	16,7	2,1	119	4,6	0,94	0,72	0,98	0,92
50 nm	16,5	2,0	117	4,6	0,93	0,69	0,96	0,92

¹Los valores se han obtenido ajustando los picos del ruido térmico al modelo SHO.

²Como criterio de normalización, se dividió por el valor a 200 μm de la superficie.

4.4.3. Ecuación para la energía disipada fuera de resonancia

En la sección 4.2 se indicó que había un punto donde el modelo de Payam *et al.* [31] se retomaría para darle un nuevo enfoque al desarrollo de la ecuación (4.12). A partir de este punto se considera que la amplitud del modo está dominada por los armónicos más cercanos:

$$q_1 \approx \sum_{n=1}^p A_n \cos(n\omega t - \phi_n) \quad (4.23)$$

$$q_2 \approx \sum_{n=p+1}^N A_n \cos(n\omega t - \phi_n) \quad (4.24)$$

Los armónicos del primer modo son 1..p, y los del segundo modo desde (p + 1).. N. Al sustituir las ecuaciones de arriba en 4.12 y teniendo en cuenta que para todo $n \geq 1$:

$$\int_0^T \sin^2(\phi_n - n\omega t) dt = \frac{\pi}{\omega} \quad (4.25)$$

tenemos que:

$$W_{\text{med}} = \frac{\pi k_1 \omega}{Q_1 \omega_1} \sum_{n=1}^p (nA_n)^2 + \frac{\pi k_2 \omega}{Q_2 \omega_2} \sum_{n=p+1}^N (nA_n)^2 \quad (4.26)$$

Si se sustituyen (4.11) y (4.26) en (4.6) se obtiene:

$$E_{\text{dis}} = \pi F_0 A_1 \sin \phi_1 - \frac{\pi k_1 \omega}{Q_1 \omega_1} \sum_{n=1}^p (nA_n)^2 - \frac{\pi k_2 \omega}{Q_2 \omega_2} \sum_{n=p+1}^N (nA_n)^2 \quad (4.27)$$

Finalmente, si se considera $F_0 \approx \frac{k_1 A_0}{Q_1}$ y reordenando los términos:

$$E_{\text{dis}} = \frac{\pi k_1}{Q_1} A_0 A_1 \sin \phi_1 - \frac{\omega}{\omega_1} \frac{\pi k_1}{Q_1} \sum_{n=1}^p (nA_n)^2 - \frac{\omega}{\omega_2} \frac{\pi k_2}{Q_2} \sum_{n=p+1}^N (nA_n)^2 \quad (4.28)$$

Nótese que la ecuación (4.28) obtenida es la misma que (4.15) con la corrección de la excitación fuera de resonancia. La diferencia fundamental estriba en el modo de tratar las amplitudes de los armónicos. El parámetro p en las sumatorias debe determinarse experimentalmente. Además, se deben corregir las amplitudes de los armónicos A_n y las constantes de fuerza k_j de acuerdo a la sensibilidad del fotodiodo.

4.4.4. Corrección de la sensibilidad del fotodiodo a cada modo

Los AFM comerciales utilizan un *lock-in* para determinar la amplitud y la fase de la oscilación. De este modo tenemos que en los experimentos se tiene acceso a la amplitud A_1 , a la fase del primer armónico ϕ_1 y a la frecuencia de excitación ω . Adicionalmente mediante el método del ruido térmico se pueden obtener las frecuencias y factores de calidad de los dos primeros modos ω_1 , ω_2 , Q_1 y Q_2 y estimar un valor adecuado para el parámetro p . El montaje experimental descrito en la sección 4.4.1 permite adquirir la amplitud de los armónicos superiores. Todo esto es suficiente para calcular la energía disipada de acuerdo a la ecuación (4.28). Sin embargo, la sensibilidad del fotodiodo influye sobre la amplitud aparente de los armónicos y utilizar los valores del osciloscopio conlleva errores en el cálculo. En esta sección se asume que la sensibilidad del fotodiodo se tuvo en cuenta al determinar las constantes de fuerza de los modos como se explicó en la sección 4.1.

Si se asume que la amplitud de los armónicos 1 al p se debe mayoritariamente al modo 1, y el resto al modo 2, la amplitud de los armónicos (A_{nj}) se puede estimar:

$$A_{nj} \approx \chi_j A_{nj}^* \quad (4.29)$$

donde el subíndice j corresponde al modo, χ_j es la sensibilidad del fotodiodo a cada modo y A_{nj}^* es la amplitud del armónico medida en el osciloscopio. Como el osciloscopio da amplitudes en voltios vamos considerar que $A_{nj}^* (\text{nm}) = S_D A_{nj}^* (\text{V})$ donde S_D es la sensibilidad a la deflexión y se obtiene de las curvas estáticas de fuerza.

Por otra parte, la amplitud libre corregida será:

$$A_0 = \sum_{n=1}^N \chi_{nj} A_{0nj}^* \cos(\omega_0 t - \phi_{0n}) \quad (4.30)$$

aquí el subíndice cero indica que los valores se recogen a la frecuencia de resonancia ω_0 del sistema; esto es independiente de la frecuencia de excitación utilizada. Conocer el valor de A_0 implicaría conocer los valores de las fases ϕ_n de cada armónico. A efectos del AFM se utiliza el lock-in para determinar la amplitud y solo se utiliza el armónico fundamental A_0^* para determinar la amplitud libre:

$$A_0 \approx \chi_1 A_0^* \quad (4.31)$$

El uso de la expresión (4.31) se justifica porque el armónico fundamental continúa siendo dominante en medio líquido.

Sustituyendo (4.31) y (4.29) en (4.28), y teniendo en cuenta el desplazamiento de las resonancias a la izquierda cuando la palanca se acerca a la muestra (Tabla 4.4.1) tenemos que:

$$E_{\text{dis}} = \frac{\pi k_1 \chi_1^2}{Q_{1s}} \left(A_{0s}^* A_{1s}^* \sin \phi_1 - \frac{\omega}{\omega_{1s}} \sum_{n=1}^p n^2 A_n^{*2} \right) - \frac{\pi k_2 \chi_2^2}{Q_{2s}} \frac{\omega}{\omega_{2s}} \sum_{n=p+1}^N n^2 A_n^{*2} \quad (4.32)$$

donde los subíndices s indican que estos parámetros deben ser medidos cerca de la superficie. A_{0s}^* es la amplitud libre a la frecuencia de resonancia ω_{1s} ; A_n^* son los armónicos medidos en la FFT de la señal temporal del fotodiodo³; ϕ_1 es la fase del primer modo; p es el armónico hasta el cual amplitud del armónico está

³Si se utiliza un osciloscopio para realizar la FFT, debe tenerse en cuenta que frecuentemente se obtiene el valor RMS de la amplitud.

gobernada por el modo 1; χ_i son las sensibilidades del fotodiodo mostradas en la tabla 4.1.1.

Una vez más, si la excitación es magnética es posible saber cuánto vale la amplitud libre cerca de la superficie, pero si la excitación es acústica deberá ser estimada debido al bosque de picos.

4.4.5. Estimación de la energía disipada en muestras de membrana púrpura depositadas sobre mica

La ecuación (4.32) se utilizó para medir la energía disipada en PM y mica con palancas comerciales SNL (corta) (Bruker). Los experimentos se realizaron en un AFM Multimode 8 con controlador Nanoscope V (Bruker). Se depositó una gota de solución con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PM en solución tampón (15 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,5) en mica recién exfoliada por 10 min, se lavó con la solución para eliminar los parches débilmente pegados. La misma solución tampón se utilizó para medir.

Bajo estas condiciones se obtuvieron los parches de membrana, pero también de una, dos capas y montículos (o bultos) que quedaban como una carpa apoyada sobre la mica. Esto es muy conveniente para estudiar la energía disipada. Cuando se tiene una capa la influencia de la mica debajo de la membrana es muy alta. Si hay dos capas, o si la membrana queda apoyada como una carpa con líquido debajo se pueden medir propiedades que antes eran inaccesibles.

La figura 4.11 muestra imágenes de topografía y fase de membrana púrpura depositada sobre mica en medio líquido. La topografía muestra como algunas membranas caen planas sobre la superficie y tienen una altura de 5 – 6 nm mientras otras quedan formando unos bultos que pueden alcanzar más de 30 nm de altura (figura 4.11a). Donde hay una capa de membrana, el contraste de fase es más oscuro. Sin embargo el contraste de fase es el mismo en la mica, en los bultos y donde la membrana es doble (figura 4.11b). Los armónicos obtenidos a partir de la señal del fotodiodo (figura 4.11c) son mucho mayores en la mica que en el montículo de PM. Esto confirma que, como se discutió antes, dos materiales de diferente módulo de Young pueden tener la misma fase (figura 4.3a).

El cálculo de la energía disipada requiere conocer los parámetros de los modos k_i , Q_i , a_{0i} . La figura 4.12 muestra la PSD de la palanca SNL utilizada en las mediciones de la figura 4.11. Los picos del primer y el segundo modo fueron ajustados al oscilador armónico según (4.3). Del ajuste se obtuvo que $\omega_{01} = 2\pi 17,6$ kHz, $a_{01} = 1,73 \times 10^{-25}$ m²/Hz, $Q_1 = 2,33$, $\omega_{02} = 2\pi 119,3$ kHz, $a_{02} = 4,51 \times 10^{-27}$ m²/Hz, $Q_2 = 4,97$. Teniendo en cuenta las ecuaciones para la palanca triangular de la tabla 4.1.1 se obtuvo que $k_1 = 0,289$ N/m y $k_2 = 8,01$ N/m. La

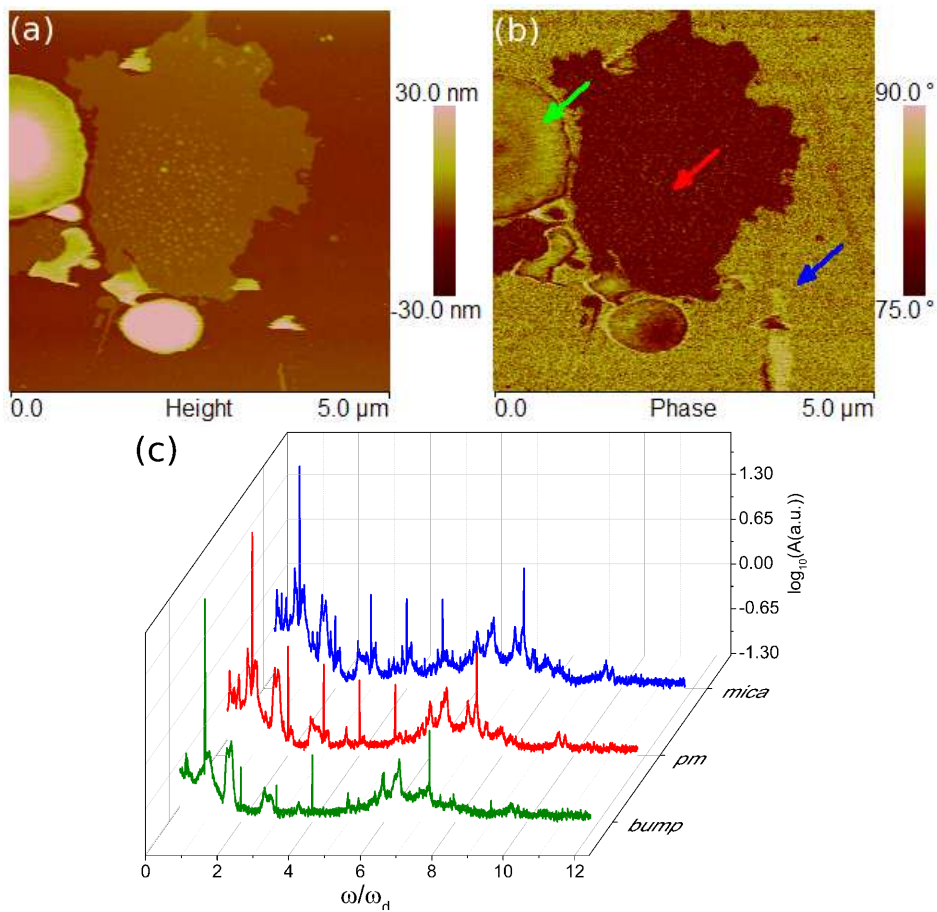


Figura 4.11 – Imagen de AFM de topografía (a) y fase (b) de membrana púrpura (PM) depositada sobre mica en medio líquido. Se registraron los espectros (FFT de la señal que llega al fotodiodo) en los puntos marcados con flechas en el canal de fase: mica, PM y PM abultada (c). AFM Multimode. Palanca SNL (corta) excitada acústicamente a frecuencia $\omega_d = 2\pi 17$ kHz, $A_0 = 3,5$ nm, $A/A_0 = 0,85$. Medio: solución tampón (15 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,5).

