

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**"DESARROLLO DE MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN
FENOTÍPICA TISULAR DE TEJIDOS POR MICROSCOPIA DE
FUERZA ATÓMICA Y CAMPO OSCURO HIPERESPECTRAL"**

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS:

Fernando Castillo Martínez Moranchel

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida**

**CODIRECTOR DE TESIS:
Dr. Benjamín Valdez Salas**

Mexicali, B. C.

Junio de 2024

RESUMEN

Para realizar la correcta detección del funcionamiento de tratamientos médicos, es de vital importancia contar con un protocolo de obtención de imágenes de alta calidad mediante diferentes tipos de microscopía. Estos protocolos permiten observar los cambios fenotípicos que sufren las células durante la aplicación de diferentes tratamientos que permitan controlar el comportamiento celular. Por ello, se desarrollaron técnicas y protocolos para la obtención de imágenes de alta calidad por microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) y de campo oscuro hiperespectral (Cytoviva), así como el análisis de los datos obtenidos de las mismas. Para ello, se realizaron diferentes pruebas ajustando los parámetros para la fijación, el cultivo de las células mamíferas o microorganismos, la preparación del material y aditamentos para mejorar el anclaje. De igual manera, se utilizaron los parámetros de rugosidad, altura y crestas, obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica, para detectar cambios fenotípicos en las células analizadas. Se utilizaron tres diferentes líneas celulares y dos microorganismos para la creación de estos protocolos. Mediante los resultados obtenidos fue posible diseñar una metodología que permite realizar lecturas con un enfoque preciso en el área de interés cuando se trabaja con microscopía de campo oscuro, y otro protocolo que permite la obtención de datos para la caracterización de los cambios fenotípicos mediante microscopía de fuerza atómica.

RESUMEN (INGLES)

To obtain a precise detection of the functionality of medical treatments, it is of vital importance to develop a functional protocol that allows the obtention of high-quality images regardless of the type of microscopy that is being used. These protocols permit to detect the phenotypical changes that the cells go through during the application of the different treatments to control the cellular behavior. The present work consisted of developing cell preparation techniques and microscopy protocols for capturing high-quality micrographs by atomic force microscopy (AFM) and dark field hyperspectral microscopy (Cytoviva), as well as the analysis of the topological data. To achieve this information, different tests were run adjusting the parameters for the fixation, the culture of cells and/or microorganisms, the preparation of the material, and the complements used to improve the cell anchorage. Also, rugosity data, as well as height and crests parameters, obtained with AFM, were used to detect surface phenotypical changes in the analyzed cells. Three different cell lines and two microorganisms were used for the creation of these protocols. With the results obtained, it became possible to design a protocol that allows dark field microscopy readings that focus precisely on the area of interest, and AFM scans that deliver important data for the characterization of the phenotypical changes after the treatments.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mis padres, que gracias a su apoyo incondicional pude lograr mi sueño de seguir estudiando. Gracias por siempre ver primero por nosotros y ser un ejemplo de seres pacientes y bondadosos.

Este trabajo va también por mi pareja, que siempre estuvo conmigo y me motivó a salir adelante. Por ti es que logré terminar y alcanzar esta meta, por ese empuje a ser el mejor y por tu amor que me inspiró a sobresalir.

Se lo dedico también a mi hermano, que ha sido no solo una enciclopedia médica, si no mi mejor amigo siempre. Me has ayudado en los momentos de estrés y me has aconsejado como si tu fueras el mayor.

Y, por último, a mis abuelos, que siempre fueron un ejemplo de resiliencia y de disciplina, y que sé que estarán muy orgullosos del trabajo que he logrado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a mis directores de tesis, Dr. Ernesto Beltrán y Dr. Benjamín Valdez, por prestarme sus amplios conocimientos en el área de la ciencia y estar ahí no solo como maestros, si no como guías a lo largo de todo el camino.

También a mis compañeros, que siempre estuvieron dispuestos a orientarme y ayudarme con todas las dificultades que me encontré a lo largo del posgrado. Gracias a todos ustedes por siempre querer apoyar con una sonrisa en el rostro.

Sin duda un agradecimiento a mis padres, que me dieron la oportunidad de seguir con mis estudios y me proporcionaron con todas las herramientas que pude necesitar en este tiempo.

Y en general a todas aquellas personas con las que tuve el privilegio de colaborar durante estos años y me ayudaron a crecer como persona.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1: FUNDAMENTOS TEÓRICOS | 12 |
| CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| 2.1 Hipótesis | 32 |
| 2.2 Objetivo General | 32 |
| 2.3 Objetivos Específicos | 32 |
| CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 3.1 Cultivo y proliferación celular | 33 |
| 3.2 Preparación de portaobjetos para cultivo celular y análisis por microscópica. | 33 |
| 3.3 Cultivo celular en los portaobjetos tratados. | 34 |
| 3.4 Preparación de los cultivos para análisis por Cytoviva. | 35 |
| 3.5 Análisis de los cultivos celulares por Cytoviva. | 36 |
| 3.6 Preparación de los cultivos para análisis por AFM | 36 |
| 3.7 Análisis por microscopía de fuerza atómica | 36 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 38 |
| 4.1 Prueba de proceso de fijación a cultivo primario de fibroblastos | 38 |
| 4.2 Respuesta morfológica de MDA-MB-231 frente a NPs por Cytoviva | 40 |
| 4.3 Estudios topográficos de MDA-MB-231 por AFM | 45 |
| 4.4 Aplicación de tratamientos a línea celular MG-63 | 53 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES | 58 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 6. TRABAJO A FUTURO | 59 |
| CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 60 |

ÍNDICE DE LAS FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Microscopio de fuerza atómica NX-10 de la marca Park Systems. (5) | 13 |
| Figura 2. Diagrama del funcionamiento detrás de la AFM.(6)..... | 14 |
| Figura 3. Tipos de puntas utilizadas en el escaneo con AFM. (9) | 15 |
| Figura 4. Estructura superficial de una célula de MDA-MB-231 tomada con el AFM. Fuente propia. | 17 |
| Figura 5. Estructura y composición de los fibroblastos.(25)..... | 19 |
| Figura 6. Línea celular humana MDA-MB-231 bajo microscopio óptico de Sigma Aldrich.(29)..... | 20 |
| Figura 7. Diferentes morfologías de la línea celular MG-63 analizadas bajo microscopio óptico. A) Células sembradas en portaobjetos sin recubrimiento. B) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma. C) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma con un compuesto de polímero DND1. D) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma con un compuesto de polímero DND2. (33)..... | 21 |
| Figura 8. Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) y diferentes fijadores a base de formaldehído.(36)..... | 23 |
| Figura 9. Glutaraldehído en una presentación al 50% y Bouin, el cual está compuesto de formol, ácido acético y ácido pícrico.(40) | 24 |
| Figura 10. Medios de cultivo celular más populares: DMEM y RPMI 1640 (de izquierda a derecha). (51)..... | 27 |
| Figura 11. Diagrama de la preparación de los portaobjetos y aplicación de gelatina de piel porcina. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Diagrama de cultivo celular en los portaobjetos con la aplicación de los tratamientos y su preparación para el análisis con microscopía. | 35 |
| Figura 13. Micrografías de campo oscuro Cytoviva obtenidas de fibroblastos humanos. A) Fibroblastos obtenidos con filtro de halógeno. B) Análisis con filtro de LED. C. Imágenes a mayor amplificación con filtro de halógeno. D) Mayor amplificación con filtro de LED...39 | 39 |
| Figura 14. Micrografía de Cytoviva de células MDA-MB-231 sembradas por 24h sin tratamiento. A) se observa la imagen tomada con un acercamiento de 60 ×. B) se observa un acercamiento de la zona de interés a 100 ×. | 40 |
| Figura 15. Células MDA-MB-231 evaluadas por Cytoviva con tratamientos de AsNPs por 1, 3 y 5 días en condiciones estándar de cultivo. A) y D) muestran la morfología celular a 1 día de crecimiento con tratamientos. B) y E) ilustran las células después de 3 días de tratamiento. C) y F) ilustran los fenotipos a 5 días de exposición, mostrando el daño extensivo que sufrieron las células..... | 42 |
| Figura 16. Células MDA-MB-231 con tratamientos de As/Pt-NPs por 1, 3 y 5 días de cultivo. Las micrografías A) y D) muestran el comportamiento a 1 día de crecimiento. Las imágenes B) y E) ilustran las células con 3 días de tratamiento. C) y F) muestran las morfologías celulares a 5 días de tratamiento. | 44 |
| Figura 17. Células MDA-MB-231 evaluadas por AFM con tratamientos de As/Pt-NPs a 1 día de crecimiento. Las imágenes corresponden a la orientación 2D y 3D (de izquierda a derecha), y el perfil de alturas de las muestras. Las imágenes, al igual que la línea corresponden a las alturas celulares..... | 47 |
| Figura 18. Línea celular MDA-MB-231 con tratamientos de AsPtNPs analizadas por AFM a 3 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a | |

derecha). Las imágenes, al igual que la línea correspondiente en la gráfica de alturas, están marcadas con rojo para control, verde para tratamientos con arsénico y azul para tratamientos con arsénico-platino.49

Figura 19. Línea celular MDA-MB-231 con tratamientos de AsPtNPs analizadas con AFM a 5 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha). Las imágenes, al igual que la línea correspondiente en la gráfica de alturas, están marcadas con rojo para control, verde para tratamientos con arsénico y azul para tratamientos con arsénico-platino.51

Figura 20. Gráficas de valores de Ra para las muestras, organizadas de acuerdo con el número de días de tratamiento. Las barras muestran la desviación estándar (DE) de la media.52

Figura 21. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 1 día de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).53

Figura 22. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 3 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).55

Figura 23. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 5 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).56

Figura 24. Gráficas de valores de Ra para las muestras experimentales, organizadas de acuerdo con el número de días de tratamiento. Las barras muestran la DE de la media.57

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El AFM es un microscopio que se especializa en el análisis topográfico de tres dimensiones con una alta resolución atómica para medir la rugosidad de diferentes superficies. Su técnica se basa en la interacción entre una punta y los átomos de la superficie de la muestra. El funcionamiento del AFM consiste en dicha punta con acabado manipulado de forma específica por un cantiléver que “barre” la superficie de la muestra, ya sea de manera horizontal o vertical, e interactúa con la superficie para detectar los cambios en la altura. El cantiléver cuenta con un láser conectado que se desvía de acuerdo con el movimiento de la punta. Estas desviaciones del láser son captadas por fotodiodos, los cuales son una pieza clave del ciclo de retroalimentación que utiliza dicha señal del láser para controlar la fuerza aplicada por la punta a la superficie de la muestra. Gracias a esta retroalimentación, la fuerza aplicada por la punta se mantiene constante sin importar los cambios en la altura de la superficie. Esto permite al AFM analizar la muestra sin dañarla, haciéndolo un método de análisis nanométrico no destructivo. Uno de los requisitos principales para el análisis con el AFM es que la superficie de la muestra debe de estar firmemente anclada para que la punta no sea capaz de desplazar los componentes. Por ello, cuando se analizan muestras celulares, los fibroblastos o células epiteliales son fácilmente analizados en portaobjetos gracias a su buena capacidad de adherencia. (1–4)



