
La Universidad Nacional Autónoma de México
y
La Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca

1° CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA MÉDICA

*Dedicado a la Investigación de
Cáncer*

Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos.

México, Oaxaca 23 al 27 de Noviembre 2004

VISUALIZACIÓN DE COLESTEROL (LDL Y HDL) CON MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM) Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DE EFECTO TÚNEL (STM), A NIVEL MOLECULAR

Segura Aristeo^{a,b} y Batina Nikola^b

a). Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Av. Univ. S/N, Col. 5 Señores. C.P. 68120. Oaxaca, Oax. * aristeo66@terra.com.mx.

b). Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Area de Electroquímica, Depto. De Química, CBI, UAM-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, C.P. 09340. México, D.F.

** bani@xanum.uam.mx

Introducción

La medicina moderna conoce la arteriosclerosis como el endurecimiento de las arterias, causada por la acumulación de colesterol por debajo del epitelio de las arterias^[1]. Esta acumulación hace que las arterias sean más rígidas de lo normal y produce un bloqueo total o parcial de la circulación de la sangre.

El colesterol se presenta en dos formas en el cuerpo humano una es en forma de colesterol monohidratado (molécula individual) y la otra es en forma de agregados como lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de alta densidad (HDL). Por el impacto que tiene en la salud humana, existe un gran interés de conocer los mecanismos de interacción colesterol-colesterol, colesterol-lípido, colesterol-proteínas, colesterol con otras moléculas y la interacción que existe en las lipoproteínas LDL y HDL y otras moléculas dentro del organismo. También es muy interesante establecer la correlación entre estructura molecular de colesterol como molécula individual o en diferentes agregados y funcionalidad de estos en el organismo. Estos procesos son relacionados a nivel nanométrico-molecular y para estos se necesitan usar métodos de nanotecnología como microscopios de AFM y STM, los cuales no son métodos tradicionales en el campo de medicina y biología.

Hasta ahora, por nuestro conocimiento, la molécula de colesterol monohidratado (molécula individual) desde el punto de vista de la química, es una macromolécula simple, la cual contiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno y presenta un grupo hidroxilo en el carbono 3, con una cadena lateral de 8 átomos de carbono, doble enlace en el C-5 y además de los grupos metilos C-18, C-19, C-21, C-26 y C-27. Colesterol es una molécula que tiene una parte hidrofóbica (CH₃ - terminal) y la parte hidrofílica (OH-terminal) (anfipático)^[2]. La figura 1, muestra una estructura química con grupos funcionales y estructura tridimensional con medidas precisas de tamaño molecular.

Este modelo fue preparado por software Spartan PC (WaveFunction, Inc, USA). El tamaño de la molécula de colesterol monohidratado calculado en nuestro laboratorio es de 1.6 nm de longitud y 0.4 nm de ancho

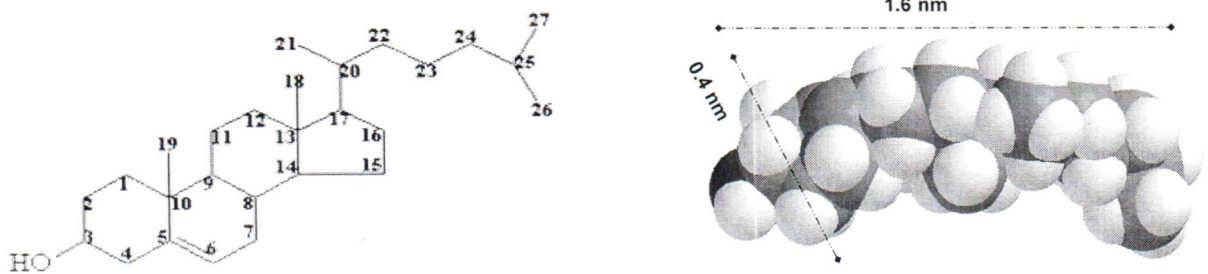


Figura 1 estructura del colesterol

La circulación del colesterol en el torrente sanguíneo es en forma de lipoproteínas como LDL y HDL. La lipoproteína LDL es el mejor vehículo para la transportación de moléculas de colesterol hacia las células del cuerpo humano. Hasta ahora, se conoce que esta biomolécula de LDL es esférica con un diámetro de 25 nm. Contiene un núcleo hidrofóbico y en la superficie es hidrofílica^[3] parcialmente cubierta con proteínas específicas, como es presentado en el esquema de la figura 2.