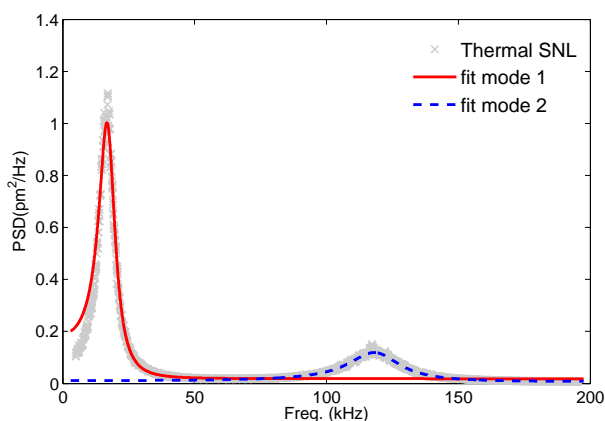


Figura 4.12 – Espectro de ruido térmico de la palanca SNL (corta) utilizada en la figura 4.11. Los picos de los dos primeros modos han sido ajustados al modelo del oscilador armónico de la ecuación (4.3).

constante de fuerza calculada a partir del ajuste del primer modo fue $k = 0,278$ N/m y a partir del segundo modo se obtuvo $k = 0,288$ N/m. Estos valores de k confirman que tanto el primer modo como el segundo pueden ser utilizados para determinar la constante de fuerza de la micropalanca.

Para cuantificar la disipación se utilizó la ecuación (4.32). Los resultados se muestran en la tabla 4.4.2. Se han comparado los valores de energía disipada cuando se utilizan el modelo propuesto con las correcciones y el modelo propuesto por Tamayo utilizando la información de todos los armónicos (ecuación (4.16)).

Se ha incluido también una columna con los valores medidos de A_1 , la amplitud del armónico fundamental. El AFM utiliza un *lock-in* para mantener la amplitud constante. Sin embargo, se ha observado que en la superficie de mica la amplitud del primer armónico es menor que sobre membrana púrpura. Este es un fenómeno que debe estudiarse en profundidad porque tiene repercusiones en el cálculo de la energía disipada.

La distorsión de los armónicos es mayor en mica que en membrana simple donde es mayor que en la membrana abultada. Sin embargo cuando no se corrige la sensibilidad del fotodiodo se obtienen valores de distorsión de armónicos mayores que al aplicar las correcciones. En todo caso, se confirma el resultado de las simulaciones según el cual hay una proporcionalidad directa entre el módulo de Young de la muestra y la distorsión de los armónicos (figura 4.3b).

Tabla 4.4.2 – Fase, distorsión de armónicos y energía disipada de los puntos marcados con una flecha en la figura 4.11b.

Material	$\phi(^{\circ})$	$A_1(\text{nm})$	HD(%) ¹	$E_{\text{dis}}(\text{eV})^2$	HD _{NC} (%) ³	$E_{\text{dis,NC}}^4(\text{eV})$
mica	82	2,98	1,27	3,78	6,17	2,94
PM	78	3,04	0,75	3,11	3,03	2,87
PM (bulto)	82	3,05	0,13	3,61	0,83	3,86

¹ Dispersión de armónicos incluyendo la sensibilidad del fotodiodo al modo 2 ($p = 5$).

² La energía disipada según (4.32) ($p = 5$).

³ Dispersión de armónicos no corregida (NC) sin tener en cuenta la sensibilidad del fotodiodo y asumiendo $S_A = \chi_1 S_D$ para convertir los armónicos de mV a nm.

⁴ La energía disipada no corregida (NC) calculada mediante la ecuación (4.16) tomando el valor de Q cerca de la superficie.

La energía disipada es mayor sobre mica cuando se incluyen las correcciones, luego sobre la membrana abultada y finalmente sobre la membrana simple. Podría parecer contradictorio que siendo la fase la misma, y la HD mayor en mica que en membrana abultada, la energía disipada sea mayor en mica. La explicación está dada por el armónico A_1 , que es menor en mica que en el resto. Si el sistema utiliza un *lock-in* a la frecuencia de excitación con ancho de banda típico de 1 – 2 kHz. ¿Por qué la amplitud A_1 es menor en mica? ¿Influencia de armónicos de modos superiores que llegan hasta el primer modo? De haber considerado que la amplitud de $A_1 = 3$ nm, se habría obtenido que $E_{\text{dis}} = 2,76, 2,58$ y $3,13$ eV para mica, PM, y PM abultada, respectivamente.

En cualquier caso, la energía disipada sobre mica no es despreciable, y por tanto no es correcto modelar la interacción de la punta con la mica a partir del módulo de Young y asumiendo una interacción perfectamente elástica. Se debe considerar la adhesión y también la posible contaminación de la punta cuando se miden muestras biológicas. En este último aspecto, debe notarse que las imágenes de AFM en topografía y fase (figura 4.11) muestran que algunas partículas han sido arrastradas por la punta. Estas podrían potencialmente contaminar la punta de la palanca.

La información del canal de fase junto a la información de los armónicos pueden utilizarse para determinar la energía disipada mediante la ecuación (4.32) aunque se desconozca en detalle la naturaleza de la interacción punta-muestra.

4.4.6. Mediciones en mezcla de poliestireno y polibutadieno

Se realizaron mediciones en una mezcla de los polímeros poliestireno (PS) (Polymer Source, Canada) y polibutadieno (PB) (Polymer Source, Canada) en

medio líquido (agua milliQ). Las muestras se prepararon con el método utilizado por García *et al.* en la referencia [38]. El poliestireno estaba caracterizado por un peso molecular promedio en masa $M_w = 37,8$ kg/mol y un coeficiente de polidispersión $M_w/M_n = 1,18$; para el polibutadieno $M_w = 365$ kg/mol y $M_w/M_n = 1,12$. Se depositó en silicio limpio una gota de una mezcla 20:80 (PS:PB) en tolueno (20 mg/mL) y se hizo girar a $5000 \text{ rpm} \times 1 \text{ min}$. El resultado es una capa con dominios de PS en una matriz de PB (figura 4.13). El espesor de la capa está en el orden de los micrómetros. Las mediciones se realizaron en un AFM Multimode 8 con controlador Nanoscope V (Bruker) y los espectros de armónicos se registraron en el osciloscopio. Se utilizaron palancas triangulares SNL (corta) (Bruker). Las muestras fueron preparadas y medidas el mismo día.

La imagen de topografía de la mezcla de PS:PB (figura 4.13a) muestra que la superficie queda ondulada. No obstante a ello se pueden distinguir los dominios de PS inmersos en la matriz de PB. El canal fase provee una información sobre la composición de la muestra. Las ondulaciones que aparecían en la topografía aquí no son visibles. El contraste está relacionado con el tipo de material que aparece bajo la punta de la palanca. De hecho, aparecen dominios de PS que quedan ocultos bajo el PB en la topografía. Uno de estos dominios ocultos ha sido señalado con una flecha en la imagen de fase (figura 4.13b). Esto ocurre porque el PB es un material muy blando (E en el orden de MPa) respecto al PS que tiene un módulo de Young en el rango 1 – 4 GPa. Como los dominios de PS están embebidos en el PB las propiedades mecánicas percibidas por la sonda dependerán de las condiciones del experimento. Si se aplica una mayor fuerza se recogerá más información acerca de la estructura subsuperficial. No hay motivos para creer que los dominios de PS estén interconectados entre sí. Tratar de estimar propiedades del polímero masivo a partir de este tipo de muestra podría llevar a resultados erróneos.

La figura 4.13c muestra que los armónicos superiores del poliestireno son mayores que los del polibutadieno. En este caso también hay una correlación directa entre el módulo de Young de la muestra y la amplitud de los armónicos tal y como se predice en las simulaciones (figura 4.3b). La tabla 4.4.3 muestra una comparación los valores calculados fase, de distorsión de armónicos y energía disipada con y sin corrección de la sensibilidad del fotodiodo.

Como ocurrió con la mica y la membrana púrpura, en este caso también la amplitud de A_1 es menor en el material más rígido y la HD está sobreestimada cuando no se corrige la sensibilidad del fotodiodo al segundo modo. Es importante señalar que los valores de energía disipada son muy cercanos aún cuando los materiales tienen propiedades muy diferentes.

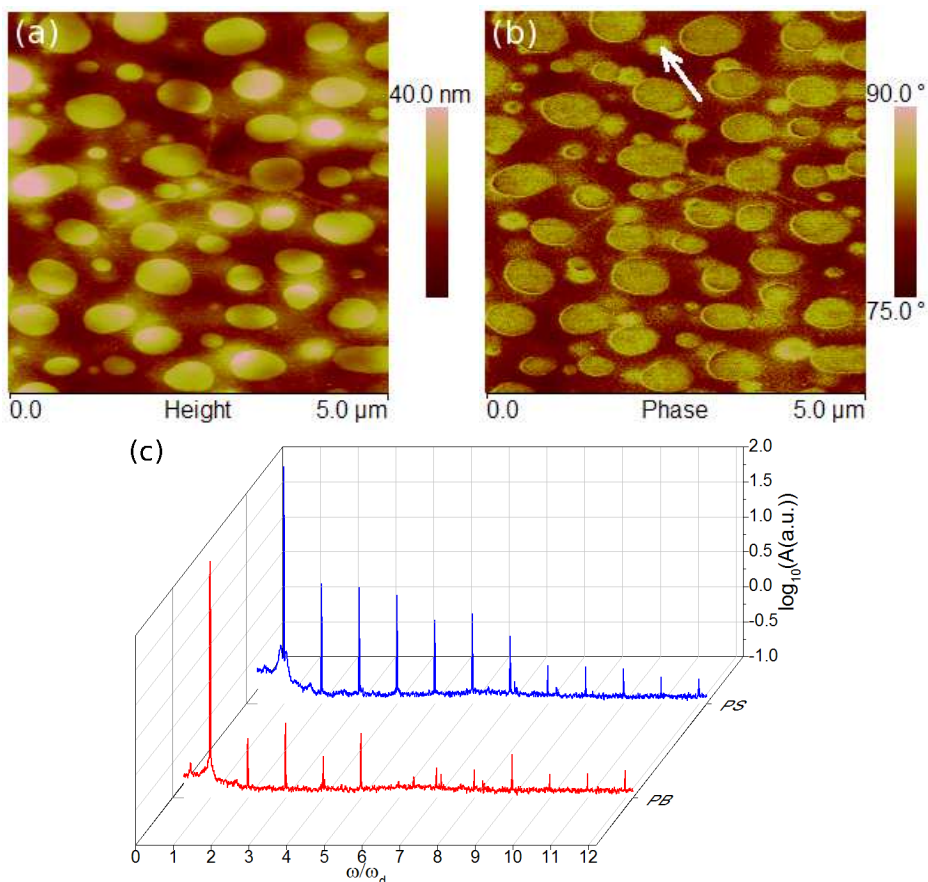


Figura 4.13 – Imágenes de topografía (a) y fase (b) de una mezcla de poliestireno (PS) y polibutadieno (PB) bajo agua. La fase es más sensible a las propiedades del material. Los dominios de PS son redondeados, y están rodeados por la matriz de PB. La flecha indica la posición de un dominio de PS que no se ve en topografía. (c) FFT de la señal del fotodiodo al oscilar la palanca sobre PS y PB. La amplitud libre es $A_0 = 12,8$ nm y la amplitud de trabajo $A_{sp} = 11$ nm. Palanca triangular SNL (corta) con constante de fuerza $k = 0,47$ N/m. AFM Multimode 8 (Bruker).

4.5. Discusión

Explicar el contraste de fase en medio líquido en experimentos de microscopía de fuerza modulada en amplitud requiere incluir en el análisis a los armónicos superiores. La expresión (4.15) permite estimar la energía disipada considerando una palanca con dos modos de oscilación teniendo en cuenta que una parte de la energía inyectada al sistema se disipa en el medio y la otra durante la interacción con la muestra.