Figura 1. Microscopio de fuerza atómica NX-10 de la marca Park Systems. (5)

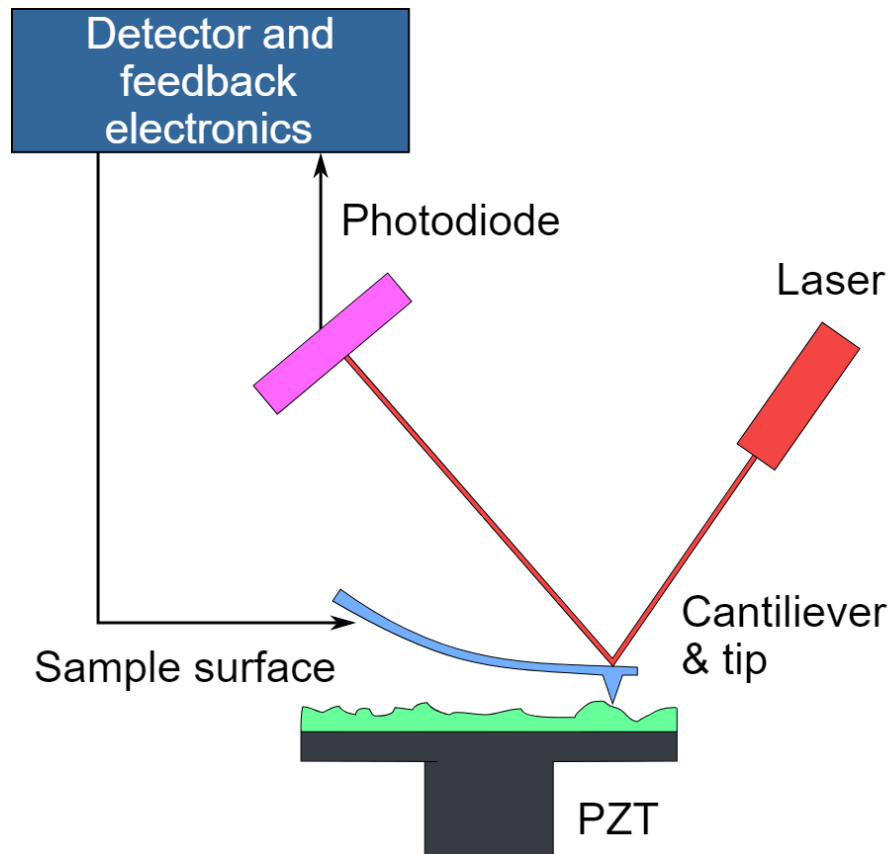


Figura 2. Diagrama del funcionamiento detrás de la AFM.(6)

El cantiléver es una de las herramientas más importantes cuando se utiliza en el AFM para analizar muestras celulares. Los parámetros relacionados a la punta del cantiléver tales como la dureza, la forma, la frecuencia de escaneo, la fuerza de escaneo, hasta la ubicación de escaneo, son de suma importancia para no dañar la muestra y obtener los mejores resultados. La forma de la punta del cantiléver puede dictar la durabilidad de la muestra que se va a analizar. Se ha comprobado que las puntas con forma piramidal, o puntas filosas, no tienen efectos negativos sobre la muestra después de un largo periodo de análisis. Además, los valores de dureza de las células pueden ser medidos con puntas filosas o esféricas sin una gran variación en los resultados obtenidos. La ventaja de utilizar este tipo de puntas es que se pueden realizar mapeos de alta resolución de la topografía de las células con propiedades

mecánicas y de adhesión celular localizadas, sin la necesidad de cambiar puntas a medio experimento. (7,8)

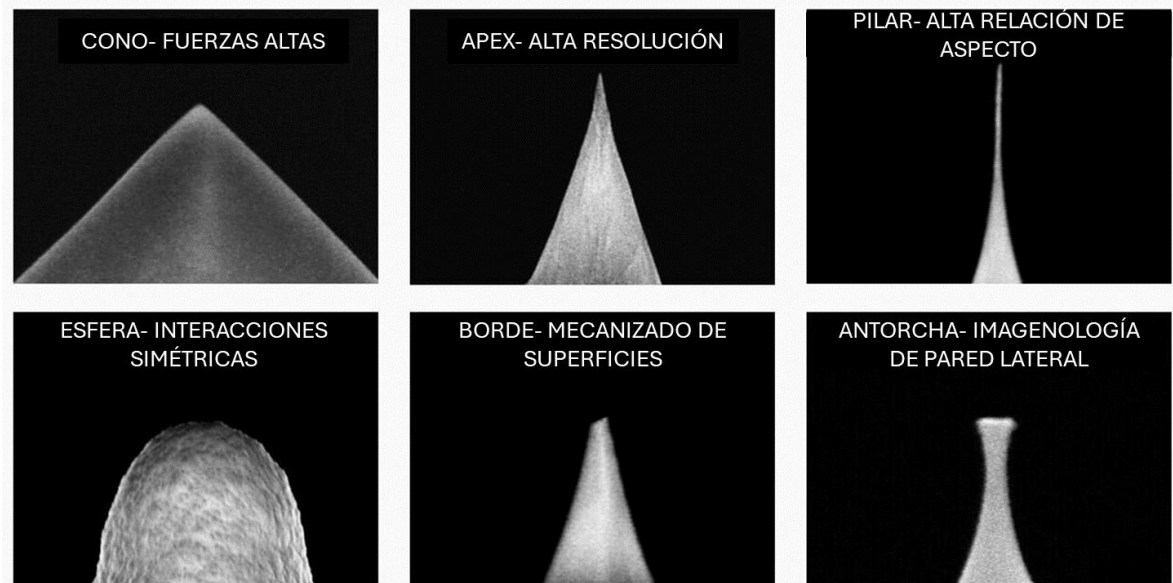


Figura 3. Tipos de puntas utilizadas en el escaneo con AFM. (9)

Es recomendado utilizar fuerza y velocidad de escaneo baja, junto con una punta no oxidativa, para analizar células. Esto permite no dañar la membrana celular y mantiene las muestras viables por días después de horas de escaneo.(1,7) Debido a la capacidad de analizar muestras en condiciones fisiológicas, el AFM es una gran herramienta para investigar la estructura superficial de muestras biológicas de células fijadas o vivas. El AFM permite analizar las interacciones entre células, vivas o muertas, con las superficies en las que se encuentran con una resolución en la escala nanométrica o inclusive angstroms. Esta microscopía también puede ser utilizada para encontrar otros importantes parámetros tales como fuerza de fricción, fuerzas de adhesión, propiedades viscoelásticas, módulo de Young, entre otras.

El AFM puede analizar muestras de diferentes materiales tales como polímeros, moléculas adsorbidas, fibras, delgadas películas y hasta polvos que se encuentran en ambientes controlados o en medio líquido. El AFM puede ser utilizado para investigar la biocompatibilidad de ciertos biomateriales. Por ejemplo, al probar las capacidades de adhesión a ciertas superficies por parte de los osteoblastos, es posible disminuir el porcentaje de rechazo de los implantes dentales. Unos ejemplos de usos del AFM en la nanomanipulación son la extracción de ADN para análisis genético, la modulación de las conformaciones proteicas y la interrupción de los enlaces entre los anticuerpos y antígenos. Esto ha permitido que esta herramienta sea utilizada en una amplia variedad de áreas de estudio tales como biología celular, prótesis dentales y ortopédicas, endoprótesis, terapias dentales y médicas, y pruebas de biocompatibilidad. (1,10–13)

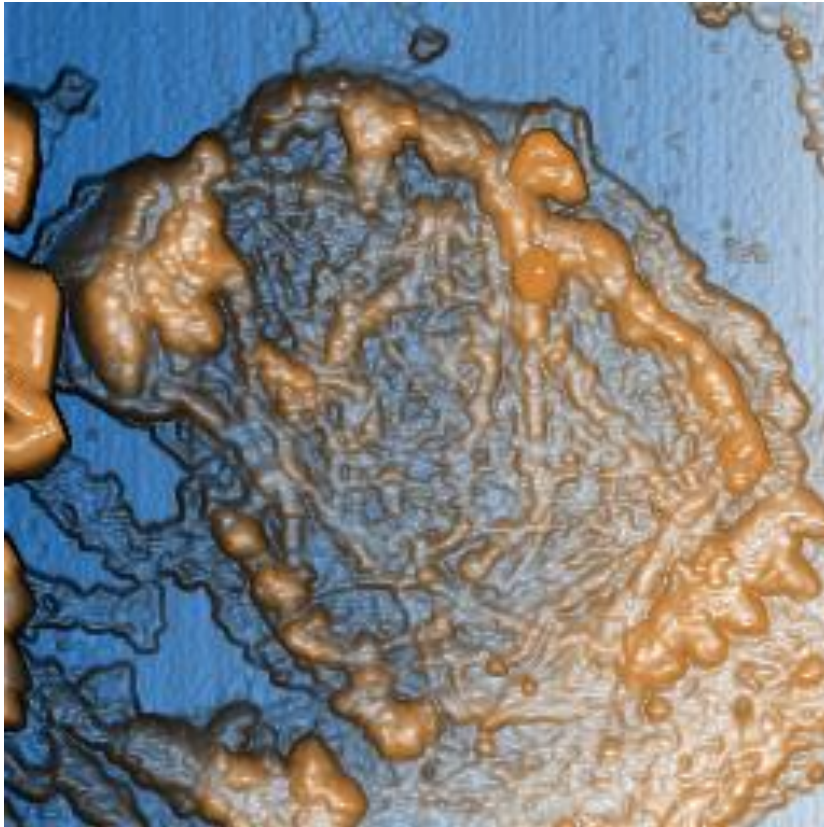


Figura 4. Estructura superficial de una célula de MDA-MB-231 tomada con el AFM.

Fuente propia.