El HDL también se encuentra en forma esférica de un tamaño de 12 nm es responsable para el transporte inverso para limpiar a las células del acceso de colesterol^[4]. El HDL también contiene una cubierta proteica, pero con diferente tipo de apoproteína que LDL. Es interesante como consecuencia de esta modificación estructural, las carga de estas dos partículas son diferentes, HDL tiene la carga negativa, y LDL es positiva.

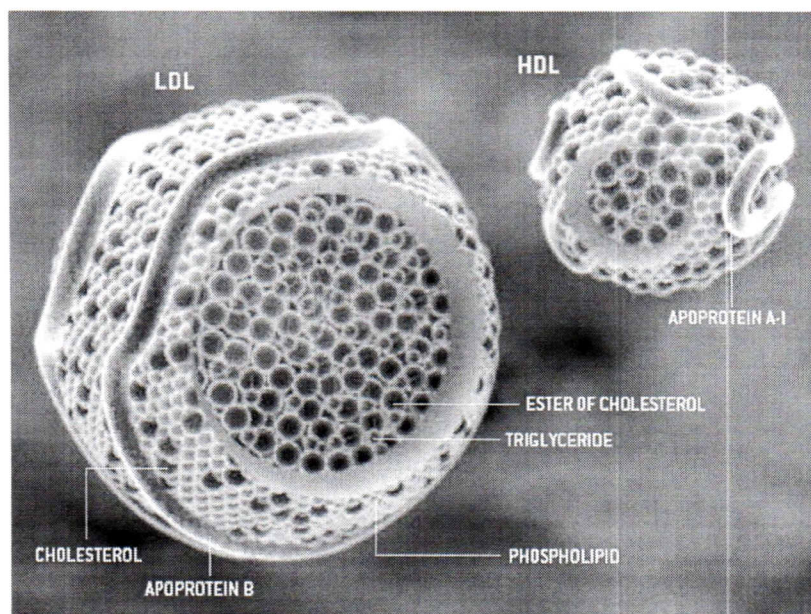


Figura 2. LDL y HDL presentado por Peter Lobby, en *SCIENTIFIC AMERICAN*, volumen 286 (2002) 30-37.

Definitivamente, existen muchos datos de estructura y comportamiento de LDL y HDL, sin embargo muy pocos con un detalle a nivel nanométrico y muy pocos relacionados con el estudio de la superficie de éstas partículas. El uso de microscopía de AFM, STM y otros métodos de la nanotecnología moderna pueden en un futuro cercano llenar este espacio,

además estas nuevas técnicas ofrecen visualización y caracterización de material biológico in vivo, en funcionamiento natural y a nivel molecular. Sin embargo no es garantizado y no es claro de que manera la aplicación de estas técnicas y la participación de la nanotecnología en medicina y biología, puede contribuir en el desarrollo de estas disciplinas.

El objetivo central de este estudio es una investigación de carácter preliminar usando moléculas de colesterol y agregados de colesterol conocidas como lipoproteínas (HDL y LDL) mediante técnicas de nanotecnología y las microscopías AFM y STM para enseñar posibilidades de esta aproximación en el campo de la biología y medicina. Como estudios preliminares y pioneros este tipo de investigación es básica y simplificada, pero con mucho potencial e importancia para el futuro.