Tabla 4.4.3 – Fase, distorsión de armónicos y energía disipada en la mezcla de PS:PB de la figura 4.13

Material	$\phi(^{\circ})$	$A_1(\text{nm})$	HD(%) ¹	$E_{\text{dis}}(\text{eV})^2$	HD _{NC} (%) ³	$E_{\text{dis,NC}}(\text{eV})^4$
PS	84	10,96	1,01	52,66	1,35	47,88
PB	80	10,97	0,07	51,28	0,13	46,38

¹ Dispersión de armónicos teniendo en cuenta la sensibilidad del fotodiodo al segundo modo (p=5).

² La energía disipada se calculó mediante la ecuación (4.32) (p=5).

³ Dispersión de armónicos no corregida (NC), sin tener en cuenta la sensibilidad del fotodiodo al segundo modo y asumiendo $S_A = \chi_1 S_D$ para convertir los armónicos de mV a nm.

⁴ La energía disipada no corregida (NC), se calculó mediante la ecuación (4.16) tomando el valor de Q cerca de la superficie.

El contraste de fase depende de la energía transferida al medio y de la fortaleza de los armónicos superiores generados [31]. Las simulaciones tomando en cuenta solo el módulo de Young y la viscosidad para describir las propiedades de la muestra (figura 4.3) indicaron que, como norma general, la distorsión de los armónicos será mayor en el material con el mayor módulo de Young. Esto fue confirmado en experimentos donde la interacción punta muestra incluye fuerzas superficiales de adhesión.

Estudios en membrana púrpura indican que se puede llegar a distinguir que la cara de la membrana está apoyada sobre mica a partir del contraste de fase cuando la superficie medida es mucho mayor que el radio de la punta. Las imágenes de alta resolución en el canal de fase permitieron distinguir los trímeros de bacteriorodopsina pero su contraste está muy influenciado por la geometría de la punta y no se puede atribuir solo a las propiedades mecánicas de la muestra.

Para cuantificar la energía disipada en medio líquido hay que conocer las propiedades mecánicas de la palanca. Algunos microscopios de fuerza comerciales tienen implementado el método del ruido térmico. En sistemas como el Multimode 8 de Bruker (antes Veeco) se puede introducir el factor de corrección de la sensibilidad del fotodiodo manualmente para calcular la constante de fuerza. En otros como el Agilent 5500 (Agilent) se selecciona la geometría de la palanca: rectangular o triangular. Resulta conveniente conocer los factores y expresiones de calibración para cada modo mostrados en la tabla (4.1.1) para poder estimar las constantes de fuerza y factores de calidad de cada modo.

Es necesario tener acceso a la señal del fotodiodo para obtener la información de los armónicos de la señal. También es una alternativa para la estimación de las constantes de fuerza y los factores de calidad. A partir de la FFT de la señal temporal se extraen los armónicos. Esta es una función que tienen incorpo-

rada muchos osciloscopios modernos como el DPO7054 (Tektronix) que además permite promediar varios espectros y así eliminar buena parte del ruido espúreo.

La estimación de la energía disipada en medio líquido requiere que se tenga en cuenta que:

- No se pueden separar analíticamente las contribuciones de los modos a la amplitud de los armónicos, pero sí se puede considerar que la amplitud de los armónicos cercanos al modo 2 se debe fundamentalmente a este modo [68].
- Lo común es medir fuera de resonancia. Esto es válido incluso cuando la excitación de la palanca es magnética. La resonancia y el factor de calidad disminuyen cuando la palanca se acerca a la superficie (tabla 4.4.1).

La ecuación (4.32) incluye las correcciones para estimar la energía disipada en medio líquido.

Los experimentos en membrana púrpura depositada sobre mica indican que hay una fuerte adhesión entre la punta y la muestra. Por este motivo la energía disipada en mica puede incluso llegar a ser mayor que sobre la membrana púrpura. La adhesión sobre membrana púrpura es muy pequeña, así que la disipación se debe en este caso a las propiedades de la muestra. Resulta interesante que las zonas donde la membrana está doble, o donde aparecen los abultamientos, las propiedades de la membrana son completamente diferentes. Esto en primer lugar resalta la influencia del sustrato cuando se observa una sola capa de membrana púrpura. En segundo lugar es un claro ejemplo de cómo dos muestras de propiedades completamente distintas pueden tener la misma diferencia de fase en medio líquido (4.11).

La distorsión de armónicos sobre la mica fue mayor que sobre la membrana púrpura en cualquiera de sus formas. También fue mayor sobre el poliestireno que sobre el polibutadieno en la muestra de mezcla de polímeros. Esto confirma que como norma general los armónicos son mayores sobre el material más rígido. Sin embargo parece haber una excepción y es la amplitud del armónico fundamental A_1 . El armónico A_1 es menor en mica y en poliestireno que en membrana púrpura y polibutadieno, respectivamente, cuando debería ser el mismo si se tiene en cuenta que el AFM usa sólo este armónico para fijar la amplitud durante la retroalimentación. Comprender la causa de este fenómeno ha quedado pendiente.

4.6. Conclusiones

Se ha partido de un modelo basado en la conservación de la energía de una palanca con dos modos de oscilación para cuantificar la energía disipada en medio líquido. Se incluyeron factores experimentales que permiten obtener un valor de energía disipada más preciso: separación de los armónicos por modo, medición fuera de resonancia y variación de los factores de calidad y constantes de fuerza de los modos cuando la palanca se acerca a la superficie

La fase y la amplitud de los armónicos son observables que se pueden adquirir durante los experimentos. Utilizando la ecuación (4.32) se puede determinar la energía disipada en medio líquido y, a partir de esta, se puede cuantificar la interacción punta-muestra si se conoce el modelo más apropiado para describirla.

Parte II

Caracterización de la elasticidad de células mediante microscopía de fuerza

Capítulo 5

Caracterización de las propiedades elásticas de células cancerosas y no-malignas

El citoesqueleto, una estructura dinámica y menos rígida que lo que su nombre implica, se extiende por el citoplasma de las células eucariotas proveyendo un andamiaje tridimensional que soporta, da forma y determina su organización interna. Además de su función estructural, el citoesqueleto está relacionado con el movimiento celular, entendido como el movimiento de toda célula pero también como el transporte interno de organelos y otras estructuras inmersas en el citosol. El citoesqueleto está formado por tres tipos de estructuras: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, imbricados entre sí, con los organelos y con un gran número de proteínas de soporte [91]. La figura 5.1a muestra una imagen de inmunofluorescencia de un grupo de células a las que se han teñido el núcleo (azul), los filamentos de actina (verde) y los microtúbulos (rojo). Se puede apreciar cómo existe una mayor concentración de filamentos de actina cerca de la periferia de las células mientras los microtúbulos tienen mayor concentración en la zona cercana al núcleo.

La actina (figura 5.1b) es la proteína más abundante en la mayoría de las células. Cuando polimeriza forma filamentos de actina, unas fibras de 7 nm de diámetro que llegan a alcanzar varios micrómetros de largo. Los filamentos pueden formar redes o fibras de tensión que juegan papeles diferentes. Las fibras de tensión están unidas en arreglos paralelos y apretados mientras que en las redes tridimensionales las fibras quedan más sueltas, con propiedades de gel semisólido.

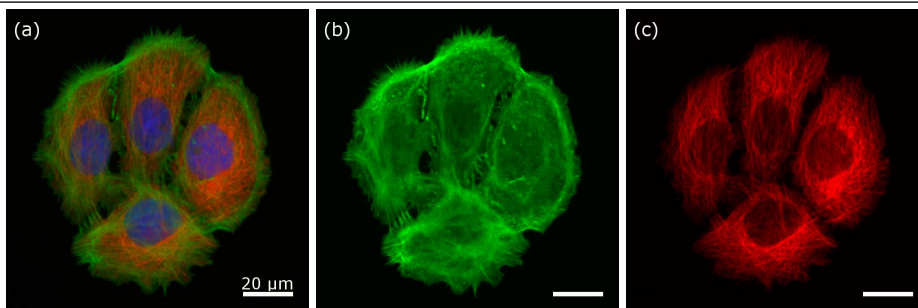


Figura 5.1 – (a) Microscopía de fluorescencia de células HT-1376 donde se aprecian el núcleo (color azul), los filamentos de actina (verde) y los microtúbulos (rojo). (b) Solo citoesqueleto de actina. (c) Solo los microtúbulos. (Las imágenes son cortesía del grupo de Malgorzata Lekka, Cracovia, Polonia).

do. La red tridimensional bajo la membrana determina la forma de la célula. Las fibras de tensión, por su parte, forman anclajes intercelulares y entre la célula y el sustrato [91].

Los microtúbulos (figura 5.1.c) están formados por la polimerización reversible de la tubulina. En la mayor parte de las células los microtúbulos se extienden desde el centrosoma, localizado cerca del centro de la célula. Durante la mitosis, el centrosoma se reorganiza para formar el huso mitótico que es responsable de la separación de los cromosomas. Los microtúbulos tienen también un papel relevante en el transporte de vesículas y organelos, en la formación de cilios y flagelos y en la forma y polaridad de algunos tipos de células [91].

Finalmente, los filamentos intermedios son polímeros de más de 50 proteínas; no están implicados en el movimiento celular pero proveen soporte mecánico a células y tejidos. El más conocido de estos filamentos es la queratina, que permite a la piel soportar las cargas mecánicas a las que está sometida. En la mayor parte de las células la red de filamentos intermedios se extienden hacia el citoplasma desde un anillo situado alrededor del núcleo [91].

Por otra parte, la microscopía de fuerza (AFM) permite obtener imágenes de células con resolución sub-micrométrica. La resolución de la microscopía de fuerza se puede combinar con la medición de varias propiedades mecánicas de las células [92, 93, 21, 94, 95, 96, 97]. Al apretar la punta de la palanca de AFM sobre la membrana celular, se puede acceder a la estructura que subyace en el citoesqueleto [98, 99, 100, 101]. Estas mediciones permiten la caracterización de propiedades locales, como es el módulo de elasticidad (o de Young) lo cual tiene un gran potencial para la aplicación de la microscopía de fuerza a la biología celular.

Los estudios de la mecánica celular por AFM demuestran que se pueden correlacionar la elasticidad de las células y el cáncer [19, 22]. Las primeras mediciones en células de vejiga, de origen epitelial, mostraron que las células cancerosas son más blandas que las no-malignas. Investigaciones posteriores de células cancerosas ratificaron esta idea [102, 103, 104, 105, 106, 107, 108]. El cambio está probablemente asociado con mejorar la capacidad de migración y la capacidad de adaptación de las células durante el desarrollo del cáncer. Los resultados aplican para otros tipos de células [102, 104, 109] y secciones de tejidos colectados en pacientes humanos [22, 108]. Ejemplo de esto último es un estudio realizado en tejido de mamas, en el cual el histograma de módulos de Young de las células de los tejidos normales y no-malignas muestra un ancho rango de valores, mientras en las células de los tejidos malignos está caracterizado por un pico más estrecho y con menor valor de elasticidad [108].

El hecho constatado experimentalmente de que las células cancerosas son más blandas entra en contradicción con la idea arraigada entre el público general de que el cáncer aparece como pequeños bultos duros. Una explicación razonable es que los procesos de neoplasia conllevan una reestructuración del ambiente extracelular [110, 20, 111]. Estos cambios suelen ir acompañados de un aumento de la rigidez del tumor y es lo que pueden detectar los médicos por palpación. No obstante a ello las poblaciones de células y tejidos estudiadas hasta la fecha por AFM es limitada, y sería apresurado emitir un veredicto general acerca del comportamiento de las células malignas respecto a las no-malignas.

Los estudios por AFM suelen combinarse con el uso de drogas que modifican la respuesta mecánica de las células [112, 113]. Esto permite monitorear la influencia de un tipo de estructura en la respuesta celular. Por ejemplo, Rotsch y Radmacher han reportado una disminución del módulo de Young de fibroblastos tratados con diferentes tipos de citocalasinas que afectan a los filamentos de actina [98]. Se han encontrado similares resultados en otros tipos de células como linfocitos y células Jurkat [100]. El papel de los microtúbulos en la elasticidad celular continúa siendo una pregunta abierta. Pelling *et al.* realizaron estudios de fluorescencia y AFM para determinar la influencia de los microtúbulos en células tratadas con nocodazol [99]. Sus resultados muestran que la rigidez depende de la dinámica de la interacción de diferentes tipos de microtúbulos y filamentos intermedios. Otros estudios reportan sin embargo que al desensamblar los microtúbulos de fibroblastos mediante colchicina y colcemida no se registra una disminución significativa de la rigidez celular [98].