El AFM ofrece la capacidad de analizar y observar características y componentes de la superficie celular tales como estructuras asociadas a la membrana celular, receptores, vesículas recubiertas, uniones celulares y agregaciones moleculares. Esta herramienta también ofrece la capacidad de manipular a un nivel nanométrico las muestras celulares, medir fuerzas y sus interacciones, medir dureza y elasticidad y otros aspectos de la membrana celular y el citoesqueleto. Uno de los mayores avances relacionados al uso del AFM en el campo biológico es la capacidad de detectar los cambios en las propiedades elásticas de las células epiteliales humanas. Ha sido comprobado que la elasticidad de las células está directamente ligada al envejecimiento de estas. Fue demostrado que la elasticidad incrementa

su valor de dos a cuatro veces cuando se comparan células jóvenes y células envejecidas. Uno de los mayores retos, en el cual se ha avanzado muy poco en los últimos 20 años, es la preparación de las muestras. Esto se debe a que, sin importar los cambios y avances constantes en el área de AFM para aplicación biológica, las condiciones de sembrado y mantenimiento celular siempre requerirán los mismos elementos. (14–20)

Una gran ventaja de los modelos de cultivos celulares es la reducción de los experimentos en animales y la alta precisión que ofrecen para la investigación en agentes citotóxicos y mecanismos de acción molecular. (21) Por lo que, para los experimentos realizados en este proyecto, se utilizaron tres líneas celulares diferentes. Es interesante mencionar que los fibroblastos son células no vasculares, no epiteliales y no inflamatorias del tejido conectivo. Las funciones más importantes de los fibroblastos son la deposición de la matriz extracelular, la regulación de la diferenciación epitelial, el control de la inflamación y la curación de heridas. También, se ha reportado que los fibroblastos están asociados en la progresión y proliferación de diferentes tipos de células cancerígenas. Además, la producción de los factores de crecimiento, quimiocinas y matriz extracelular facilita el reclutamiento, organización y proliferación angiogénica de las células endoteliales.(22–24)

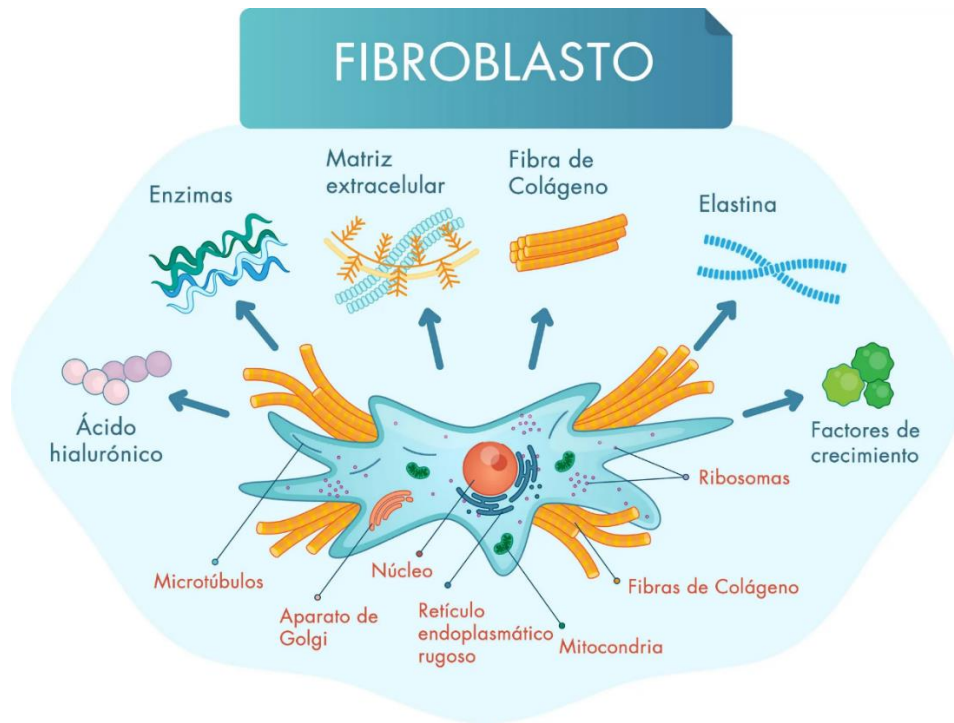


Figura 5. Estructura y composición de los fibroblastos.(25)

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 es una línea de resistente al estrógeno originaria de un cultivo primario de una paciente con carcinoma de mama. Esta línea celular es de gran interés para el estudio farmacéutico debido a que el cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres en el continente americano, y la segunda causa de muerte relacionada al cáncer en Estados Unidos. (26–28)

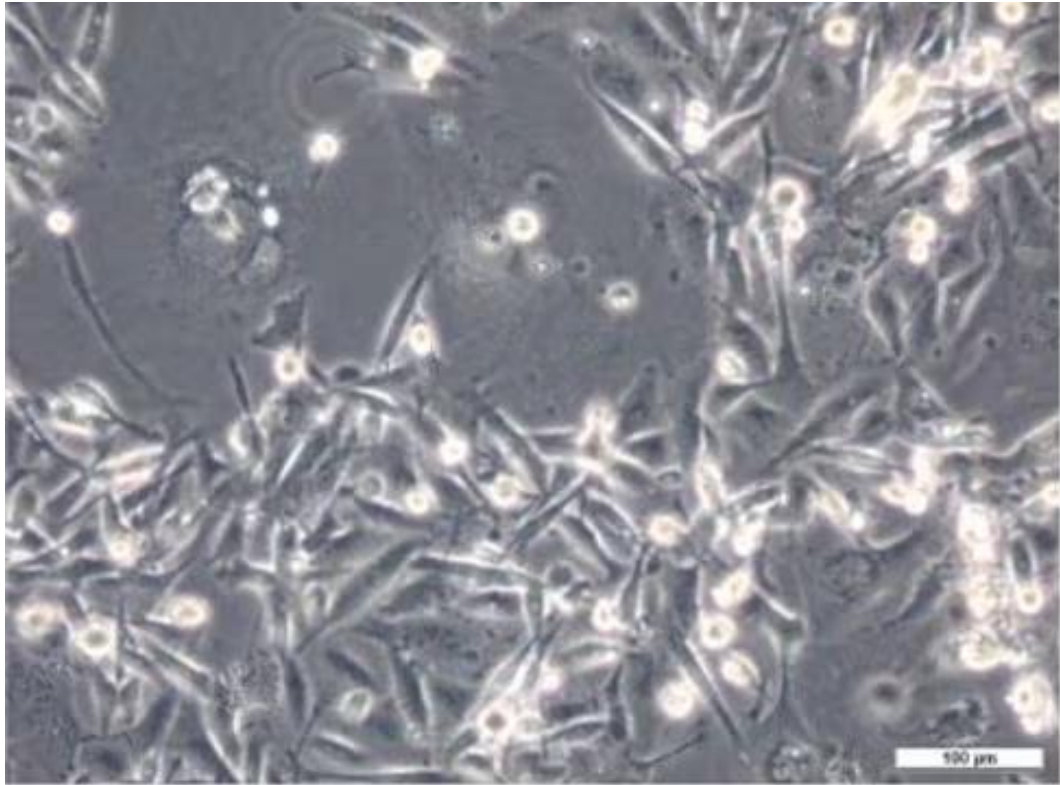


Figura 6. Línea celular humana MDA-MB-231 bajo microscopio óptico de Sigma Aldrich.(29)

Por otra parte, la línea celular MG-63, originalmente aislada de un cultivo primario de osteosarcoma humano, es comúnmente utilizada para la evaluación de los efectos de las diferentes topografías de superficie en los implantes. Esto se debe a que, a pesar de ser una línea celular cancerígena que se reproduce más rápido de lo normal, las células MG-63 exhiben muchas de las características de los osteoblastos. (21,30–32)

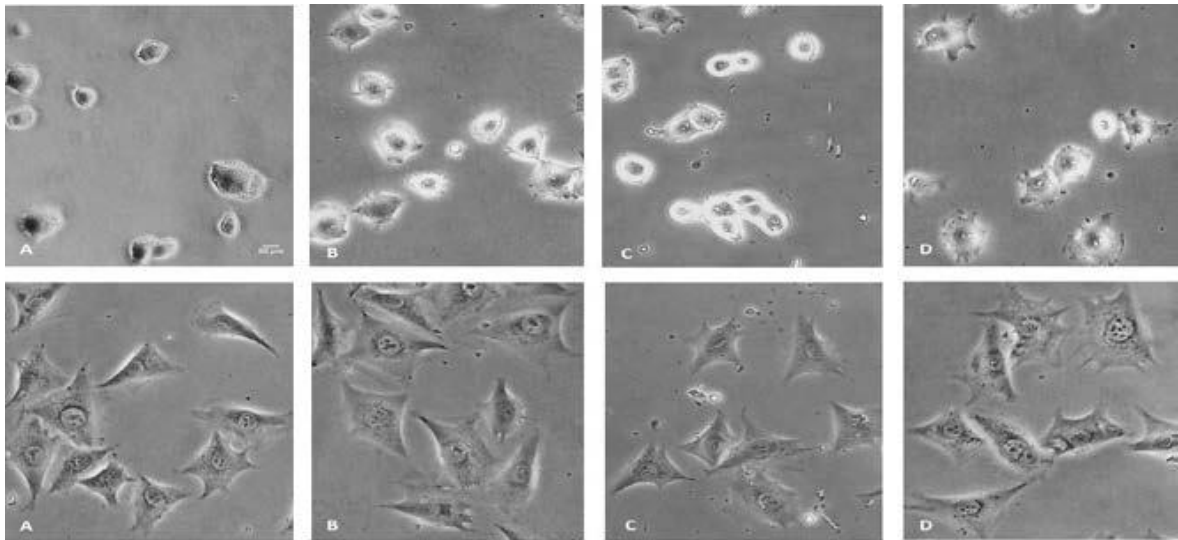


Figura 7. Diferentes morfologías de la línea celular MG-63 analizadas bajo microscopio óptico. A) Células sembradas en portaobjetos sin recubrimiento. B) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma. C) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma con un compuesto de polímero DND1. D) Células sembradas en recubrimientos de hexametildisiloxano polimerizado en plasma con un compuesto de polímero DND2. (33)

Para poder obtener la mejor calidad de lectura posible y conservar las propiedades celulares originales, es necesario mantener las muestras biológicas lo más parecidas a su estado vivo. Por ello, existen protocolos de fijación que permiten inactivar todos los procesos bioquímicos y proteolíticos de las células e inmovilizarlas en una superficie. Existen dos tipos de fijación, la química y la física. La fijación química consiste en aplicar un químico fijador que mata las células pero que también estabiliza todos sus componentes. La fijación física consiste en utilizar energía de microondas y criopreservación para rápidamente inactivar los procesos celulares. Además, existen diferentes tipos de fijadores químicos utilizados en investigación biomédica. Los más comúnmente aplicados son el etanol,

formaldehído y glutaraldehído. Por ejemplo, el etanol desnatura las proteínas y las reemplaza con agua en el tejido. Este fijador, al igual que el metanol, funcionan como solventes deshidratantes. En el caso del formaldehído es diferente, ya que recae en su peso molecular de 30 g/mol y su pequeño tamaño para penetrar los tejidos. Una vez dentro del tejido celular, su grupo aldehído forma puentes de metileno con los grupos amino de las proteínas. Este proceso es lento, lo cual requiere que una fijación con formaldehído tenga, o un tiempo de fijación extenso, o un segundo fijador tal como es el etanol. El glutaraldehído tiene la misma función que el formaldehído, formar puentes de metileno con las proteínas. Sin embargo, los dos grupos aldehído forman grupos metileno dentro de la molécula de glutaraldehído y esto facilita la formación de esos puentes con las proteínas, así eliminando el largo tiempo de fijación. Los cambios morfológicos y modificaciones que se han observado en las células al realizar fijación con formaldehído dependen de la concentración del fijador y del tiempo de fijación. Crawford y Barer, observaron que, al usar 5% de formaldehído, las células tienden a encogerse, a expandirse, a hincharse y a encogerse nuevamente. Al utilizar la misma concentración, también observaron la formación de burbujas provenientes de las células. De igual manera, con los cambios morfológicos ya mencionados, el núcleo celular también sufrió cambios similares, pero no de una manera tan acelerada. Por último, también reportan la formación de gránulos en el citoplasma que asemejan vacuolas al utilizar formaldehído altamente concentrados. (34,35)