Materiales y Metodología

Materiales

En esta estudio usamos los siguientes materiales: Colesterol (99+% pureza, Aldrich, EUA), muestra BT.914 (10 mg/ml) de High Density Lipoprotein (HDL) origen humano en solución amortiguadora de tris buffer, Biomedical Technologies Inc., EUA, muestra BT-903 (5mg/ml) de Low Density Lipoprotein (LDL) origen humano, Biomedical Technologies Inc. EUA), metanol (99.93 %, Aldrich, EUA.), Placa de vidrio con película de Au(111) (Berliner Glas Co. Berlin, Alemania), alambre de tungsteno policristalino de diámetro 0.25 mm (99.95% puro metal -Alfa AESAR, Japon) y agua ultra pura con sistema Milli-Q Millipore, EUA.

Metodología:

Preparación de muestras de colesterol monohidratado que incluye disolución en metanol (2×10^{-4} M) y fijación sobre el substrato de Au(111).

Para las moléculas de colesterol en forma de lipoproteínas (HDL y LDL) se prepararon desde una disolución de 2×10^{-7} mg/ml de LDL y 3.2×10^{-7} mg/ml de HDL y posteriormente se fijaron en el substrato de Au (111), a temperatura ambiente de laboratorio y a temperatura de 37 °C.

Instrumentación:

En este estudio usamos dos microscopios de nueva generacion:

Microscopio de fuerza atómica (AFM) y microscopio electrónico de barrido y de efecto túnel (STM) los cuales son muy conocidos en el campo de las ciencias de materiales, física y química moderna; operan con principios explicados en literatura previa: STM [5] y AFM [6].

Ambos microscopios tienen diferencias significativas con los microscopios ópticos clásicos o el microscopio electrónico de barrido, así como también la resolución de AFM y STM supera completamente otro tipo de microscopios. [7]

Recientemente el AFM y STM se usan en biología por dos motivos específicos: primeramente porque se tiene la posibilidad para trabajar en medio acuoso que favorece la visualización de material biológico en estado funcional. El segundo motivo está relacionado con el hecho de que AFM y STM son menos invasivos a la muestra que otras microscopías [8].

Resultados y Discusión

Las moléculas de colesterol monohidratado, con una concentración 2×10^{-4} M preparado en diferentes solventes agua metanol, tolueno y etilenglicol, adsorbiendo estas moléculas de colesterol monohidratado sobre el Au (111) a temperatura ambiente y visualizados por el microscopio de STM, los únicos solventes con los que se obtuvieron imágenes de alta resolución del colesterol monohidratado fueron el agua y el metanol. En la caracterización de las moléculas de colesterol monohidratado con el microscopio de fuerza química se reportan imágenes utilizando el metanol como solvente [2].