En este capítulo se estudian las propiedades elásticas del citoesqueleto de actina de 4 líneas celulares de origen epitelial. Una de las líneas es no-maligna y

el resto son células de cáncer con diferente grado de malignidad. La microscopía de fluorescencia se combina con imágenes de AFM para recoger información del citoesqueleto de actina y de la estructura del citoesqueleto bajo la membrana, respectivamente. Además, las propiedades elásticas se determinan mediante microscopía de fuerza en el modo de espectroscopía de fuerza sobre células vivas. La influencia del citoesqueleto de actina en la elasticidad se evalúa tratando las células con citocalasina D (Cyt-D), una droga que inhibe la polimerización de los filamentos de actina pero no actúa sobre los filamentos intermedios ni los microtúbulos.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Montaje experimental

Los experimentos se realizaron en un AFM modelo XE-120 (Park Systems, Corea del Sur). Este sistema tiene integrado un microscopio óptico invertido con capacidad para realizar microscopía de fluorescencia de tipo Olympus IX71 (Olympus, Japón). Esto permite que en el mismo equipo se puedan realizar microscopía de fuerza y de fluorescencia sobre la misma muestra. La figura 5.2a muestra un esquema del montaje experimental. Adicionalmente el uso de un microscopio invertido permite controlar la posición de la punta sobre las células en todo momento durante los experimentos de espectroscopía de fuerza (figura 5.2b).

5.1.2. Líneas celulares

Se estudiaron 4 líneas celulares de origen epitelial:

1. Células epiteliales no-malignas de la uretra tipo HCV29 (Instituto de Terapia Experimental, Wroclaw, Polonia) que se utilizan además como referencia y control.
2. Células cancerosas de grado 2 de la vejiga urinaria tipo HTB-9 (LGC Standards).
3. Células cancerosas de grado 3 de la vejiga urinaria tipo HT-1376 (LGC Standards).
4. Células cancerosas transicionales de grados 3 y 4 de la vejiga urinaria tipo T24 (LGC Standards).

Las células HCV29 y las T24 fueron crecidas en medio RPMI-1640 (RPMI, Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma). Las células

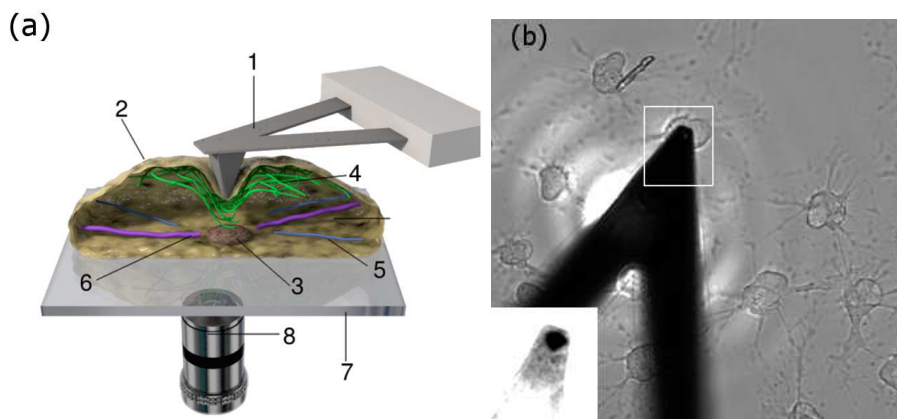


Figura 5.2 – (a) Esquema del montaje experimental para realizar mediciones de AFM y microscopía de fluorescencia en la misma célula. 1. Palanca de AFM con baja constante de fuerza. 2. Membrana celular. 3. Núcleo celular. 4. Filamentos de actina. 5. Filamentos intermedios. 6. Microtúbulos. 7. Cubreobjeto donde se han crecido las células. 8. Objetivo de microscopio óptico invertido. (b) Imagen de microscopio óptico invertido de la palanca posicionada encima de una célula tratada con citocalasina D. Sin filamentos de actina polimerizados, el citoplasma celular colapsa y crea una masa redondeada alrededor del núcleo. El recuadro muestra la punta en el extremo de la palanca.

HTB-9 fueron crecidas en RPMI suplementado con 10 % FBS, 1 % HEPES (ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic, Sigma) y 1 % de piruvato de sodio (Sigma). Por último, las células HT-1376 fueron crecidas en medio Eagle's (EMEM, LGC Standards) suplementado con 10 % FBS (LGC Standards). Las células se cultivaron en cubreobjetos colocados en placas Petri a 37°C en una atmósfera de 95 % aire/ 5 % CO₂ y humedad relativa superior al 98 %. Las células fueron medidas a los 3 ó 4 días de ser sembradas.

Las células tratadas con Citocalasina D (Cyt-D, Sigma) fueron lavadas con RPMI y sumergidas en una solución de 5 μ M Cyt-D en RPMI durante 1 h a 37°C.

5.1.3. Microscopía de fluorescencia

Las células fueron lavadas con RPMI suplementado con 10 mM HEPES. Luego se fijó su estructura adicionando Paraformaldehído al 3,7 % en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma) durante 10 min y se permeabilizó la membrana celular con Tritón X-100 (Sigma) al 0,2 % en PBS durante 5 min. Finalmente las células se lavaron con PBS y quedaron listas para el proceso de tinción.

En condiciones de oscuridad, los filamentos de actina se tiñeron con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) disuelto 1:200 en PBS durante 30 min. Se lavó la muestra

con PBS y acto seguido se tiñó el núcleo celular con Hoechst (Invitrogen) 1:5 en PBS durante 15 min. Los cubreobjetos se lavaron nuevamente con PBS y se almacenaron a 4°C durante 24 – 48 h antes de ser medidos.

El microscopio invertido está dotado con una lámpara de mercurio de 100 W que ilumina la muestra de manera uniforme; filtros U-MWIB2 para observar los filamentos de actina teñidos con Alexa Fluor 488 y U-MWIG2 para el núcleo celular teñido con Hoechst. La imagen se recoge en una cámara digital XC10 que produce imágenes de 1376×1032 pixel (1,4 MP) en formato óptico 2/3" utilizando el programa CellSens Dimension (Olympus). Las imágenes de fluorescencia fueron postprocesadas con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.1.4. Microscopía de fuerza de las células

El AFM está equipado con una celda de líquidos que descansa sobre un piezo desacoplado en las direcciones X e Y y *closed loop* con rango de $100 \mu\text{m}^2$. El escáner vertical tiene un rango de $10 \mu\text{m}$. Las mediciones se realizaron con palancas triangulares tipo MLCT-C (Bruker, USA) caracterizadas por una constante de fuerza nominal $k = 0,01 \text{ N/m}$, punta de $3 - 4 \mu\text{m}$ de altura, semiángulo de apertura de $\theta = 20^\circ$ y radio $R = 20 \text{ nm}$.

Se realizaron dos tipos de mediciones:

1. *Topografía de las células a las que se les había realizado microscopía de fluorescencia.* Estas células estaban fijadas con paraformaldehído lo cual es una ventaja para medir por AFM. El tratamiento con Tritón X-100 abre poros en la membrana celular para permitir la entrada de las moléculas que marcan las estructuras internas de la célula en los ensayos de fluorescencia, pero no daña la estructura del citoesqueleto, visible bajo la punta de la palanca.
2. *Espectroscopía de fuerza en células vivas.* En este caso se utilizó el microscopio óptico invertido para controlar la posición de la punta respecto a la célula como aparece en la figura 5.2b.

5.1.4.1. Topografía de las células medidas por fluorescencia

Las imágenes de AFM se tomaron en modo contacto aplicando una fuerza de 100 pN, a velocidad de barrido entre 0,5 y 1 Hz y un tamaño de línea entre 20 y $50 \mu\text{m}$. Las imágenes fueron procesadas con el programa Gwyddion (<http://gwyddion.net>). Las imágenes se tomaron bajo PBS.

Se recogieron los canales de topografía y señal de error en modo contacto. La topografía aporta información sobre la altura total de la célula, un dato que no puede ser recogido por las imágenes bidimensionales de fluorescencia. Sin embargo, para el estudio del citoesqueleto resultan más útiles las imágenes de señal de error porque permiten distinguir los elementos del citoesqueleto que no se aprecian en la imagen de topografía. La señal de error es la diferencia entre la deflexión deseada (fijada en el programa) y la deflexión real medida en el fotodiodo. Como en la práctica hay cierto retardo entre la velocidad a la que responde el sistema y la velocidad a la que se barre la superficie, el “error” aporta información sobre las fibras del citoesqueleto.

5.1.4.2. Espectroscopía de fuerzas de células vivas

Antes de medir, se calibró la sensibilidad a la deflexión de la palanca utilizando el valor de la constante de fuerza $k = 0,01$ N/m indicado por el fabricante.

Las curvas de fuerza contra distancia se adquirieron en una región de $25 \mu\text{m}^2$ (matriz de 8×8 puntos equiespaciados) ubicada sobre el núcleo de la célula. La fuerza máxima aplicada se limitó a 1 nN. Todas las curvas se realizaron con una velocidad de acercamiento/alejamiento de $5 \mu\text{m/s}$. El módulo de elasticidad (módulo de Young) se determinó ajustando las curvas de fuerza al indentar la célula (acercamiento) al modelo de Sneddon [114, 115]. Dicho modelo, para una punta cónica, propone la siguiente relación entre la fuerza aplicada, la indentación y el módulo de Young efectivo E^* :

$$F = \frac{2 \tan \theta}{\pi} E^* \delta^2 \approx \frac{2 \tan \theta}{\pi} \frac{E_{\text{cell}}}{1 - \nu^2} \delta^2 \quad (5.1)$$

donde F es la fuerza aplicada, θ es el semiángulo de apertura de la punta, $\nu = 0,5$ es el coeficiente de Poisson y δ es la profundidad de indentación (o indentación, simplemente). El radio de la punta no interviene en la ecuación pues se asume que es infinitamente afilada. También se asume una forma perfectamente cónica cuando en realidad tiene cuatro lados asimétricos.

Algunos autores han buscado expresiones más precisas que tienen en cuenta la geometría de la punta [94]. Sin embargo, utilizar la aproximación de la ecuación (5.1) se justifica porque lo que interesa es el valor relativo de una línea de células respecto al resto. Esto se garantiza utilizando siempre palancas del mismo tipo e incluso del mismo lote, calibradas antes de realizar los experimentos que se hacen bajo las mismas condiciones.

La indentación δ se determina a partir del desplazamiento del piezo z_p , del punto de contacto z_0 y la deflexión asumiendo una superficie rígida F/k :

$$\delta = z_p - z_0 - \frac{F}{k} \quad (5.2)$$

Se analizaron de 10 a 16 células de cada línea celular. Consecuentemente, los valores de módulo de Young reportados provienen del procesamiento de alrededor de 700 curvas¹. Para comprobar si las diferencias en los módulos de Young medidos eran o no significativas se realizó una prueba de Tukey-Kramer [116] con $p = 0,05$ en el programa Origin 8.5 (OriginLab, USA).

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente bajo RPMI suplementado con 10 mM HEPES excepto cuando se midieron células tratadas con citocalasina. En ese caso se midió bajo 5 μ M Cyt-D en RPMI.

5.2. Resultados

5.2.1. Morfología de las células

La figura 5.3a-d muestra las imágenes de fluorescencia de las células estudiadas. Los núcleos celulares aparecen teñidos en azul. El color verde corresponde a los filamentos de actina. Es importante señalar que la técnica mide solo actina polimerizada. Esto quiere decir que incluso aunque no se distingan fibras de tensión, la presencia de color delata la presencia de la actina que forma redes debajo de la membrana. El espaciamiento entre los filamentos de la actina en forma de redes es menor que la resolución de la fluorescencia.

La distribución de actina es diferente en cada línea celular. El citoesqueleto más desarrollado es el de las células no-malignas HCV29 donde se pueden apreciar varias fibras de tensión en toda la superficie celular. Luego se observan fibras de tensión también en las células transicionales T24 de grados 3 y 4. Las células de grado 2 HTB-9 muestran una distribución homogénea con algunos puntos brillantes que resaltan e indican una mayor concentración de actina y finalmente el color en las células tipo HT-1376 (grado 3) es muy homogéneo a lo largo de la superficie.