Figura 8. Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) y diferentes fijadores a base de formaldehído.(36)

El paraformaldehído es una forma polimerizada del formaldehído que se disocia a 60 °C y pH neutral. Este es utilizado mayormente para la mayoría de los procedimientos inmunoquímicos. El paraformaldehído ha sido utilizado para la fijación de muestras biológicas con el propósito de realizar análisis de microscopía óptica. Para ello, existe un protocolo conocido donde se indica que la concentración ideal de paraformaldehído en la fijación debe de ser por lo general del 4%. Este compuesto crea enlaces covalentes entre las moléculas, creando un efecto de pegado entre ellas que forma una malla insoluble que altera las propiedades mecánicas de la superficie de las células. Para comprobar la relación entre la concentración de paraformaldehído y estas propiedades de la superficie de las células, se han realizado análisis del módulo de elasticidad con el AFM en diferentes rangos de concentración de paraformaldehído. Se encontraron que a una concentración menor 1%, los

valores del módulo de elasticidad permanecieron constantes, sin embargo, al incrementar la concentración, notaron que en 4% los valores cambiaron drásticamente, indicando que las células estaban siendo fijadas. En concentraciones mayores al 4% no hubo ningún cambio, por lo que determinaron que 4% es la concentración ideal para la fijación. Existen otros fijadores que se usan comúnmente, como lo es el tetróxido de osmio, permanganato de potasio y acetona fría. El primero tiene la ventaja de mantener las estructuras citoplasmáticas casi idénticas a una célula viva, sin embargo, el núcleo se vuelve opaco y pierde su contraste, lo que hace difícil su apreciación en los microscopios. El permanganato de potasio crea una capa opaca, pero una vez que se realizan lavados con agua destilada, es posible observar un efecto similar en el núcleo al igual que con el tetróxido de osmio. La acetona fría crea gránulos dentro del citoplasma lo cual genera un tono grisáceo. (37–39)



Figura 9. Glutaraldehído en una presentación al 50% y Bouin, el cual está compuesto de formol, ácido acético y ácido pícrico.(40)

En cuanto a fijaciones de microorganismos bacterianos se trata, los cinco fijadores más comunes son el glutaraldehído, formaldehído, paraformaldehído, metanol con acetona y etanol con ácido acético. En un estudio reciente, Chao et al. utilizaron 3 bacterias diferentes, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas putida* (*P. putida*) y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), para probar cual fijador era el más efectivo tomando en cuenta la preservación morfológica de la bacteria. Encontraron que aquellos con grupos aldehídos son los más efectivos, ya que el metanol y el etanol alteraban los filamentos de la superficie. Por ello, el glutaraldehído, a una concentración del 2.5%, es considerado como el fijador más eficiente para preservar la morfología bacteriana. También, es importante resaltar que la altura promedio de las células es mayor cuando son fijadas con glutaraldehído que sin fijación. Sin embargo, el incremento de altura gracias al glutaraldehído varía entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram negativas, en promedio, incrementan su altura en un 84%, mientras que las Gram positivas solo en un 38%. Asimismo, las técnicas de microscopía electrónica han sido utilizadas exitosamente para analizar las superficies microbianas, sin embargo, carecen de la importante función de analizar en soluciones acuosas. Por ello, el AFM, con su capacidad de la estructura y morfología celular en soluciones acuosas, se convirtió en la herramienta preferida en el área. (41–43)

Las células vivas tienen generalmente menor resolución comparadas con las células fijadas. Braet et al. comprobaron que es posible observar el conjunto de poros de la fenestra de las células endoteliales de hígado en células fijadas, pero en células vivas es imposible. Esto se puede atribuir, junto con la baja resolución, a la diferencia en la dureza de las muestras. Las células que son químicamente fijadas cuentan con módulo de Young más alto que aquellas que son inmovilizadas por otros tipos de procedimiento. Una ventaja que tienen

las células fijadas es que el módulo de elasticidad no sufre cambios significantes al analizar la muestra el día que se realiza la fijación contra 30 días después de la misma. Lo cual indica que la fijación (con paraformaldehído) preserva de excelente manera las muestras y permite su análisis mucho tiempo después de su preparación sin sufrir fuertes alteraciones en los valores obtenidos. (44–47)

La manera tradicional de analizar las propiedades y comportamientos celulares es utilizando medio de cultivo para su crecimiento. Sin embargo, hasta hace unos años, no se contaba con una herramienta que permitiera analizar a fondo el funcionamiento del medio de cultivo y sus cualidades que fomentan el crecimiento celular. Ahora, con el uso del AFM, es posible observar a nivel nanométrico el mecanismo de acción de estos medios de cultivo. Al aplicar el medio de cultivo a los portaobjetos se forman nanogránulos que fomentan el crecimiento celular. En un estudio, mediante análisis de fluorescencia lograron comprobar que las proteínas del suero bovino fetal se encuentran en estos gránulos, así demostrando que los depósitos proteicos en los nanogránulos fomentan el anclaje de las células y por ende su crecimiento. (48–50)



Figura 10. Medios de cultivo celular más populares: DMEM y RPMI 1640 (de izquierda a derecha). (51)

Existen sustratos que se adicionan a la siembra de las células con medio de cultivo para mejorar el crecimiento, la diferenciación, la migración y la difusión. Unos de los más comunes son las gelatinas, los cuales han sido demostrados como grandes ayudantes al proceso de anclaje celular a las superficies en las que se encuentran. (52)

El AFM cuenta con la capacidad de analizar las muestras en diferentes tipos de modos, que se catalogan por su interacción con la muestra. El modo de contacto es considerado el mejor gracias a su alta resolución, pero presenta limitaciones tales como la necesidad de formar las imágenes a bajos niveles de fuerza y baja velocidad de escaneo, lo que requiere de mayor tiempo de análisis por muestra. (45,53,54)

La rugosidad de la superficie de la membrana celular es un buen indicador del estado de las células debido a que está involucrada en múltiples mecanismos tales como la motilidad, adhesión e interacción intracelular. Los valores de rugosidad de la membrana celular son dependientes de la escala en la que se analiza. Este valor depende en los parámetros de medición tales como el área de escaneo y tamaño de escalón. Recientemente, con el uso del AFM se comprobó que la rugosidad de un linfocito incrementa cuando se induce el proceso de apoptosis. (55–57) Además, el AFM es una herramienta que ha ganado popularidad en los últimos años en el estudio de muestras biológicas. Sin embargo, ha marcado un antes y un después en la investigación contra el cáncer y el estudio de la patología tumoral. Gracias a varios estudios, ha sido comprobado que las propiedades elásticas de las células cancerígenas afectan en el proceso de la metástasis. Esto se debe a que las células cancerígenas formadoras de metástasis cuentan con diferentes propiedades elásticas que las hacen capaces de sobrevivir el flujo sanguíneo durante el proceso de la metástasis. Ha sido comprobado que las células benignas son 70% más duras que las células cancerígenas, lo cual podría explicar la capacidad de estas células de crear metástasis. Sin embargo, la capacidad para poder analizar estas líneas celulares cancerígenas en modelos tumorales requiere de tratamientos especiales. Actualmente, la caracterización de los modelos tumorales en 3D de la línea celular cancerígena, tal como MDA-MB-231, no han sido ampliamente explorados debido a su dificultad de cultivo y mantenimiento. (58–60)

La microscopía de campo oscuro es una técnica que utiliza la dispersión de la luz que se genera de una muestra entrando al objetivo la cual forma la imagen, mientras que la luz incidente es bloqueada. Con el continuo crecimiento de la nanotecnología, es indispensable contar con las herramientas necesarias para el análisis y obtención de imágenes con alto nivel

de precisión. Anteriormente, ya era posible obtener el tamaño, la morfología y la composición de las muestras, sin embargo, con la microscopía de campo oscuro, es ahora posible obtener imágenes de las nanoestructuras en su estado nativo, con preparaciones muy sencillas y de bajo costo. (61–65)

Uno de los usos más importantes de la microscopía de campo oscuro es en el área de imagenología que sustituye el uso de colorantes. Al usar colorantes, las células se ven alteradas por moléculas externas que inevitablemente arrojarán resultados diferentes a un análisis de células vivas. Por ello, al combinar una técnica como lo es la microscopía de campo oscuro con diferentes tipos de fijación, es posible obtener mejores imágenes que con protocolos de tinción. Ha sido comprobado que esta combinación cambia la morfología celular y resalta diferentes patrones y estructuras en las células que normalmente no se podrían observar. Esto solo es posible gracias a la capacidad de la microscopía de campo oscuro de modificar el contraste y la luminosidad del muestreo. Todo esto hace que la microscopía de campo oscuro sea una técnica más barata y sencilla para identificar cambios morfológicos que otras técnicas de tinción existentes. (65,66)

Las nanopartículas (NPs) son una herramienta que se ha utilizado en los últimos años en los estudios contra el cáncer, al igual que en diferentes aplicaciones en el campo farmacéutico y biotecnológico debido a sus peculiares propiedades físicas y químicas. Las NPs se utilizan para la administración dirigida de fármacos en tratamientos como quimioterapias, terapias fotodinámicas e inmunoterapias. Las NPs pueden ser desarrolladas de manera que puedan suministrar, mediante la administración dirigida de fármacos, una combinación de medicamentos, lo cual incrementa la eficacia y minimiza los efectos secundarios de cada medicamento individualmente. No solo las NPs, si no que toda el área de los nanomateriales

tiene un rol muy importante en el diagnóstico del cáncer y su tratamiento. Estos estudios no han sido probados clínicamente, sin embargo, las NPs tienen la capacidad de minimizar el tamaño del tumor sin interactuar con otros tejidos sensibles. (67–70)

Actualmente, existen diferentes tipos de preparaciones de NPs, sin embargo, estos métodos usualmente son muy costosos y dañinos para el ambiente. Es por eso por lo que la nanotecnología verde ha ganado importancia debido a que elimina los agentes dañinos y permite la síntesis de las NPs de una manera amigable para el medio ambiente. (71,72)

En este sentido, el AFM ha sido utilizado para verificar los cambios morfológicos que sufren las células cancerígenas al ser expuestas a tratamientos con NPs. Un estudio sugirió que el uso de NPs de selenio modifica la morfología superficial y reduce el tamaño de las células epiteliales de útero con adenocarcinoma HeLa. Otro uso de la microscopía de campo oscuro es la imagenología de NPs en el interior de la célula. Es importante resaltar que la aplicación de esta novedosa y versátil técnica permite localizar la presencia de NPs que principalmente emiten un plasmón de resonancia, gracias a la integración del sistema hiperespectral al microscopio de campo oscuro. De esta forma, el sistema permite poder realizar escaneos dentro del rango ultravioleta al visible (UV-Vis) y generar imágenes representativas con espectros UV-Vis por pixel de imagen. Por otra parte, cuando se intenta detectar NPs metálicas interactuando con microorganismos, tales como *Candida albicans*, con microscopías como SEM, se dificulta el análisis debido a los residuos que se alojan en las muestras provocados por los microorganismos o por los fijadores. Por ello, la microscopía de campo oscuro con sistema hiperespectral (Cytoviva) se vuelve una gran herramienta gracias a que es capaz de detectar la luz resonante de las NPs e ignorar los residuos antes mencionados. Dentro de las NPs más utilizadas son las de NPs de plata. Estas son

comúnmente usadas como agentes desinfectantes y antimicrobianos, sin embargo, su uso contra los tumores no ha sido propiamente explorado. Además, estas NPs fueron evaluadas contra la línea celular MDA-MB-231 y se comprobó que, dependiendo de la concentración, pueden inhibir la proliferación de estas células cancerígenas. (65,66,73–76)

No existe una técnica que elimine por completo las imperfecciones de los portaobjetos, sin embargo, existen pasos que se pueden tomar para mejorar la calidad de imagen tomada. Macnab utiliza un limpiador espumoso que aplican durante unos segundos antes de ser limpiado con un pañuelo no rugoso, lo cual comprobó ser tan efectivo como la limpieza con ácidos. (77)

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El uso del AFM y Cytoviva permite identificar la eficacia de los tratamientos con NPs en la reducción del tamaño y alteración celular en líneas celulares mamíferas y bacterianas mediante la identificación de cambios fenotípicos tales como la forma, rugosidad y altura de las células.