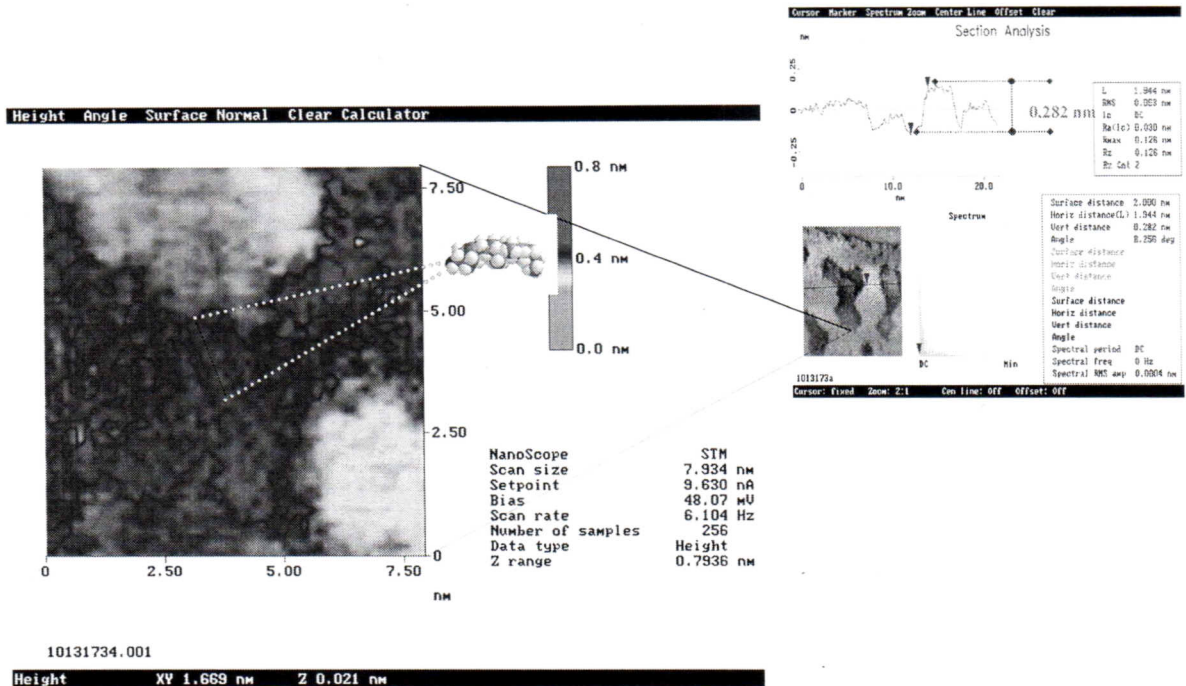
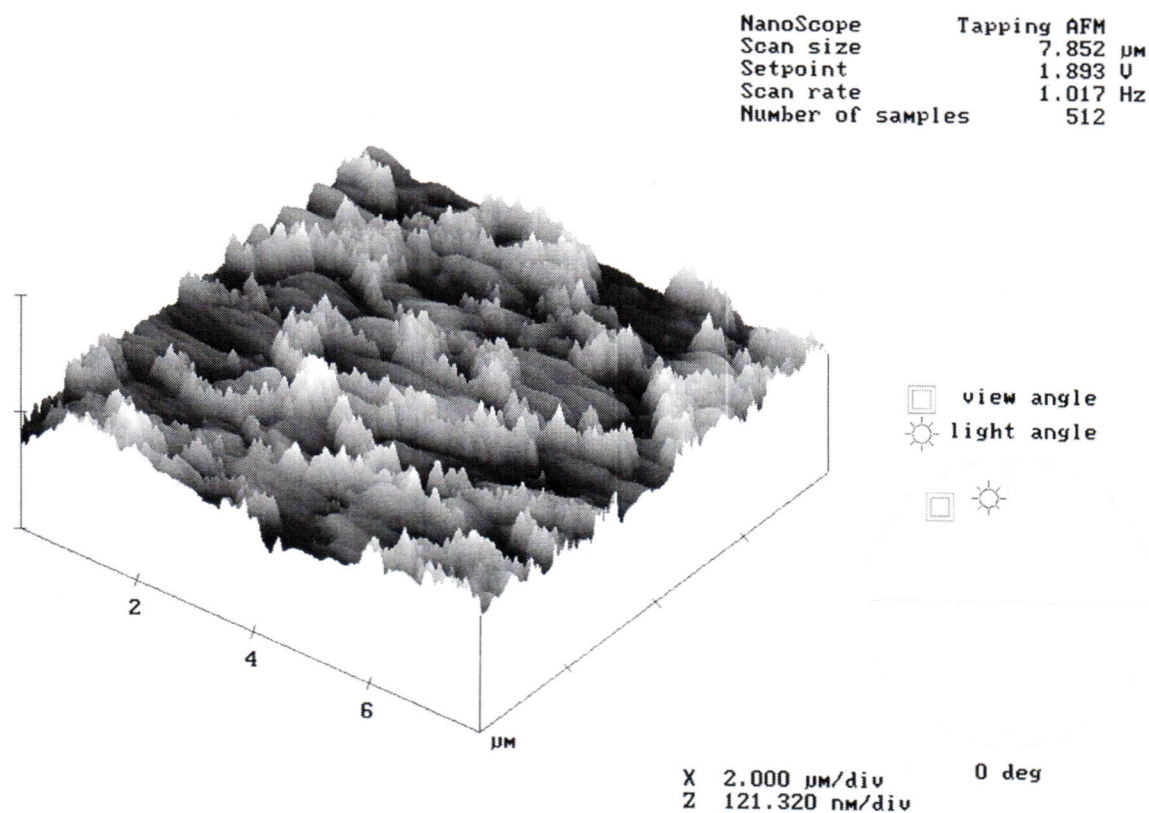