Al terminar las mediciones de fluorescencia, se realizaron estudios por AFM de las células marcadas con una flecha. Como se puede apreciar en las imágenes AFM de la señal de error de la figura 5.3e-h hay coincidencia entre la información

¹ Algunas curvas que no seguían un comportamiento adecuado tuvieron que ser descartadas. Las causas más frecuentes eran que la señal cayera fuera del rango del fotodiodo o que fueran demasiado irregulares en la aproximación. Esto último con certeza ocurre cuando el núcleo de la célula resbala al realizar la curva de fuerza (se puede observar en el microscopio óptico) y también podría ocurrir por otras causas menos claras que continúan siendo una pregunta abierta, como si en esos casos se rompe o no el citoesqueleto al indentar.

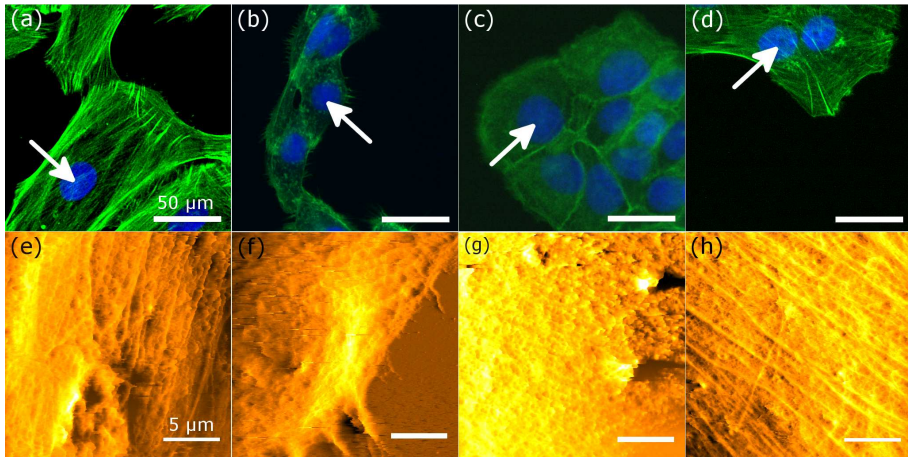


Figura 5.3 – Mediciones de fluorescencia (arriba) y AFM (debajo) en la misma célula en la zona indicada con flechas en la imagen de fluorescencia. Las células son (a) y (e) HCV29, no-malignas; (b) y (f) HTB-9, grado 2; (c) y (g) HT-1376, grado 3; (d) y (h) T24, grados 3 y 4. En las imágenes de fluorescencia el núcleo está teñido en azul, y el citoesqueleto de actina en verde. Las imágenes de AFM son la señal de error en modo contacto.

que aporta el AFM y la fluorescencia. Aparecen fibras de tensión en las células HCV29 y T24 y es posible que la estructura que se observa en la imagen del HCV29 sea el nucleolo. La coincidencia entre ambas técnicas es notable por cuanto el AFM tiene acceso a la información superficial, mientras la fluorescencia capta información de toda la célula. De hecho, el AFM recibe la información de la parte superior de la célula mientras lo más accesible al microscopio invertido es la información de la zona inferior de la célula².

La figura 5.4 muestra la proyección tridimensional del canal de topografía de la célula HCV29 marcada en la figura 5.3a. Las mediciones de la topografía de las células indicaron que las HCV29, las HT-1376 y las T24 tienen una altura aparente de unos 3 – 4 μm pero la altura de las HTB-9 fue superior a 4 μm . Es importante señalar que la altura aparente de las células coincide con la altura de la punta de la palanca utilizada. Esto es un problema al medir por AFM porque pueden colisionar la superficie de la célula y los brazos de la palanca. Por este motivo las zonas más propicias para medir son la zona superior del núcleo y la zona del citoplasma alejada del mismo porque son relativamente planas. Realizar experimentos en la zona sobre el núcleo permite indentar más sin tener la influencia del sustrato de vidrio. Adicionalmente, se garantiza que los experimentos se realicen en la misma zona de las células.

²Aunque desde luego, esto dependerá del plano que se enfoque con el microscopio óptico.

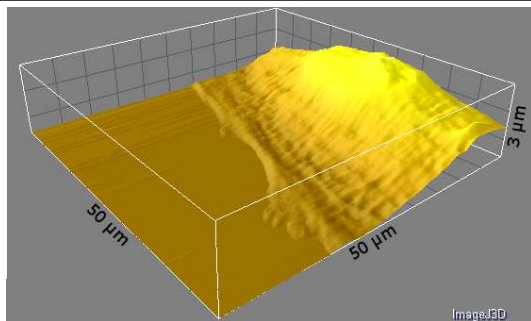


Figura 5.4 – Proyección tridimensional de la imagen de topografía mostrada en la figura 5.3a.

5.2.2. Espectroscopía de fuerza para el estudio de propiedades elásticas

5.2.2.1. Determinación del módulo de Young de las células

Las propiedades elásticas se determinaron mediante el modelo de Sneddon para una punta cónica. En la sección anterior se discutieron las razones por las cuales conviene realizar los experimentos de espectroscopía en la zona ubicada sobre el núcleo celular.

Una vez obtenidas las curvas de fuerza contra movimiento del piezo, se convierten en curvas de fuerza contra indentación mediante la ecuación (5.2) y se ajustan a la ecuación (5.1). Como el módulo de Young de la palanca es de 160 GPa (7 órdenes de magnitud mayor que el de la muestra) se puede asumir que $E^* \approx E_{\text{cell}}/(1 - \nu_{\text{cell}}^2)$ y del ajuste se puede inferir el módulo de Young de la célula.

La figura 5.5a muestra una curva de fuerza contra movimiento del piezo típica tomada sobre una célula HT-1376. La figura 5.5b muestra la misma curva de fuerza, pero esta vez en función de la indentación. La zona amarilla indica la porción de la curva que se utilizó para realizar el ajuste (en este caso 300 nm) representado por la línea continua roja. Despejando la elasticidad (E) de la ecuación (5.1) obtenemos que el módulo de Young fue de 6,05 kPa. Se puede apreciar que el ajuste es bueno para la zona hasta 300 nm, pero luego hay algunas desviaciones respecto al resto de la curva. De hecho, se debe buscar el mejor ajuste para cada profundidad de indentación. El punto de contacto ($\delta = 0$) es una fuente de error y su determinación depende del criterio de quien procese las curvas. Sin embargo los resultados del procesamiento de los datos por otra persona y curvas de fuerza sobre las mismas células realizadas por otra persona fueron los mismos.

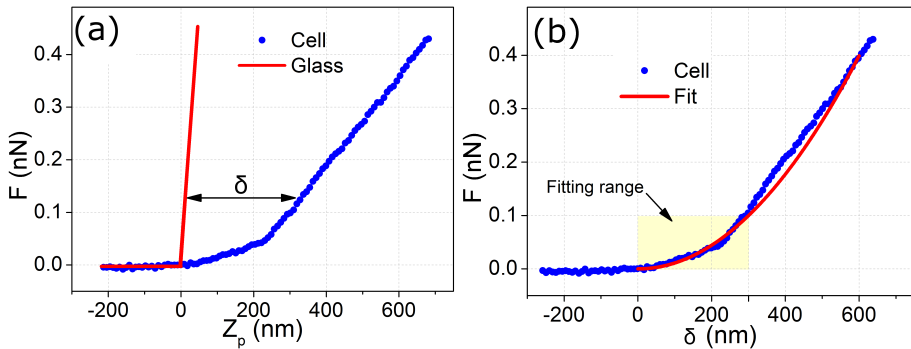


Figura 5.5 – Procesamiento de las curvas de fuerza para obtener el módulo de Young. (a) Curva fuerza frente al desplazamiento del piezo (puntos azules) de una célula HT-1376. El cero de la curva en el eje de abscisas se ha trasladado al punto de contacto. La línea sólida roja representa la curva en una superficie dura (calibración en vidrio). La indentación (δ) es la diferencia horizontal entre las curvas de calibración y experimental. (b) Curva de fuerza contra indentación (puntos azules). La curva se ajustó a la ecuación de Sneddon (línea continua roja) en el rango 0 – 300 nm.

El procedimiento descrito se aplicó a las curvas de fuerza realizadas sobre poblaciones de células de las cuatro líneas estudiadas. En total se procesaron más de 10 células de cada tipo siendo el número total de curvas procesadas $N > 600$ en cada caso.

La figura 5.6 muestra los histogramas de distribución de módulo de Young de las líneas celulares estudiadas para profundidades de indentación $\delta = 500$ nm. Más que una distribución normal, los histogramas se pueden ajustar a dos distribuciones gaussianas. Para las células HCV29 no-malignas la distribución es más ancha y heterogénea que para el resto de las células cancerosas. Estas tienen en común que los picos caen casi exactamente en los mismos valores: uno muy afilado a 2 kPa y otro más ancho a 4 kPa. Las distribuciones de HTB-9 y T24 son prácticamente iguales mientras el pico a 2 kPa de las HT-1376 es muy pequeño. De hecho a 300 nm de indentación no se distingue. Estos comportamientos están en concordancia con resultados previos que indicaban la presencia de un pico afilado a menos módulo de Young en células cancerosas [101].

5.2.2.2. Dependencia del módulo de Young con la profundidad de indentación

El uso de curvas de fuerza para determinar las propiedades elásticas de las células abre interrogantes sobre cuál es la mejor estrategia a seguir. En este trabajo se decidió medir el módulo de elasticidad para una misma profundidad

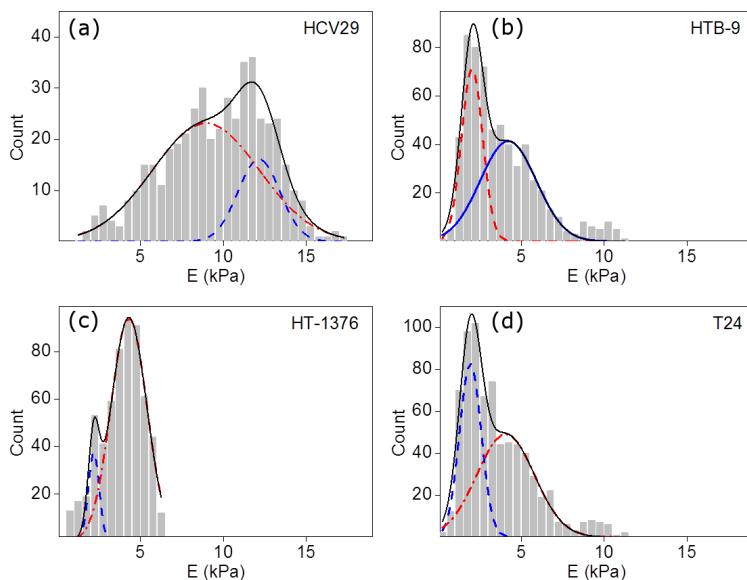


Figura 5.6 – Distribución de los módulos de Young para 500 nm de indentación. Los histogramas se ajustaron a dos distribuciones normales. Los picos de elasticidad son más anchos para las células HCV29 (no-malignas) que para las cancerosas (HTB-9, HT-1376 y T24). Estas presentan un pico afilado alrededor de 2 kPa y otro más ancho alrededor de 4 kPa. Para las células HT-1376 (grado 3) el pico afilado es muy pequeño comparado con el de las HTB-9 (grado 2) y las T24 (grados 3 y 4). El ancho de las barras del histograma es 500 Pa.

de indentación y analizar todas las curvas de fuerza sin importar a qué célula pertenece. También se decidió tomar como referencia del comportamiento de las células el valor medio de toda la distribución, aunque en la sección anterior se haya visto que en general se aprecian al menos dos picos de elasticidad para cada línea celular.

Si las curvas de fuerza se analizan como una única distribución se puede apreciar que el módulo de Young calculado (E) disminuye con la profundidad de indentación (figura 5.7). Esta disminución de E con la indentación ha sido reportado anteriormente, aunque su explicación definitiva aun no ha sido aclarada [100, 101, 22]. El otro elemento importante de la figura es la marcada diferencia entre las células HCV29 no-malignas y las células de cáncer, que tienen valores similares de elasticidad para una misma indentación.