2.2 Objetivo General

Diseñar protocolos de obtención de imágenes de alta calidad con AFM y Cytoviva para la caracterización de cambios fenotípicos estimulados por la aplicación de tratamientos nanoestructurados en líneas celulares mamíferas.

2.3 Objetivos Específicos

- Implementar el uso de aditamentos a los protocolos existentes que funcionen como andamios para mejorar el anclaje de las células a portaobjetos para microscopia.
- Integrar protocolos de limpieza a los portaobjetos y cubreobjetos para disminuir los residuos celulares, de los reactivos y así obtener mejor calidad de imagen.
- Utilizar herramientas de análisis estadístico para encontrar patrones en los datos obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica y así determinar posibles cambios fenotípicos.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y proliferación celular.

Inicialmente, se descongelaron los viales criogenizados de cultivos primarios de fibroblastos, de la línea MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, células epiteliales de adenocarcinoma), y la línea MG-63 (CRL-1427, fibroblastos de osteosarcoma). Cada criovial se mantuvo a temperatura ambiente hasta observar la suspensión con las células completamente líquida. A continuación, se sembró la solución completa en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, ThermoFisher Scientific, USA) con 20% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiótico con antimicótico de uso comercial (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA). Posteriormente, se incubó a 37 °C, en ambiente de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa hasta observar el 85% de confluencia. Después, las células fueron resembradas aplicando técnicas estándar de tripsinización y subcultivadas en múltiples cajas de cultivo celular de 100 mm (Corning, USA) con DMEM completo (10% SBF, 1% antibiótico). Estas resiembras fueron monitoreadas cada 24 horas con recambios de medio cada 72 horas, hasta alcanzar confluencia en cada caja.

3.2 Preparación de portaobjetos para cultivo celular y análisis por microscópica.

Inicialmente, para el acondicionamiento de los portaobjetos y cubreobjetos se lavaron a chorro con agua destilada, etanol y se sumergen en ácido nítrico 5% v/v por 24 horas. Posteriormente, se lavaron con agua destilada en baño ultrasónico por 15 minutos, se enjuagaron nuevamente con etanol se secaron por 24 horas. Después, se esterilizaron bajo condiciones de autoclave húmeda y se secaron a 85°C por 15 min. Por otra parte, se preparó una solución de gelatina 0.5% w/v (9000-70-8, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y se colocó 1 mL a cada portaobjetos previamente tratado y se incubaron por 2 horas a

temperatura ambiente en el interior de una campana de flujo laminar. Se retira la solución y se lava tres veces por 5 minutos con PBS 1×. Finalmente, se almacenan en condiciones estériles dentro de cajas de Petri, se colocan a secar a temperatura ambiente y se guardan a 4°C hasta su uso (Figura 11).

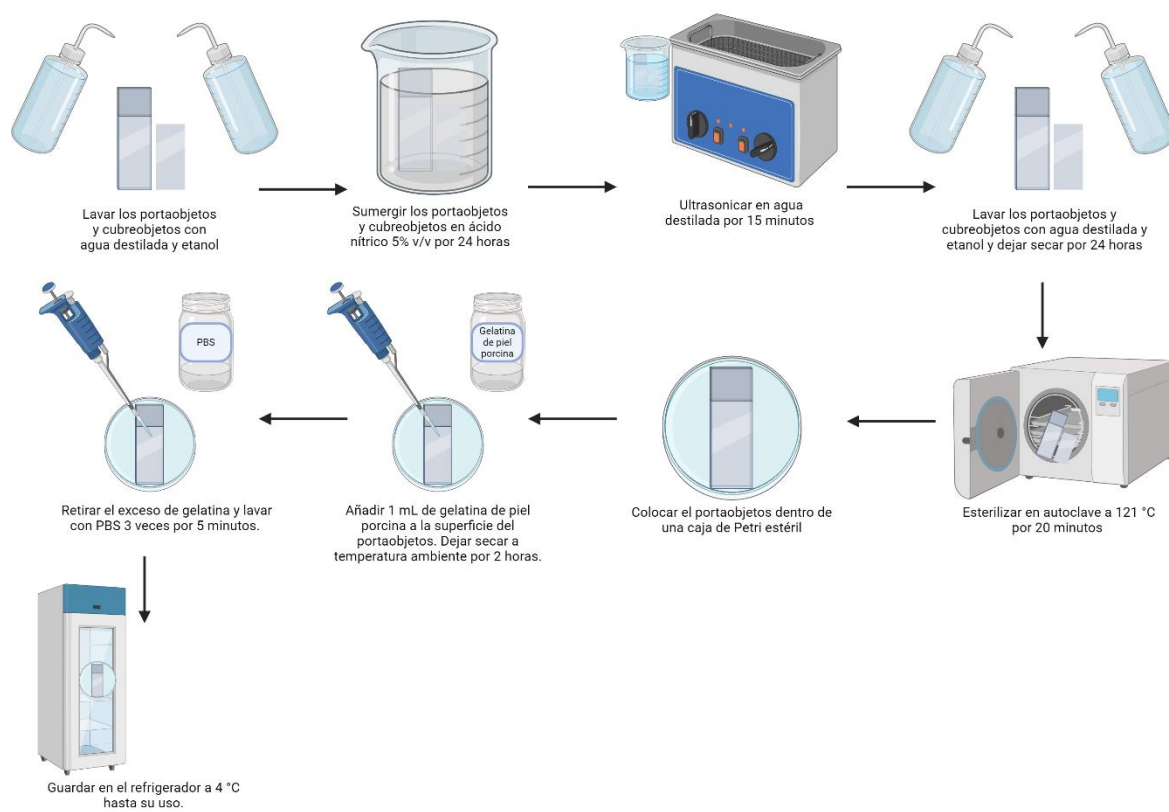


Figura 11. Diagrama de la preparación de los portaobjetos y aplicación de gelatina de piel porcina.

3.3 Cultivo celular en los portaobjetos tratados.

Con el objetivo de realizar las siembras de cada una de las líneas celulares para sus respectivos tratamientos y análisis microscópicos, se utilizaron cultivos que se encontrara en 80% de confluencia y entre pasajes 2 y 16. Inicialmente, se colocó 1 mL de DMEM completo, con 10,000 células/mL sobre cada una de las superficie de los portaobjetos tratados

(previamente en cajas de Petri de 100 mm), se incubaron por 72 horas, con cambios de medio cada 24 horas para estimular la adhesión y proliferación celular. Para el tratamiento de las nanopartículas de As y As/Pt, se lavaron los portaobjetos por 5 min con PBS y se colocó AsNPs, As/PtNPs en medio completo y se incubaron por 1, 3 y 5 días con cambios de medio cada 24h (Figura 12). Se utilizó DMEM completo como control positivo de crecimiento celular.

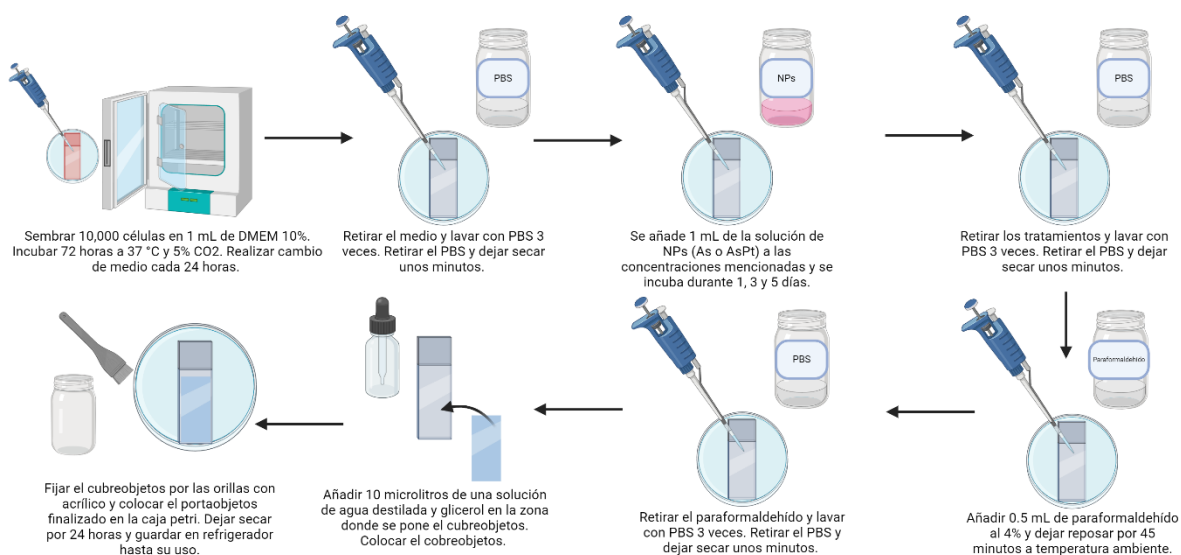


Figura 12. Diagrama de cultivo celular en los portaobjetos con la aplicación de los tratamientos y su preparación para el análisis con microscopía.

3.4 Preparación de los cultivos para análisis por Cytoviva.

Una vez concluida la incubación y los tratamientos, se lavaron los portaobjetos tres veces con PBS por 5 minutos y se fijaron en paraformaldehído (Sigma Aldrich) al 4% w/v por 45 minutos y nuevamente se lavaron tres veces con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se montaron las muestras con glicerol 50% v/v, se colocó un cubreobjetos (VWR) y las orillas del cubreobjetos se sellaron con acrílico para evitar la

deseccación. Finalmente, los portaobjetos fueron analizados en el microscopio de campo oscuro.