Figura 4. STM imagen de alta resolución de capas de moléculas de colesterol monohidratado (2×10^{-4} M) en agua y adsorbidas a temperatura ambiente sobre Au (111). Esta imagen muestra capas de colesterol, con posibilidad de identificar moléculas individuales de colesterol.

En la figura 4 podemos observar las capas de moléculas de colesterol monohidratado que se encuentran de manera ordenadas sobre las terrazas del Au (111) monocristalino, estas moléculas tienden a agruparse entre ellas y dejando un espacio entre agregados con la posibilidad de identificar moléculas individuales de colesterol, mediante el análisis de la sección transversal se determinó el grosor de estas capas de colesterol de 0.282 nm, esta información no se puede confundir con los escalones de las terrazas del Au(111) limpio ya que estos miden solamente 0.238 nm. Con el microscopio de fuerza química se reportan las capas de colesterol monohidratado mostrando que son multi capas con una dimensión de 3.4 nm de espesor [2] y con el microscopio de fuerza atómica se reportan capas mas gruesas de 4 nm [4]

En cambio los que se obtuvieron con el microscopio de STM son imágenes de una mono capa de moléculas de colesterol con un espesor de 0.282 nm.

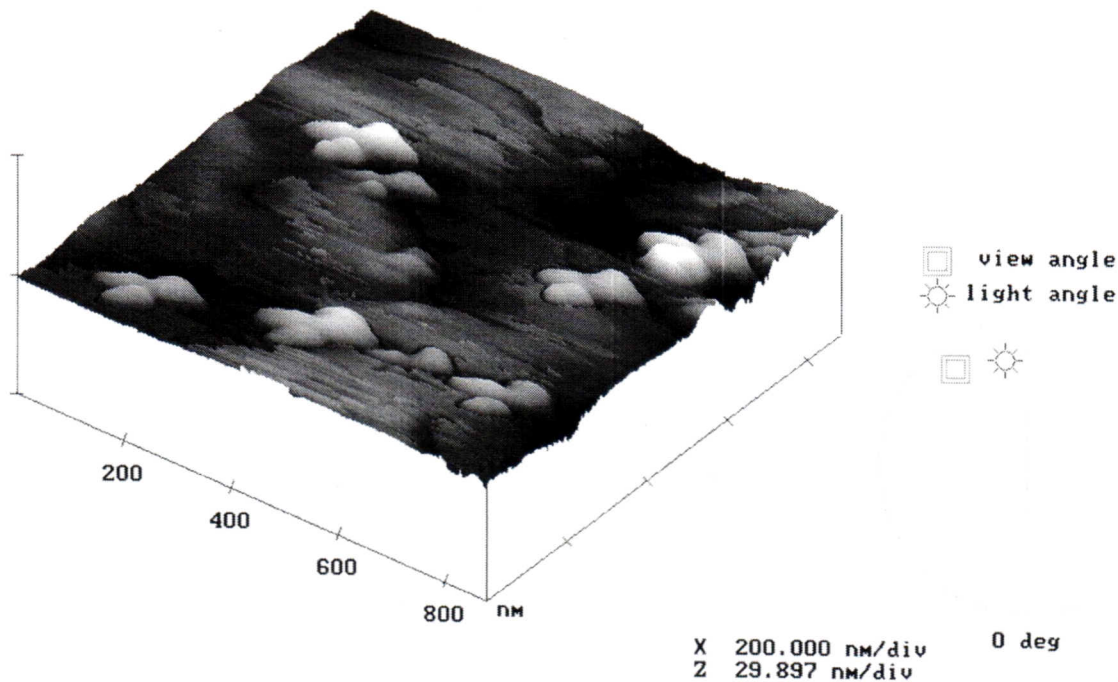


02132033.k1m

Figura 5 AFM imagen tridimensional de capas de moléculas de HDL (3.2×10^{-7} mg/ml) en agua a temperatura de 37 °C sobre Au(111). Esta imagen muestra la adsorción preferencial de HDL en las orillas de los granos de oro.

En la figura 5 podemos observar la imagen obtenida por AFM, en donde las moléculas de colesterol en forma de HDL se agregan en forma particular en las orillas de los granos de oro, en esta zona es donde se da el crecimiento de las moléculas de HDL, el espesor de la capa adsorbida de las moléculas de HDL sobre el oro es de 42.048 nm, hasta el momento solo se ha encontrado moléculas agregados en las orillas de los granos de oro y el tamaño mínimo del agregado de HDL es de 121.37 nm^[9]

NanoScope	Tapping AFM
Scan size	871.6 nm
Setpoint	3.754 U
Scan rate	1.017 Hz
Number of samples	512



02171515.k1m

Figura 6 AFM imagen tridimensional de LDL(2×10^{-7} mg/ml) en agua a una temperatura de 37 °C sobre Au(111). Esta imagen muestra como se agrega esta lipoproteína en la orilla de los granos de oro, con una geometría específica.