Por otra parte, la similitud en la elasticidad de las células cancerosas generó incertidumbre acerca de los límites de detección del instrumento con este tipo de palancas. Por este motivo y para estudiar la influencia del citoesqueleto de actina sobre la elasticidad celular se realizaron experimentos con citocalasina D.

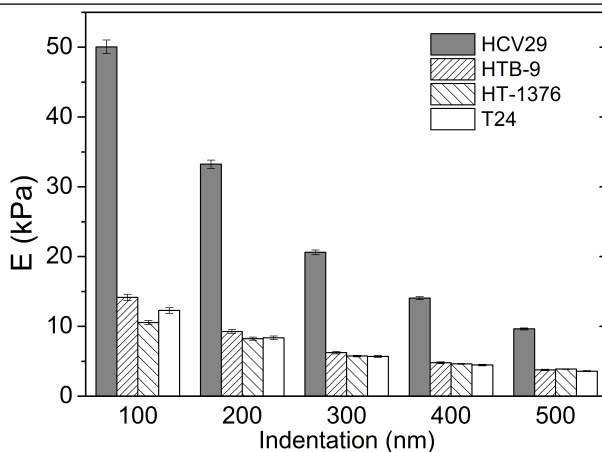


Figura 5.7 – Comportamiento de la elasticidad celular (E) frente a la profundidad de indentación. Las células HCV29 son no-malignas. Las células HTB-9, HT-1376 y T24 son cancerosas. Los datos han sido representados como media \pm SE de la media.

5.2.2.3. Elasticidad de células tratadas con citocalasina D

La citocalasina D (Cyt-D) es una droga que inhibe la polimerización de los filamentos de actina por lo cual la célula adquiere la configuración redondeada mostrada en la figura 5.2*b*. Se puede apreciar además cómo la célula queda anclada en la superficie: de los centros colapsados salen estructuras alargadas que marcan el área originalmente ocupada por la célula.

La pérdida del citoesqueleto de actina conlleva a una disminución del módulo de elasticidad de la célula [98]. La droga no actúa sobre otros elementos del citoesqueleto y además su efecto es reversible: si la Cyt-D se elimina del medio las células recuperan su forma original. Para que la elasticidad de las células tratadas fuera constante, se midieron también en un medio de Cyt-D.

Dos líneas celulares (HCV29, no-maligna y HTB-9, grado 2) fueron tratadas con citocalasina D para analizar la influencia de esta droga en la estructura y en la elasticidad de la célula. Las células HCV29 son las más rígidas de las estudiadas. Como representante de las células malignas se tomó a las HTB-9 porque tienen el menor grado de malignidad. La figura 5.8 muestra una comparación de lo que ocurre con el módulo de Young de las células al ser tratadas con citocalasina. El módulo de elasticidad cae a valores similares en todas las profundidades de indentación estudiadas. En este caso también se observa la tendencia a la disminución del módulo de Young aparente con la profundidad de indentación.

La diferencia de rigidez entre células no-malignas y cancerosas desaparece con el tratamiento. Esto realza la importancia del citoesqueleto de actina en la

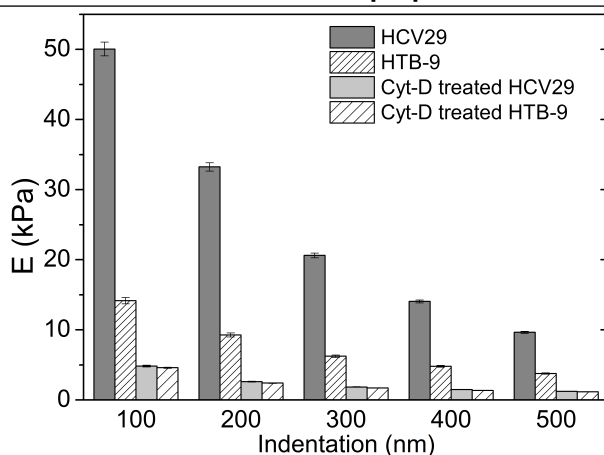


Figura 5.8 – Comparación de elasticidad de las células al tratarlas con citocalasina D. Las células HCV29 son no-malignas. Las células HTB-9, son cancerosas de grado 2. Los datos han sido representados como media \pm SE de la media.

elasticidad celular. La citocalasina D no afecta directamente a otras estructuras del citoesqueleto, pero es de suponer que el colapso del andamiaje de los filamentos de actina implique también un cambio en la estructura de los microtúbulos (figura 5.1c) y los filamentos intermedios.

En los análisis realizados hasta el momento se han considerado todas las curvas de fuerza sin importar la célula de la que provienen. La figura 5.9 muestra en diagramas de cajas los resultados de lo que ocurre con las células HCV29 no-tratadas y tratadas con citocalasina para una profundidad de indentación de 300 nm. El diagrama de cajas nos permite tener una idea clara de cómo se comportaron los módulos de Young calculados en cada célula. El punto dentro de las cajas es el valor medio, y la línea la mediana. Los límites de las cajas están en los percentiles 25 y 75, y los bigotes representan los percentiles 5 y 95. Se midieron 15 células no-tratadas y 11 tratadas. Medir ese número de células requiere un tiempo de 3 – 4 h. Aunque no se controlaron la temperatura ni la concentración de CO_2 se puede apreciar que las mediciones fueron estables al transcurrir el tiempo. El coeficiente de correlación estimado para el módulo de Young y el número de célula (y por ende, el tiempo) fue cero en ambos casos, lo cual indica que no existe correlación lineal entre ambos factores.

5.2.2.4. Análisis de varianza de las distribuciones

El análisis cualitativo de las figura 5.7 y 5.8 indica que el módulo de Young de las células no-malignas es mayor que el de las células malignas y este a su vez

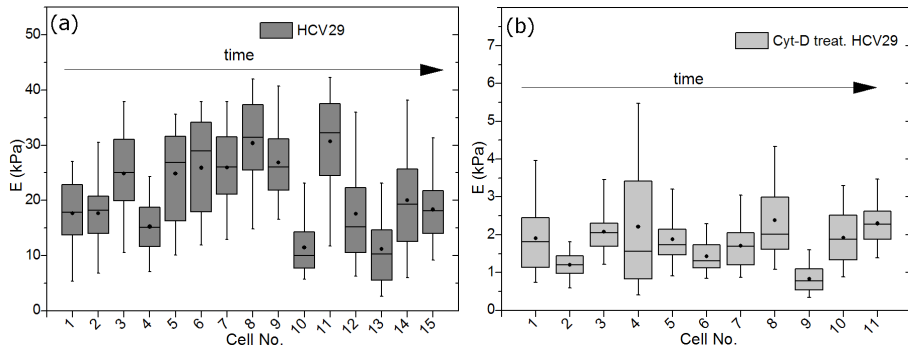


Figura 5.9 – Distribución de elasticidades de cada célula HCV29 no-tratada (a) y tratada con citocalasina D (b). La media es el punto central dentro de las cajas y la línea es la mediana (percentil 50). La caja cubre los percentiles 25 y 75 y finalmente los bigotes de las cajas indican los percentiles 5 y 95. El tiempo de medición de (a) y (b) fue aproximadamente 4 h. Módulo de Young estimado a 300 nm de indentación.

es mayor que el de las células tratadas con citocalasina. Por otra parte se tiene que las distribuciones de módulos de Young totales (figura 5.6) y por célula (figura 5.9) tienen grandes desviaciones estándar. Para cuantificar si las diferencias entre las distribuciones son significativas se realizó un análisis de varianza de Tukey-Kramer con $p = 0,05$. Los resultados se encuentran representados en la tabla 5.2.1.

Tabla 5.2.1 – Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer de los resultados mostrados en las figuras 5.7 y 5.8 con nivel de significación $p = 0,05$ para todas las profundidades de indentación.

	HTB-9	HT-1376	T-24	HCV-29 Cyt-D	HTB-9 Cyt-D
HCV-29	***	***	***	***	***
HTB-9		ns	ns ¹	***	***
HT-1376			ns ¹	***	***
T-24				***	***
HCV-29 + Cyt-D					ns

*** $p < 0,001$; ns: no existe diferencia significativa entre las muestras. HCV29: no-maligna; HTB-9: grado 2; HT-1376: grado 3; T-24: grados 3 y 4.

¹ Hay dos excepciones: las HTB-9 son distintas ($p < 0,001$) de las T24 a 100 nm y las HT-1376 son distintas de las T24 a 500 nm ($p < 0,05$).

La prueba de Tukey-Kramer permite afirmar con criterio cuantitativo que las células no-malignas son más rígidas que el resto. También se puede afirmar con alto grado de certeza que no existen diferencias significativas entre las tres líneas de células tumorales estudiadas, independientemente de su grado de malignidad.

Por otra parte las células tratadas con citocalasina a las concentraciones utilizadas no muestran diferencia en su elasticidad. Esto resalta la importancia del citoesqueleto de actina dentro del andamiaje que da soporte a la célula.

5.3. Discusión

El citoesqueleto es una estructura compleja que interviene activamente en el funcionamiento celular. La maquinaria de las células cancerosas cambia su funcionamiento acomodándolo a sus requerimientos metabólicos: crecimiento, movilidad e invasividad [117, 118]. En este trabajo se focalizó el estudio en el citoesqueleto de actina de células tumorales con diferente grado de malignidad. Como referencia se tomó una línea celular no-maligna de origen similar y como control se utilizó la citocalasina D, una droga que inhibe la formación del citoesqueleto de actina.

La integración de las microscopías de fuerza y fluorescencia permite obtener mayor información sobre las propiedades morfológicas de las células. La microscopía de fuerza permite dar volumen a la bidimensionalidad de la fluorescencia y, adicionalmente, aumenta la resolución. La señal de "error" provee información sobre la estructura bajo la membrana celular en células fijadas. Como era de esperar, existe una gran similitud entre la información de ambas técnicas. El citoesqueleto de las células no-malignas aparece más desarrollado que el resto. Curiosamente, los dos tipos de estructuras fundamentales del citoesqueleto de actina, la red que forma una corteza bajo la membrana y fibras de tensión fueron visibles en las células no-malignas (HCV29) y en las de mayor grado de malignidad (T24). En las células de grado 2 (HTB-9) y grado 3 (HT-1376) se infiere la presencia de la red de actina bajo la corteza por la coloración homogénea en la fluorescencia y se observan algunas fibras de estrés en las regiones de contacto entre células y con la superficie. Las mediciones de topografía permitieron determinar que la zona más apropiada para realizar los estudios de espectroscopía era la zona localizada sobre el núcleo celular.

La información reportada en la literatura sobre las propiedades elásticas de las células por microscopía de fuerza indican que un cambio en la rigidez celular es un signo de progresión del cáncer. Ejemplo de ello son las mediciones en células de vejiga [19], mamas [105], colon [119], próstata [104], tiroides [107] y cervicales [120]. Sin embargo en ninguno de los estudios realizados hasta la fecha se han comparado líneas celulares con diferente grado de malignidad.

La espectroscopía de fuerza se realizó en células vivas en el área situada sobre el núcleo, localizada mediante el microscopio invertido. Las células no-malignas son más rígidas que las malignas. Sin embargo no se encontró correlación entre el grado de malignidad del tumor y las propiedades elásticas de las células. Las células HTB-9 de grado 2, las HT-1376 y las T24 (grados 2 y 3) tienen valores de elasticidad muy similares. Se puede puntualizar que los resultados de elasticidad de las HCV29 y T24 coinciden con estudios reportados previamente [19]. La relevancia viene dada porque las células en aquel trabajo fueron crecidas en un cubreobjetos funcionalizado con poly-L-lisina, mientras en este trabajo el sustrato fue solo vidrio.

Se compararon los módulos de Young a la misma profundidad de indentación, pero si se hubiese comparado la elasticidad para la misma fuerza máxima aplicada el resultado habría sido el mismo: las células cancerosas son más blandas que las no-malignas. De acuerdo con la ecuación 5.1 la indentación sería mayor sobre la célula más blanda. Como E disminuye con la profundidad de indentación (5.7) las diferencias entre las células malignas y no-malignas habrían sido mayores.