3.5 Análisis de los cultivos celulares por Cytoviva.

Las muestras celulares se analizaron por Cytoviva montando de forma individual los portaobjetos con los cultivos celulares previamente preparados y fijados. Se agregaron unas gotas de aceite de inmersión en el sistema Cytoviva (Cytoviva, Auburn, AL) que permite la generación del campo oscuro adaptado a un microscopio vertical Olympus BX-41. Utilizando el objetivo de $10\times$ se calibró la intensidad de la luz y se ubicaron las células para la cuantificación. Posteriormente, se realizó la toma de imágenes en áreas representativas utilizando objetivo de inmersión de alta apertura numérica ($100\times/1.30$), y un sistema de iluminación que mejora 10 veces la proporción señal-ruido. Para identificar entre compartimientos y estructuras celulares se trabajó con los filtros de imagen Halogen y Led. El sistema hiperespectral del Cytoviva permite generar de espectros Uv/Vis (400-1000 nm) por cada píxel del área escaneada, permitiendo verificar y localizar las NPs y los compartimientos celulares. (78)

3.6 Preparación de los cultivos para análisis por AFM.

Para la preparación de las muestra celulares, se lavaron los portaobjetos tres veces con PBS por 5 minutos y se fijaron en glutaraldehído (Sigma Aldrich) al 2.5% w/v a 4°C por 12 horas. Se lavaron las muestras tres veces con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se secaron las muestras en disecador.

3.7 Análisis por microscopía de fuerza atómica

Para el análisis por AFM, los sustratos se colocaron sobre un portaobjetos metálico, se posicionó en el interior del AFM (Park Systems NX10, Corea del Sur) equipado con una

caja antiacústica y una mesa antivibratoria (Thorlabs, PFR90150, USA). Los análisis se realizaron utilizando una punta PPP-NCHR con constante de fuerza de 42 N/m, frecuencia de resonancia de 330 kHz y los escaneos se realizaron en modo de no contacto (79). La velocidad de escaneo sobre las superficies celulares fue 0.1 Hz y la amplitud de 18.79×10^3 nm. El área de escaneo fue de $25 \mu\text{m}^2$. Para evaluar los cambios topográficos celulares conducidos por los tratamientos, se proporcionan los datos de Ra de cinco diferentes micrografías para cada tiempo de tratamiento y línea celular. Para el análisis de los datos se utilizó el software XEI 5.2.0 (Park Systems, Corea del Sur).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Prueba de proceso de fijación a cultivo primario de fibroblastos.

Las imágenes obtenidas mediante Cytoviva de mostraron cambios en la obtención de imágenes de mejor calidad al aplicarse los tratamientos de preparación de las laminillas, así como fijación celular, corrigiendo los resultados de acuerdo con la estandarización experimental. En la Figura 13 A, se pueden observar la morfología de fibroblastos a $60 \times$ utilizando el filtro de led y LED, mientras que en la Figura 16B se muestra la detección de las estructuras celulares con el filtro de halógeno. Es importante resaltar que se logró corregirla obtención de imágenes ya que se removieron los residuos observados en los portaobjetos nuevos sin protocolo de limpieza. Además, con el procedimiento de modificación superficial del portaobjeto con gelatina, y la se logró obtener mejor calidad de imagen y apreciar los fibroblastos. De igual forma, fue posible apreciar más con mayor precisión la delimitación de la membrana nuclear y sus periferias con respecto a la zona citoplasmática. Asimismo, a esta amplificación ($60 \times$) se logró detectar la forma característica de las vesículas fibroblastos; sin embargo, el aumento no fue suficiente para lograr definir los entornos de estas estructuras.

En la Figura 13 C y D, se observan las micrografías correspondientes las células fibroblásticas con acercamiento a $100 \times$. En este sentido, se logró resolver la morfología de las pequeñas vesículas que se forman a nivel citoplasmático y exoplasmático. Además, es interesante mencionar que la distribución de estas vesículas principalmente fue en la periferia de la membrana nuclear, sugiriendo que puedan ser vesículas de transporte intracelular. (80) Mientras que las observadas en la periferia se traten de exosomas secretados por la célula como parte de su función homeostática celular, indicativo de la funcionalidad autofagia

descrita para el mantenimiento celular. (81) También, se detectó que la deposición de partículas en la superficie del portaobjetos se disminuyó en comparación con las muestras tratadas con el protocolo de limpieza propuesto, ya que inclusive después de la deposición de gelatina, las periferias de los campos detectados no presentaron iluminación. Es importante mencionar que estas imágenes sirvieron de precursores para los experimentos realizados posteriormente, donde se incorporaron unas soluciones de NPs y estudiar el comportamiento fenotípico modulado por los tratamientos.

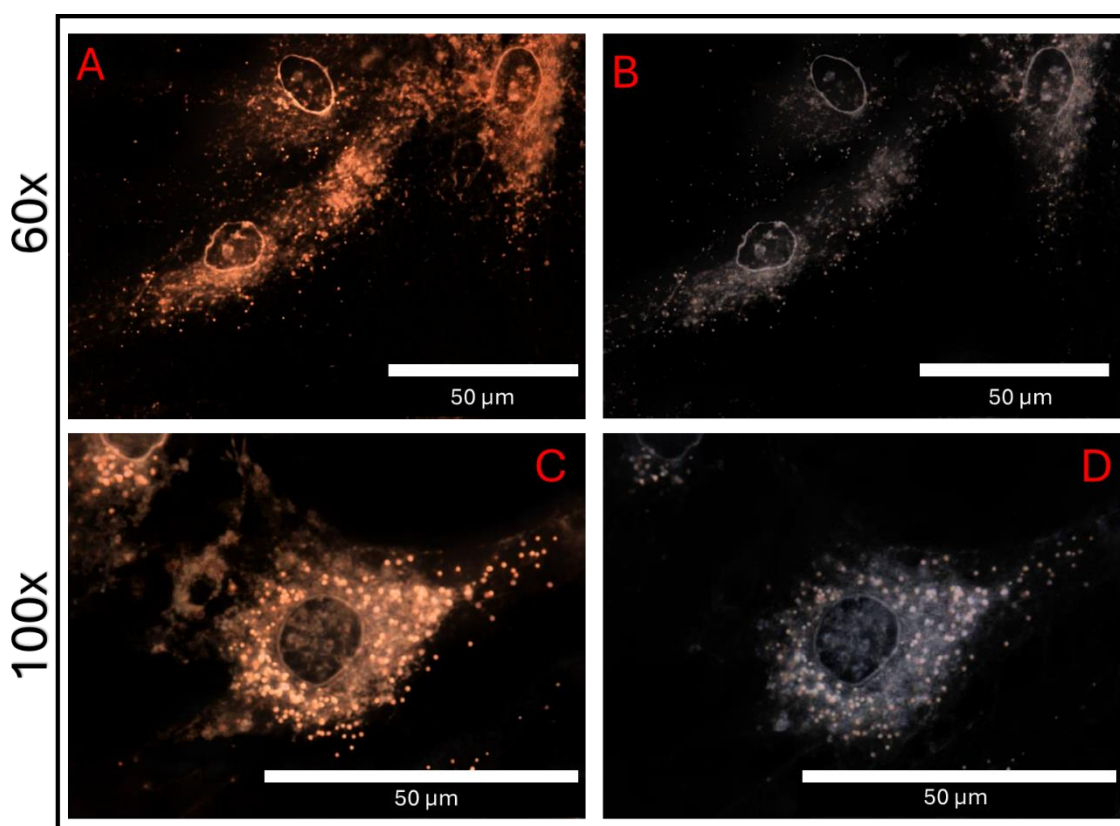


Figura 13. Micrografías de campo oscuro Cytoviva obtenidas de fibroblastos humanos. A) Fibroblastos obtenidos con filtro de halógeno. B) Análisis con filtro de LED. C. Imágenes a mayor amplificación con filtro de halógeno. D) Mayor amplificación con filtro de LED.

4.2 Respuesta morfológica de MDA-MB-231 frente a NPs por Cytoviva

Los tratamientos de NPs contra MDA-MB-231, se realizaron por 1, 3 y 5 días, utilizando un control sin tratamiento. En la Figura 14, se observa el control a 1 día de crecimiento, donde se puede apreciar la morfología de forma circular, con núcleos agrandados, la secreción de matriz extracelular y menor formación de vesicular intra- y extracelulares a comparación de la muestra de fibroblastos. Además, se puede apreciar en la Figura 14A el claro contraste entre el fondo oscuro del campo de análisis y las células, indicativo de la eficacia en la preparación de los portaobjetos y de los cultivos para evaluación microscopía. Por otra parte, la Figura 14B muestra una clara amplificación de las células, definiendo las estructuras y divisiones intranucleares que sugiere el arreglo cromosomal de las células por crecimiento celular. (27) Asimismo, se identificó la unión célula-célula a través de la matriz extracelular (ECM), sugiriendo que este tipo de células requieren de uniones estrechas, un proceso ampliamente descrito para células formadoras de monocapas. (26)

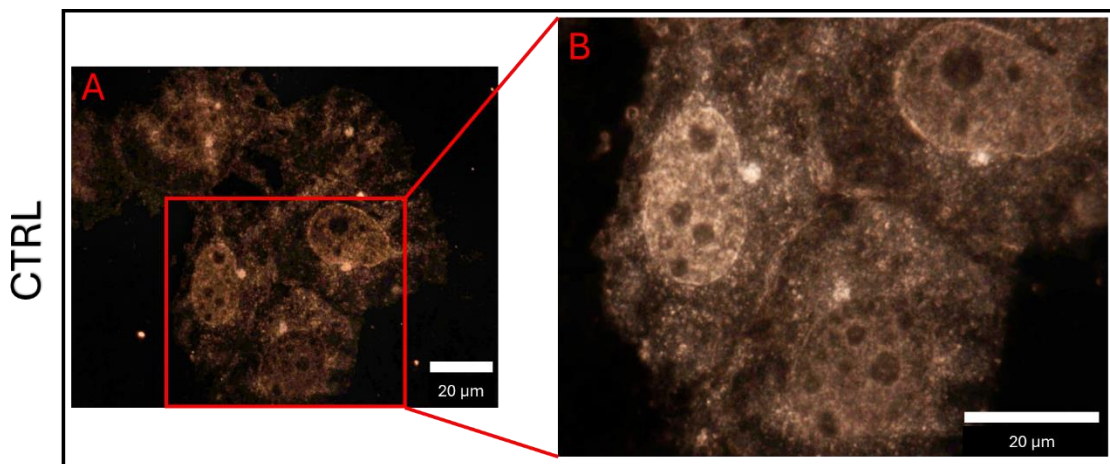


Figura 14. Micrografía de Cytoviva de células MDA-MB-231 sembradas por 24h sin tratamiento. A) se observa la imagen tomada con un acercamiento de 60 ×. B) se observa un acercamiento de la zona de interés a 100 ×.