En la figura 6 se observa los agregados de LDL, estas moléculas tienen las características de agregarse y adsorberse en lugares defectuosos del sustrato Au (111), casi en forma individual con una geometría muy específica, en el que probablemente se encuentren cuatro moléculas de LDL, tomando en cuenta los modelos para estas moléculas se reporta de 25 nm de diámetro, el agregado tiene un tamaño de 121 nm de diámetro y con un espesor de la capa adsorbida de 3.7 nm ^[10]

Conclusión

El solvente con el que se obtuvieron imágenes de alta resolución de moléculas de colesterol monohidratado sobre el sustrato de Au(111) fue el agua y metanol (solventes polares). En la mayoría de los casos las moléculas y agregados se adsorben y agregan en las orillas de granos del sustrato (oro), lo cual indica que hay una interacción específica entre moléculas y sustrato, probablemente una interacción polar. El colesterol monohidratado se adsorbe en formas de monocapas y por esto el grosor de la película adsorbida es sólo de 0.282 nm, por esto, también es posible usar STM en esta investigación. Las lipoproteínas de HDL, también se encuentran en la mayoría de los casos en las orillas de los granos de Au(111), en forma agregada. Este comportamiento es interesante y es independiente a la concentración de HDL en solución. El espesor de los agregados macromoleculares que forma el HDL es de 42.08 nm, con un diámetro de 121.37 nm (forma de disco).

Los agregados de LDL se adsorben sobre toda la superficie y no solo en las orillas de los granos. Además los agregados de LDL tienen una forma geométrica-específica, estilo "mariposa". El espesor de estos agregados es de 3.74 nm y con diámetro de 121 nm. Con respecto a estas medidas, y sabiendo que el tamaño del LDL es de 25 nm, probablemente un agregado consiste en cuatro moléculas de LDL. La interpretación detallada de estos resultados está en progreso.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue realizado gracias al apoyo de la división de CBI, departamento de química, área electroquímica y de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), a través del Proyecto FIES-98-100-I "Mecanismos de deposición de compuestos orgánicos pesados en flujo de petróleo en oleoductos" y el Programa de Mejoramiento de Profesores (PROMEP).