Se ha reportado que el citoesqueleto de actina tiene un papel fundamental en las propiedades elásticas de las células [113, 121]. La disminución de la rigidez celular inducida por la citocalasina D ratifica este resultado. Tanto las células HCV29 como las HTB-9 disminuyeron su elasticidad hasta valores similares. Esto es una prueba de la importancia del citoesqueleto de actina pero no permite emitir un juicio sobre la importancia que tienen la corteza y/o las fibras de tensión sobre la elasticidad celular. Debe considerarse también que las estructuras del citoesqueleto están altamente integradas entre sí y colapsar el citoesqueleto de actina puede provocar el colapso de la estructura de los microtúbulos y los filamentos intermedios.

Las propiedades de las células fueron estables durante las 4 h que tardaron las mediciones de espectroscopía de fuerza. Esto es relevante porque se midió a temperatura ambiente y no se reguló la concentración de CO_2 . No obstante, otras líneas celulares más delicadas podrían verse afectadas si no se regulan estos parámetros.

5.4. Conclusiones

Las mediciones realizadas a las líneas celulares estudiadas reafirmaron que las células no-malignas son más rígidas que las malignas. Los estudios con ci-

tocalasina D confirmaron el papel primordial del citoesqueleto de actina para la elasticidad celular respecto a los microtúbulos y los filamentos intermedios.

La novedad del trabajo consiste en comparar células cancerosas de diferente grado de malignidad según la clasificación médica. Lejos de lo que cabría esperar, un mayor grado de malignidad no implica un cambio tangible en las propiedades elásticas de la célula. La elasticidad daría en este caso un criterio de clasificación binario: maligno, no-maligno.

Aunque el trabajo es válido para células de la vejiga de origen epitelial, abre la puerta a nuevos estudios para determinar si este comportamiento se cumple para otros tipos de tumores, de diferente origen.

Conclusiones

Conclusiones de Parte I: Microscopía de Fuerza Modulada en Amplitud

1. Para visualizar moléculas con alta resolución en condiciones ambientales mediante microscopía de fuerza modulada en amplitud, es necesario mantener pequeño el radio de la punta de la palanca durante los experimentos. Para ello se debe oscilar la palanca a una amplitud libre menor que 10 nm y utilizar una amplitud de trabajo cercana a la amplitud libre. De este modo se pueden resolver los fragmentos de proteínas IgG incluso con palancas comerciales con radio típico de 7 nm.
2. Tener alta resolución es una condición necesaria pero no suficiente para abordar problemas relacionados con la visualización de proteínas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico pierde su estructura terciaria debido a la influencia del medio y/o del sustrato. Para contrarrestar este efecto se propuso un nuevo modo de preparación de las muestras en el cual el volumen estimado de las moléculas coincide con el valor esperado para su masa molecular.
3. El anticuerpo Nimotuzumab y la región extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico tienen conformaciones muy similares. Las fracciones del histograma de volúmenes de las partículas de la muestra permiten identificar uno u otro tipo de molécula, y las asociaciones que pueden ocurrir entre ellas. De este modo se pueden analizar las conformaciones que pueden adquirir los complejos anticuerpo-receptor.
4. El canal de fase en medio líquido no aporta información suficiente sobre la energía disipada; se debe incluir en el análisis la contribución de los armónicos superiores y se deben considerar al menos dos modos de oscilación de la palanca. En general los armónicos superiores son mayores en el material más rígido. Sin embargo, una mayor distorsión de armónicos no implica que la energía disipada sea menor.

Conclusiones de la Parte 2: Caracterización de la elasticidad de células mediante microscopía de fuerzas:

1. La elasticidad de las líneas celulares estudiadas está determinada por la red tridimensional de filamentos de actina localizada bajo la membrana celular. Se observaron fibras de tensión en la línea T24 pero la elasticidad de las tres líneas celulares cancerosas fue la misma independientemente de su grado de malignidad.
2. En los tipos de células estudiadas, la pérdida de elasticidad comienza desde etapas tempranas del desarrollo del cáncer.

Lista de Publicaciones

1. PAYAM, A. F., RAMOS, J. R. and GARCIA, R. 2012. Molecular and Nanoscale Compositional Contrast of Soft Matter in Liquid: Interplay between Elastic and Dissipative Interactions. *ACS Nano*, 6, 4663-4670.
2. RAMOS, J. R., SZLAGOR, J., GARCIA, R. and LEKKA, M. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Manuscrito en preparación*.
3. RAMOS, J. R. and GARCIA, R. Evaluation of protein unfolding by atomic force microscopy volumetric methods. *Manuscrito en preparación*.

Bibliografía

- [1] G Binnig, CF Quate, and Ch Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930, 1986.
- [2] Y Martin, CC Williams, and HK Wickramasinghe. Atomic force microscope force mapping and profiling on a sub 100 a scale. *Journal of Applied Physics*, 61:7, 1987.
- [3] R Garcia. *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy*. Wiley-VCH, 1st edition, 2010.
- [4] S Alexander, L Hellemans, O Marti, J Schneir, Elings V, PK Hansma, M Longmire, and J Gurley. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *Journal of Applied Physics*, 65(1):164–167, 1989.
- [5] TR Albrecht. Atomic resolution with the atomic force microscope on conductors and nonconductors. *Journal of vacuum science & technology. A, Vacuum, surfaces, and films*, 6(2):271, 1988.
- [6] SAC Gould, B Drake, CB Prater, AL Weisenhorn, S Manne, GL Kelderman, HJ Butt, H Hansma, PK Hansma, S Magonov, and HJ Cantow. The atomic force microscope: A tool for science and industry. *Ultramicroscopy*, 33(2):93–98, 1990.
- [7] G Meyer and NIM Amer. Erratum: Novel optical approach to atomic force microscopy [appl. phys. lett. [bold 5][bold 3], 1045 (1988)]. *Applied Physics Letters*, 53(24):2400–2402, 1988.
- [8] G Meyer and NM Amer. Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The nacl (001) surface. *Applied Physics Letters*, 56(21):2100–2101, 1990.
- [9] B Cappella and G Dietler. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, 34(1):1–104, 1999.
- [10] H Butt, B Cappella, and M Kappl. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, 59(1-6):1–152, 2005.
- [11] JN Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London, 2nd edition, 1992.

- [12] A Engel and DJ Muller. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structure and Molecular Biology*, 7(9):715–718, 2000.
- [13] HJ Butt and M Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1, 1995.
- [14] JE Sader, JWM Chon, and P Mulvaney. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70(10):3967–3969, 1999.
- [15] RW Stark, T Drobek, and WM Heckl. Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86(1-2):207–215, 2001.
- [16] R Levy and M Maaloum. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: Thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, 13(1):33, 2002.
- [17] SM Cook, TE Schaffer, KM Chynoweth, M Wigton, RW Simmonds, and KM Lang. Practical implementation of dynamic methods for measuring atomic force microscope cantilever spring constants. *Nanotechnology*, 17(9):2135, 2006.
- [18] MILB Palacio and B Bhushan. Normal and lateral force calibration techniques for afm cantilevers. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 35(2):73–104, 2010.
- [19] M Lekka, P Laidler, D Gil, J Lekki, Z Stachura, and AZ Hrynkiwicz. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal*, 28(4):312–316, 1999.
- [20] JG Goetz, S Minguet, I Navarro-Lérida, JJ Lazcano, R Samaniego, E Calvo, M Tello, T Osteso-Ibáñez, T Pellinen, A Echarri, and et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*, 146(1):148–163, 2011.
- [21] A Touhami, B Nysten, and YF Dufrene. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*, 19(11):4539–4543, 2003.
- [22] M Lekka, D Gil, K Pogoda, J Dulinska-Litewka, R Jach, J Gostek, O Klymenko, S Prauzner-Bechcicki, Z Stachura, J Wiltowska-Zuber, K Okon, and P Laidler. Cancer cell detection in tissue sections using afm. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 518(2):151–156, 2012.
- [23] R Garcia and R Perez. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, 47(6-8):197–301, 2002.
- [24] J Tamayo and R Garcia. Effects of elastic and inelastic interactions on phase contrast images in tapping-mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*, 71(16):2394–2396, 1997.

- [25] J Tamayo and R Garcia. Relationship between phase shift and energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*, 73(20):2926–2928, 1998.
- [26] NF Martinez and R Garcia. Measuring phase shifts and energy dissipation with amplitude modulation atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 17(7):S167, 2006.
- [27] S Patil, NF Martinez, JR Lozano, and R Garcia. Force microscopy imaging of individual protein molecules with sub-pico newton force sensitivity. *Journal of Molecular Recognition*, (6):516–523, 2007.
- [28] K Voitchovsky, S Antoranz Contera, M Kamihira, A Watts, and JF Ryan. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophysical Journal*, 90(6):2075–2085, 2006.
- [29] J Melcher, C Carrasco, X Xu, JL Carrascosa, J Gomez-Herrero, P Jose de Pablo, and A Raman. Origins of phase contrast in the atomic force microscope in liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33):13655–13660, 2009.
- [30] M Stark, C Moller, DJ Muller, and R Guckenberger. From images to interactions: High-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 80(6):3009–3018, 2001.
- [31] AF Payam, JR Ramos, and R Garcia. Molecular and nanoscale compositional contrast of soft matter in liquid: Interplay between elastic and dissipative interactions. *ACS Nano*, 6(6):4663–4670, 2012.
- [32] G Binnig and DPE. Smith. Single-tube three-dimensional scanner for scanning tunneling microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 57(8):1688–1689, 1986.
- [33] ME Taylor. Dynamics of piezoelectric tube scanners for scanning probe microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 64(1):154–158, 1993.
- [34] A San Paulo and R Garcia. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophysical Journal*, 78(3):1599–1605, 2000.
- [35] S Santos, L Guang, T Souier, K Gadelrab, M Chiesa, and NH Thomson. A method to provide rapid in situ determination of tip radius in dynamic atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 83(4):043707, 2012.
- [36] ME Fuentes-Perez, MS Dillingham, and F Moreno-Herrero. Afm volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids. *Methods*, 60(2):113–121, 2013.
- [37] JP Cleveland, B Anczykowski, AE Schmid, and VB Elings. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 72(20):2613–2615, 1998.

- [38] R Garcia, CJ Gomez, NF Martinez, S Patil, C Dietz, and R Magerle. Identification of nanoscale dissipation processes by dynamic atomic force microscopy. *Physical Review Letters*, 97(1):016103, 2006.
- [39] J Tamayo. Energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy with low quality factors. *Applied Physics Letters*, 75(22):3569–3571, 1999.
- [40] D Kiracofe and A Raman. Quantitative force and dissipation measurements in liquids using piezo-excited atomic force microscopy: a unifying theory. *Nanotechnology*, 22(48):485502, 2011.
- [41] P Hinterdorfer and YF Dufrene. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods*, 3(5):347–355, 2006.
- [42] FJ Giessibl and CF Quate. Exploring the nanoworld with atomic force microscopy. *Physics Today*, 59(12):44–50, 2006.
- [43] J Mou, S Sheng, R Ho, and Z Shao. Chaperonins groel and groes: Views from atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 71(4):2213–2221, 1996.
- [44] A San Paulo and R Garcia. Unifying theory of tapping-mode atomic force microscopy. *Physical Review B*, 66(4):041406, 2002.
- [45] LJ Harris, SB Larson, KW Hasel, and A McPherson. Refined structure of an intact igg2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, 36(7):1581–1597, 1997.
- [46] CE Giacomelli. *Enciclopedia of Surface and Colloid Science*, chapter Adsorption of Immunoglobulins at Solid-Liquid Interfaces, pages 418–439. Marcel Dekker, Inc., 2002.
- [47] AWP Vermeer. *Enciclopedia of Surface and Colloid Science*, chapter Conformation of Adsorbed Protein, pages 1193–1212. Marcel Dekker, Inc., 2002.
- [48] H Butt and M Kappl. *Surface and Interfacial Forces*. Viley-VCH, Darmstadt, Germany, 1st edition, 2010.
- [49] M Köber, E Sahagún, P García-Mochales, F Briones, M Luna, and JJ Sáenz. Nanogeometry matters: Unexpected decrease of capillary adhesion forces with increasing relative humidity. *small*, 6(23):2725–2730, 2010.
- [50] S Santos, V Barcons, HK Christenson, J Font, and NH Thomson. The intrinsic resolution limit in the atomic force microscope: Implications for heights of nano-scale features. *PLoS ONE*, 6(8):e23821, 08 2011.
- [51] MS Ramakrishnan, A Eswaraiah, T Crombet, P Piedra, G Saurez, H Iyer, and AS Arvind. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origins. In *MAbs*, volume 1, pages 41–48. Landes Bioscience, 2009.