En la Figura 15, se muestran las micrografías obtenidas como respuesta de las células a las AsNPs, mostrando un cambio fenotípico significativamente diferente al observado en el control (Figura 14). Debido a la severa respuesta que mostró el tratamiento contra las células, fue complicado lograr localizar campos para obtener imágenes que mostraran la interacción célula-célula y célula-AsNPs. Inicialmente, a las 24h de incubación (Figura 15 A y D) se detectó que las estructuras celulares se transformaron generando evidentes extensiones celulares, un excesivo número de vesículas intracelulares, extensiones citoplasmáticas muy cortas y la completa pérdida de la morfología nuclear. Estas características fenotipas son detectadas cuando las células entran en estado apoptótico y necrótico debido al contacto directo con agentes fuertemente citotóxicos. (26) Además, esta información sugiere que desde el primer día de tratamiento se genera un fuerte daño celular ya que la integridad morfológica y la membrana celular pierden por completo su definición estructuras, generando como consecuencia la falta de una morfología semiesférica y la disminución de ECM. Este importante factor está directamente involucrado en la regulación de la adhesión, migración, comunicación células-células, transporte e intercambio de nutrientes y más importante, la funcionalidad celular. (82) La Figura 15 B muestra una completa deformación de la morfología del carcinoma mamario celular y la amplificación (Figura 15E) resalta la presencia de AsNPs incrustadas en la superficie celular. Es importante resaltar que la presencia de las estructuras nucleares está completamente ausente y la morfología poligonal es un indicativo de la disminución en el tamaño celular. A los 5 días de incubación se detectó que la integridad celular se pierde por completo, ya que las imágenes de Cytoviva solo mostraron la presencia de restos celulares que pueden estar asociados a la ECM previamente adherida, el atrapamiento de las NPs con la red polimérica de ECM y restos necróticos y apoptóticos. (83,84)

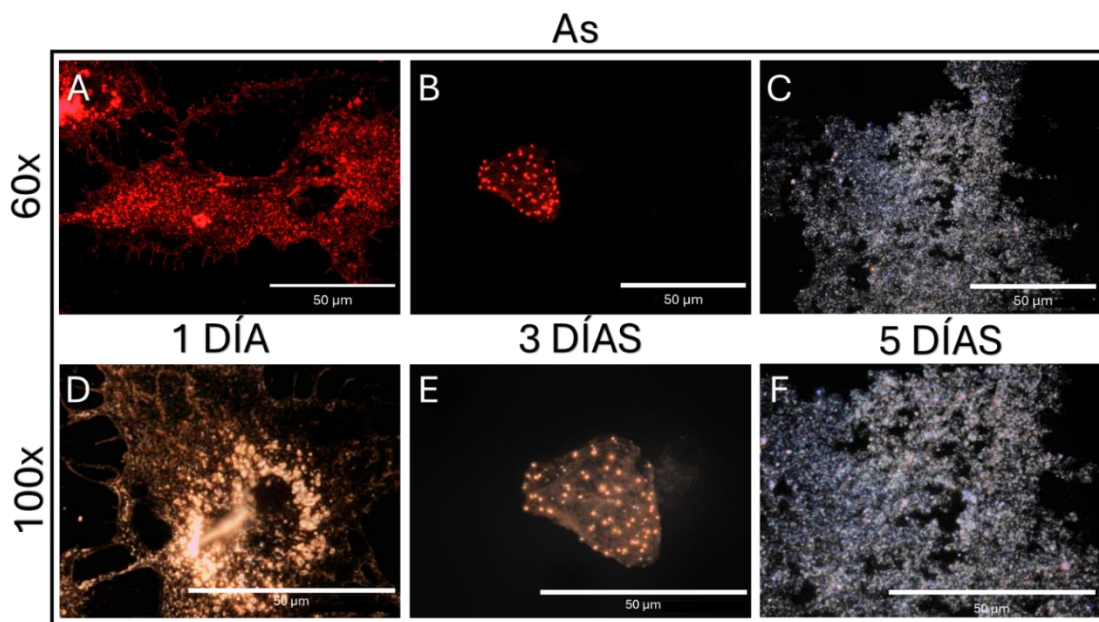


Figura 15. Células MDA-MB-231 evaluadas por Cytoviva con tratamientos de AsNPs por 1, 3 y 5 días en condiciones estándar de cultivo. A) y D) muestran la morfología celular a 1 día de crecimiento con tratamientos. B) y E) ilustran las células después de 3 días de tratamiento. C) y F) ilustran los fenotipos a 5 días de exposición, mostrando el daño extensivo que sufrieron las células.

La Figura 16 muestra el comportamiento celular bajo tratamiento con las As/Pt-NPs por 1, 3 y 5 días. Es interesante discutir que la preparación desarrollada para estos experimentos permitió analizar con mejor precisión la interacción de las NPs con los cuerpos celulares y observar el extenso daño resultante del tratamiento. La Figura 16A y D ilustran una morfología celular con configuración circular, sugiriendo el incremento en el tamaño de las estructuras vesiculares y la acumulación de estos en la periferia celular, la morfología de la célula y las nanopartículas incrustadas dentro de la pared celular. En la Figura 16 B) y E) se observa cambios que indican un mayor grado de daño celular conforme avanza el tiempo de tratamiento (3 días), caracterizando el incremento en el tamaño del núcleo, pero con

disminución del cuerpo celular. Este importante patrón fenotípico se ha reportado en cultivos de células cancerosas tratadas con agentes que inducen bloqueos en el crecimiento celular, desencadenando eventos apoptóticos que se reflejan en deformaciones celulares. (85) Por otra parte, estos descubrimientos sugieren que al inicio del tratamiento las células comienzan un proceso de “contracción” que se destaca por la adopción de una configuración circular y característica con la generación de un cuerpo celular (Figura 16D) impidiendo la observación del núcleo. Posteriormente, las células transitan a una estructura estrecha sin los patrones celulares reportados para las células “sanas” apreciándose las deformaciones nucleares y la subsecuente muerte celular detectada a los 5 días de tratamiento (Figura 16 C y F). Asimismo, no se pudo apreciar la presencia de las NPs a los 3 y 5 días, posiblemente por las alteraciones osmóticas, cambios en el espesor de membrana citoplasmática (dejo de detectarse), reducción de la ECM y cambios en la biosíntesis de organelos que pudieron evitar la acumulación de las nanoestructuras. (86) Por lo que se recomienda realizar estudios ómicos para elucidar las posibles vías de señalización involucradas.

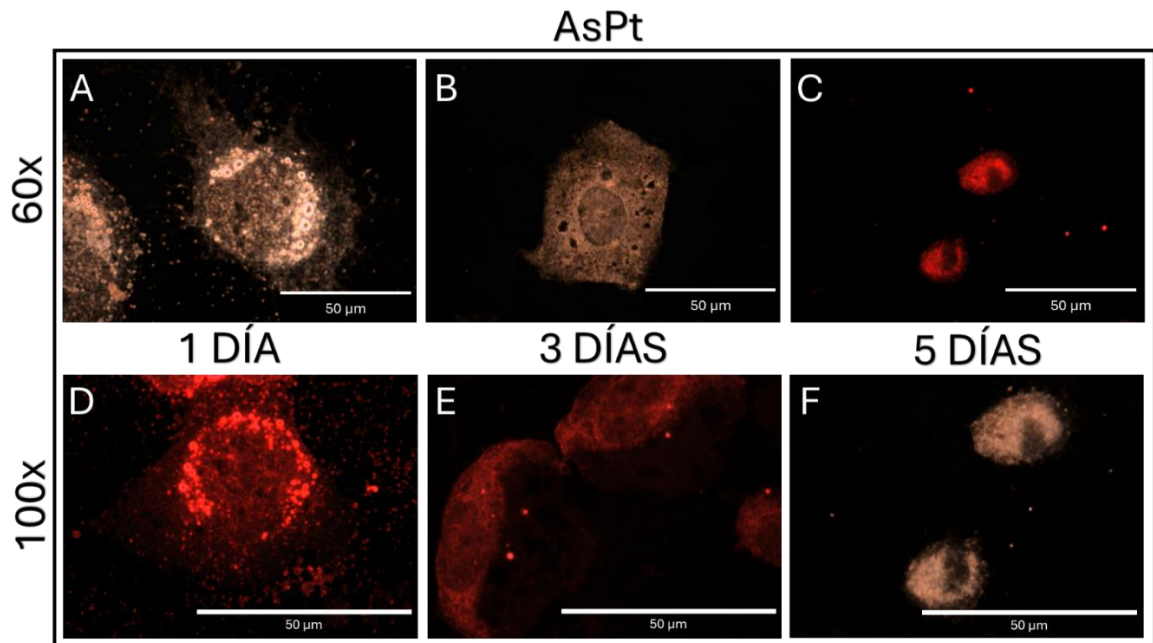


Figura 16. Células MDA-MB-231 con tratamientos de As/Pt-NPs por 1, 3 y 5 días de cultivo. Las micrografías A) y D) muestran el comportamiento a 1 día de crecimiento. Las imágenes B) y E) ilustran las células con 3 días de tratamiento. C) y F) muestran las morfologías celulares a 5 días de tratamiento.

4.3 Estudios topográficos de MDA-MB-231 por AFM

El proceso de apoptosis de las células cancerígenas ha sido asociado con cambios en las propiedades celulares tales como la morfología, rugosidad y dureza. Se reportó que al aplicarse un tratamiento anticancerígeno a la línea celular de HeLa, por ejemplo, el paclitaxel, se puede observar daño a la membrana celular y, por ende, un incremento en la rugosidad y una disminución en la dureza (85). Las células no tratadas mostraron una forma celular bien trazada con un núcleo localizado en el centro. Posterior a los tratamientos, las células muestran agregación y formación de micronúcleos y se pueden observar células despegadas. Además, las membranas celulares se observaron severamente dañadas, mostrando la formación de poros superficiales en la membrana celular, y amplificándose al incrementar el tiempo de exposición a los tratamientos. Asimismo, el tratamiento con paclitaxel usualmente afecta la altura de la célula, sin embargo no se ha encontrado correlación entre los periodos del tratamiento y los cambios en la altura. (85,87–89) La rugosidad mostró una relación directa en cuanto a los tratamientos aplicados. Por ello, para comprobar la eficacia de estos tratamientos de una manera cuantificable, se realizó el análisis de la misma línea celular que en la sección anterior, pero buscando una relación entre el daño celular y la rugosidad. Por lo tanto, se realizaron muestreos de diferentes áreas en las muestras preparadas y se midió la rugosidad de 5 zonas diferentes dentro de esas áreas.

En la Figura 17, se observa las micrografías obtenidas, en 2D y 3D, y los perfiles topográficos Z para el análisis superficial de la eficacia de los tratamientos con 1 día de aplicación. Primero, se obtuvieron las imágenes en 2D, que posteriormente fueron procesadas en el programa XEI para la obtención de la imagen en 3D y los datos de la superficie celular. En esta figura, podemos observar la información mencionada para el control, tratamiento con

arsénico y con arsénico-platino a 1 día de crecimiento. Los datos de interés para comparar la eficacia de los tratamientos son la rugosidad (Ra) y la altura promedio (Mean). Para esta muestra, la rugosidad promedio del control fue de 98.901 nm, la cual se compara con los demás tratamientos en la figura 20, y la altura promedio de 98.775 nm, la cual se puede observar en la gráfica de alturas de la figura 17. Para verificar la rugosidad en áreas donde se observan los picos de altura más grandes, se tomaron 5 muestreos en áreas de interés dentro las imágenes ya analizadas. Para el caso de esta muestra, se obtuvieron áreas con una rugosidad que va desde los 100 nm hasta los 220 nm.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de los tratamientos con nanopartículas de arsénico nos mostraron que la rugosidad promedio de la zona analizada se redujo, sin embargo, al realizar el muestreo de rugosidad en 5 áreas de la imagen, se observó que se encontraron valores mayores al control, teniendo valores de rugosidad de entre 150 nm a casi 300 nm. En el caso de la altura podemos observar que no hubo un cambio significativo.