- [52] A Talavera, R Friemann, S Gomez-Puerta, C Martinez-Fleites, G Garrido, A Rabasa, A Lopez-Requena, A Pupo, RF Johansen, O Sanchez, U Krenzel, and E Moreno. Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. *Cancer Research*, 69(14):5851–5859, 2009.
- [53] AEG Lenferink, EJJ van Zoelen, MJH van Vugt, S Grothe, W van Rotterdam, MLM van De Poll, and MD O'Connor-McCourt. Superagonistic activation of erbb-1 by egf-related growth factors with enhanced association and dissociation rate constants. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35):26748–26753, 2000.
- [54] KM Ferguson, MB Berger, JM Mendrola, H Cho, DJ Leahy, and MA Lemmon. Egf activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular Cell*, 11(2):507–517, 2003.
- [55] J Mendelsohn and J Baselga. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. In *Seminars in Oncology*, volume 33, pages 369–385. [New York] Grune & Stratton.
- [56] S Li, KR Schmitz, PD Jeffrey, JJW Wiltzius, P Kussie, and KM Ferguson. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell*, 7(4):301–311, 2005.
- [57] JJJ van Bueren, WK Bleeker, A Brannstrom, A von Euler, M. Jansson, M. Peipp, T. Schneider-Merck, T. Valerius, J. G. J. van de Winkel, and P. W.H.I. Parren. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(16):6109–6114, 2008.
- [58] MA Lemmon, Z Bu, JE Ladbury, M Zhou, D Pinchasi, I Lax, DM Engelman, and J Schlessinger. Two egf molecules contribute additively to stabilization of the egfr dimer. *The EMBO Journal*, 16(2):281–294, 1997.
- [59] KM Ferguson, PJ Darling, MJ Mohan, TL Macatee, and MA Lemmon. Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbb receptors. *The EMBO Journal*, 19(17):4632–4643, 2000.
- [60] JA Goodrich and JF Kugel. *Binding and Kinetics for Molecular Biologists*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., 1st edition, 2007.
- [61] SW Schneider, J Larmer, RM Henderson, and H Oberleithner. Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy. *Pflugers Archiv- European Journal of Physiology*, 435(3):362–367, 1998.
- [62] ME Fuentes-Perez, EJ Gwynn, MS Dillingham, and F Moreno-Herrero. Using dna as a fiducial marker to study smc complex interactions with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 102(4):839–848, 2012.

- [63] J Preiner, J Tang, V Pastushenko, and P Hinterdorfer. Higher harmonic atomic force microscopy: Imaging of biological membranes in liquid. *Physical Review Letters*, 99(4):046102, 2007.
- [64] X Xu, J Melcher, S Basak, R Reifenger, and A Raman. Compositional contrast of biological materials in liquids using the momentary excitation of higher eigenmodes in dynamic atomic force microscopy. *Physical Review Letters*, 102(6):060801, 2009.
- [65] R Garcia, R Magerle, and R Perez. Nanoscale compositional mapping with gentle forces. *Nature Materials*, 6(6):405–411, 2007.
- [66] S Santos, KR Gadelrab, T Souier, M Stefancich, and M Chiesa. Quantifying dissipative contributions in nanoscale interactions. *Nanoscale*, 4(3):792–800, 2012.
- [67] S Santos, K Gadelrab, V Barcons, M Stefancich, and M Chiesa. Quantification of dissipation and deformation in ambient atomic force microscopy. *New Journal of Physics*, 14(7):073044, 2012.
- [68] RW Stark and M Stark. *Higher Harmonics in Dynamic Atomic Force Microscopy*, chapter 1, pages 1–36. NanoScience and Technology. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [69] A Raman, J Melcher, and R Tung. Cantilever dynamics in atomic force microscopy. *Nano Today*, 3(1-2):20–27, 2008.
- [70] S Basak and A Raman. Dynamics of tapping mode atomic force microscopy in liquids: Theory and experiments. *Applied Physics Letters*, 91(6):064107–3, 2007.
- [71] D Kiracofe and A Raman. On eigenmodes, stiffness, and sensitivity of atomic force microscope cantilevers in air versus liquids. *Journal of Applied Physics*, 107(3):033506–9, 2010.
- [72] X Xu, J Melcher, and A Raman. Accurate force spectroscopy in tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Physical Review B*, 81(3):035407, 2010.
- [73] TE Schaffer. Calculation of thermal noise in an atomic force microscope with a finite optical spot size. *Nanotechnology*, 16(6):664, 2005.
- [74] O Sahin, S Magonov, C Su, CF Quate, and O Solgaard. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nature Nanotechnology*, 2(8):507–514, 2007.
- [75] M Stark, RW Stark, WM Heckl, and R Guckenberger. Inverting dynamic force microscopy: From signals to time-resolved interaction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13):8473–8478, 2002.
- [76] BV Derjaguin, VM Muller, and YP Toporov. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 53(2):314–326, 1975.

- [77] H Belrhali, P Nollert, A Royant, C Menzel, JP Rosenbusch, EM Landau, and E Pebay-Peyroula. Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure*, 7(8):909–17, 1999.
- [78] SA Contera, K Voitchovsky, and JF Ryan. Controlled ionic condensation at the surface of a native extremophile membrane. *Nanoscale*, 2(2):222–229, 2010.
- [79] DJ Muller and A Engel. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Nature Protocols*, 2(9):2191–2197, 2007.
- [80] G Zaccai. How soft is a protein? a protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, 288(5471):1604–1607, 2000.
- [81] ID Medalsy and DJ Muller. Nanomechanical properties of proteins and membranes depend on loading rate and electrostatic interactions. *ACS Nano*, 7(3):2642–2650, 2013.
- [82] DJ Muller, JB Heymann, F Oesterhelt, C Moller, H Gaub, G Buldt, and A Engel. Atomic force microscopy of native purple membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1460(1):27–38, 2000.
- [83] DJ Muller, H Janovjak, T Lehto, L Kuerschner, and K Anderson. Observing structure, function and assembly of single proteins by afm. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 79(1-3):1–43.
- [84] DJ Muller, D Fotiadis, S Scheuring, SA Muller, and A Engel. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 76(2):1101–1111, 1999.
- [85] Y Kimura, DG Vassilyev, A Miyazawa, A Kidera, M Matsushima, K Mitsuoka, K Murata, T Hirai, and Y Fujiyoshi. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature*, 389(6647):206–211, 1997. 10.1038/38323.
- [86] F Rico, C Su, and S Scheuring. Mechanical mapping of single membrane proteins at submolecular resolution. *Nano Letters*, 11(9):3983–3986, 2011.
- [87] RW Stark. Spectroscopy of higher harmonics in dynamic atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 15(3):347, 2004.
- [88] J Kokavecz and A Mechler. Investigation of fluid cell resonances in intermittent contact mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 91(2):023113–3, 2007.
- [89] ET Herruzo and R Garcia. Frequency response of an atomic force microscope in liquids and air: Magnetic versus acoustic excitation. *Applied Physics Letters*, 91(14):143113, 2007.

- [90] X Xu, C Carrasco, P Jose de Pablo, J Gomez-Herrero, and A Raman. Unmasking imaging forces on soft biological samples in liquids when using dynamic atomic force microscopy: A case study on viral capsids. *Biophysical Journal*, 95(5):2520–2528, 2008.
- [91] GM Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press, Boston (MA), 2nd edition, 2000.
- [92] M Radmacher, M Fritz, CM Kacher, JP Cleveland, and PK Hansma. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*, 70(1):556–567, 1996.
- [93] J Alcaraz, L Buscemi, M Grabulosa, X Trepas, B Fabry, R Farre, and D Navajas. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 84(3):2071–2079, 2003.
- [94] F Rico, P Roca-Cusachs, N Gavara, R Farre, M Rotger, and D Navajas. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Physical Review E*, 72(2):021914, 2005.
- [95] A Ikai. *The World of Nano-Biomechanics*. Elsevier, Amsterdam, 1st edition, 2008.
- [96] DJ Muller and YF Dufrene. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*, 21(8):461–469, 2011.
- [97] A Raman, S Trigueros, A Cartagena, APZ Stevenson, M Susilo, E Nauman, and SA Contera. Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*, 6(12):809–814, 2011.
- [98] Ch Rotsch and M Radmacher. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, 78(1):520–535, 2000.
- [99] AE Pelling, DW Dawson, DM Carreon, JJ Christiansen, RR Shen, MA Teitell, and JK Gimzewski. Distinct contributions of microtubule subtypes to cell membrane shape and stability. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1):43–52, 2007.
- [100] X Cai, X Xing, J Cai, Q Chen, S Wu, and F Huang. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and jurkat cells: An afm study. *Micron*, 41(3):257–262, 2010.
- [101] K Pogoda, J Jaczewska, J Wiltowska-Zuber, O Klymenko, K Zuber, M Fornal, and M Lekka. Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on afm data. *European Biophysics Journal*, 41(1):79–87, 2012.
- [102] SE Cross, Y Jin, J Rao, and JK Gimzewski. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*, 2(12):780–783, 2007.

- [103] SE Cross, Y Jin, J Tondre, R. Wong, J Rao, and JK Gimzewski. Afm-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 19(38):384003, 2008.
- [104] EC Faria, N Ma, E Gazi, P Gardner, M Brown, NW Clarke, and RD Snook. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using afm. *Analyst*, 133(11):1498–1500, 2008.
- [105] QS Li, GYH Lee, CN Ong, and CT Lim. Afm indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(4):609–613, 2008.
- [106] A Reich, M Meurer, B Eckes, J Friedrichs, and DJ Muller. Surface morphology and mechanical properties of fibroblasts from scleroderma patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b):1644–1652, 2009.
- [107] M Prabhune, G Belge, A Dotzauer, J Bullerdiek, and M Radmacher. Comparison of mechanical properties of normal and malignant thyroid cells. *Micron*, 43(12):1267–1272, 2012.
- [108] M Plodinec, M Loparic, CA Monnier, EC Obermann, R Zanetti-Dallenbach, P Oertle, JT Hyotyla, U Aebi, M Bentires-Alj, YH LimRoderick, and C Schoenenberger. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nature Nanotechnology*, 7(11):757–765, 2012.
- [109] TW Remmerbach, F Wottawah, J Dietrich, B Lincoln, C Wittekind, and J Guck. Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping. *Cancer Research*, 69(5):1728–1732, 2009.
- [110] T Ludwig, R Kirmse, K Poole, and US Schwarz. Probing cellular micro-environments and tissue remodeling by atomic force microscopy. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(1):29–49, 2008.
- [111] P Lu, VM Weaver, and Z Werb. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*, 196(4):395–406, 2012.
- [112] M Lekka, P Laidler, JJ Ignacak, M Labd, J Lekki, H Struszczyk, Z Stachura, and AZ Hryniewicz. The effect of chitosan on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1540(2):127–136, 2001.
- [113] T Wakatsuki, B Schwab, NC Thompson, and EL Elson. Effects of cytochalasin d and latrunculin b on mechanical properties of cells. *Journal of cell science*, 114(5):1025–1036, 2001.
- [114] IN Sneddon. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, 3(1):47–57, 1965.
- [115] GM Pharr, WC Oliver, and FR Brotzen. On the generality of the relationship among contact stiffness, contact area, and elastic modulus during indentation. *Journal of Materials Research*, 7(3):613–617, 1992.

- [116] D Montgomery. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica SA, México, 3 edition, 1991.
- [117] M Yilmaz and G Christofori. Emt, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2):15–33, 2009.
- [118] D Hanahan and RA Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [119] M Lekka, K Pogoda, J Gostek, O Klymenko, S Prauzner-Bechcicki, J Wiltowska-Zuber, J Jaczewska, J Lekki, and Z Stachura. Cancer cell recognition - mechanical phenotype. *Micron*, 43(12):1259–1266, 2012.
- [120] ME Dokukin, NV Guz, RM Gaikwad, CD Woodworth, and I Sokolov. Cell surface as a fractal: Normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behavior of surface adhesion maps at the nanoscale. *Physical Review Letters*, 107(2):028101, 2011.
- [121] R O’Callaghan, KM Job, RO Dull, and V Hlady. Stiffness and heterogeneity of the pulmonary endothelial glycocalyx measured by atomic force microscopy. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(3):L353–L360, 2011.