Ahora, cuando se analizan los datos obtenidos con los tratamientos de arsénico-platino con 1 día de tratamiento podemos observar un incremento significativo en los valores de rugosidad y de altura. Para la altura promedio se obtuvo un valor de 515 nm, lo cual resulta en un incremento de 5 veces a comparación del control y las células tratadas con nanopartículas de arsénico. Por otro lado, la rugosidad promedio incrementó hasta los 350 nm con picos de rugosidad en áreas específicas de hasta 960 nm, lo cual nos indica que la célula sufrió una deformación la superficie gracias a los tratamientos aplicados.

Wang et. al. midió la rugosidad promedio de la superficie de dos líneas celulares de mama, una cancerígena (MCF-7) y otra benigna (MCF-10A). La rugosidad promedio de la línea

cancerígena fue 25% mayor que la benigna, proporcionando así un importante panorama en cuanto al análisis de la rugosidad corresponde. (90)

La proteína supresora de tumores SMAR I fue estudiada por Kaul-Ghanekar et. al. y se comprobó que aquellas células de cáncer de mama humano que presentaban una disminuida expresión de dicha proteína contaban con un valor de rugosidad significativamente más alto que aquellas que presentaban una sobreexpresión de esta. Por ende, teorizan que la rugosidad promedio puede ser utilizada para determinar el estado de avance tumoral de células cancerígenas. (91)

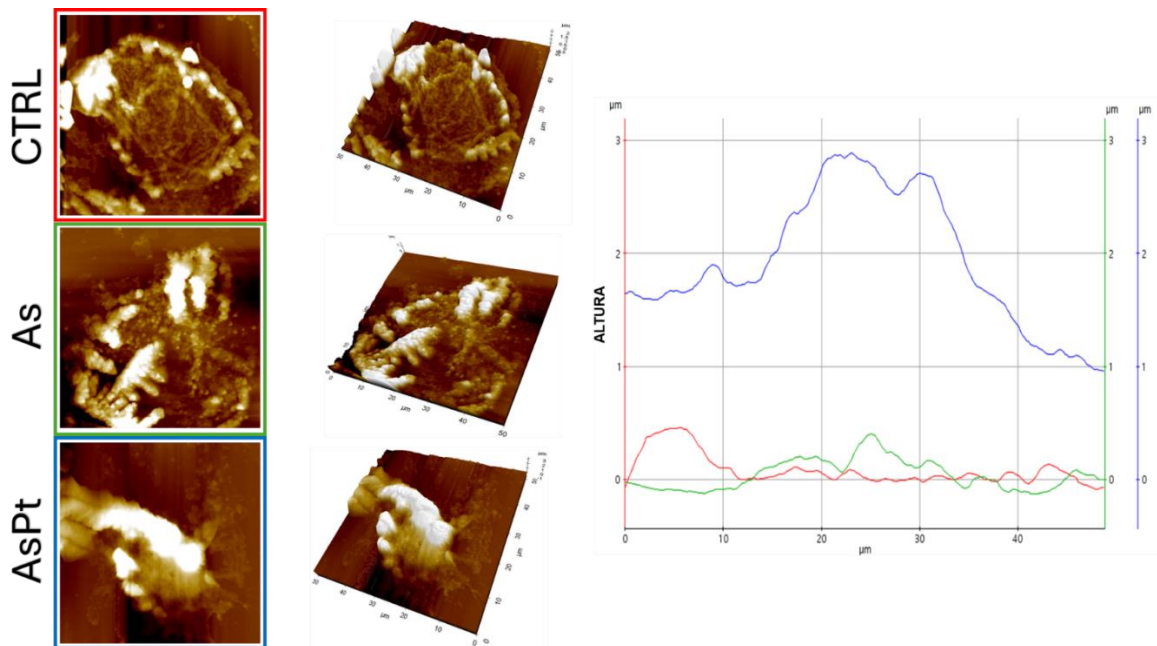


Figura 17. Células MDA-MB-231 evaluadas por AFM con tratamientos de As/Pt-NPs a 1 día de crecimiento. Las imágenes corresponden a la orientación 2D y 3D (de izquierda a derecha), y el perfil de alturas de las muestras. Las imágenes, al igual que la línea corresponden a las alturas celulares.

En la Figura 18, se observan los resultados después de 3 días de crecimiento con los tratamientos y su respectivo control. En cuestión al control, se pueden observar incrementos en la rugosidad promedio y altura a comparación del control a 1 día, pero los valores aún se mantienen menores que los obtenidos de las células dañadas con las AsPtNPs. Los valores de rugosidad promedio fueron de 141 nm con picos de hasta 330 nm. Por parte de la altura promedio, se obtuvo un valor de 155 nm, lo cual significa un ligero incremento a comparación de lo obtenido después de solo 24 horas crecimiento. En el caso de la muestra con AsNPs a 3 días se obtuvieron valores menores para la rugosidad promedio y altura promedio. El valor de rugosidad promedio fue de tan solo 24 nm, lo cual significa una reducción sustancial a comparación de las células tratadas con estas mismas nanopartículas después de 24 horas. En el caso de la altura promedio se observa un comportamiento muy similar, reduciendo su valor a solo 42 nanómetros, lo cual indica una reducción de más del 50% contra su similar a 24 horas de crecimiento.

Debido a la deformación que van sufriendo las células gracias a los tratamientos, la toma de las imágenes se tornó cada vez más complicada. Por ejemplo, los tratamientos con AsPtNPs a 3 días mostraron la imagen de mejor calidad que se pudo obtener después de muchos días de análisis y preparación de muestra. Esta micrografía mostró una célula con deformación superficial y alteración en su morfología arrojando datos de rugosidad promedio mayores a los 500 nm con picos de hasta 1100 nm. Este incremento en la rugosidad de la muestra dificulta la toma de imagen y análisis debido a los cambios tan pronunciados en la superficie celular. Sin embargo, los valores son coherentes a lo observado en la bibliografía que indica un incremento en la rugosidad en líneas celulares dañadas (85). A comparación de la muestra tratada con estas mismas nanopartículas, pero con solo 24 horas de crecimiento,

se observa un mayor incremento en la rugosidad, sugiriendo que el daño celular por estos tratamientos puede estar relacionado con el aumento en la irregularidad superficial celular.

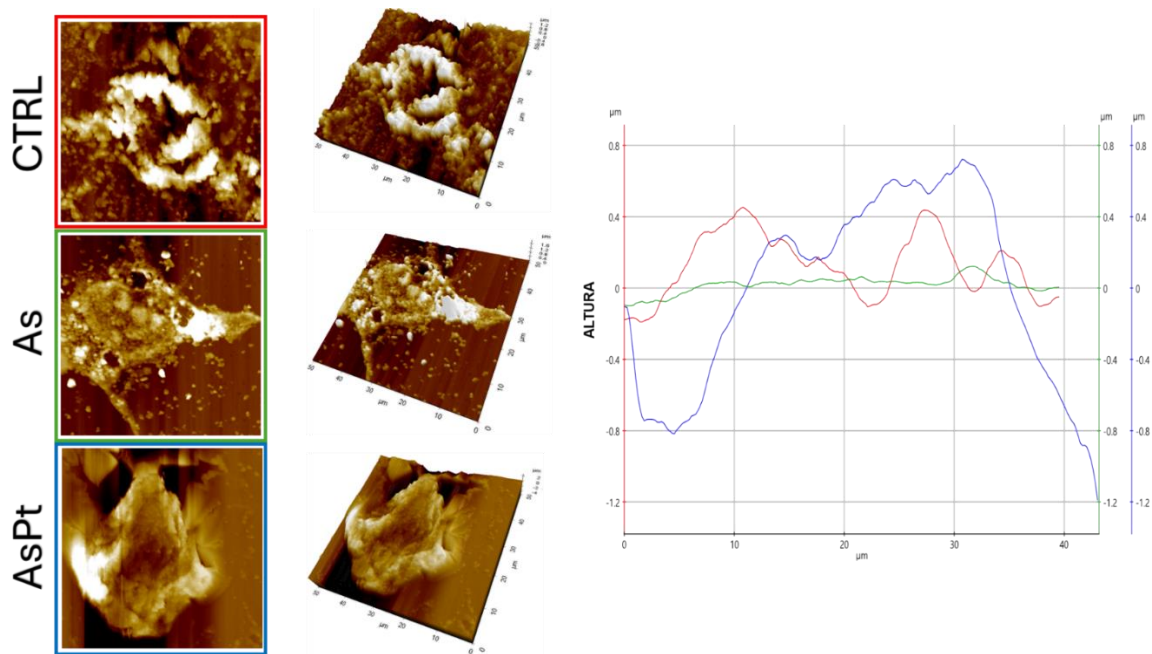


Figura 18. Línea celular MDA-MB-231 con tratamientos de AsPtNPs analizadas por AFM a 3 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha). Las imágenes, al igual que la línea correspondiente en la gráfica de alturas, están marcadas con rojo para control, verde para tratamientos con arsénico y azul para tratamientos con arsénico-platino.

En la Figura 19, se observa las células con 5 días de crecimiento sin ningún tipo de tratamiento y con tratamientos de arsénico y arsénico-platino. El control cuenta con una morfología tradicional de la línea celular MDA-MB-231. La altura promedio es de 198 nm y la rugosidad promedio es 119 nm con picos por encima de los 400 nm. Comparando estos valores con los obtenidos para las muestras a 1 y 3 días sin tratamientos, se observa una

tendencia a incrementar, sin embargo, es coherente con el incremento en días de crecimiento de la célula. Asimismo, es importante indicar que cinco días de crecimiento resultan en una monocapa celular más madura, con mayor presión celular por la confluencia, efectos que pueden explicar este fenómeno. La última muestra tratada con NPs de As se observa una aparente deformación a la morfología celular, sin embargo, los valores de rugosidad no incrementaron como se esperaba. Dicho valor ronda los 200 nm, con picos de hasta 680 nm, lo cual es similar a lo obtenido en la muestra con 1 día de tratamiento, pero muestra un incremento significativo a lo obtenido a 3 días de tratamiento.

Por último, al tratar las células con AsPtNPs durante 5 días, se observa la forma usual de las células de MDA-MB-231 pero con unas ligeras deformaciones en las orillas de la célula. Sin embargo, los valores de rugosidad promedio, al igual que los valores de picos de rugosidad, disminuyeron a comparación de las muestras a 1 y 3 días de tratamiento. Lo mismo sucedió con la altura promedio la cual, a pesar de tener una altura máxima de 500 nm, fue menor a los 200 nm. Este efecto se puede relacionar con el tiempo de tratamiento, ya que la dosis utilizada fue la concentración mínima inhibitoria (IC_{50} , por sus siglas en inglés) por lo que a definición se espera conservar una parte de la viabilidad celular.

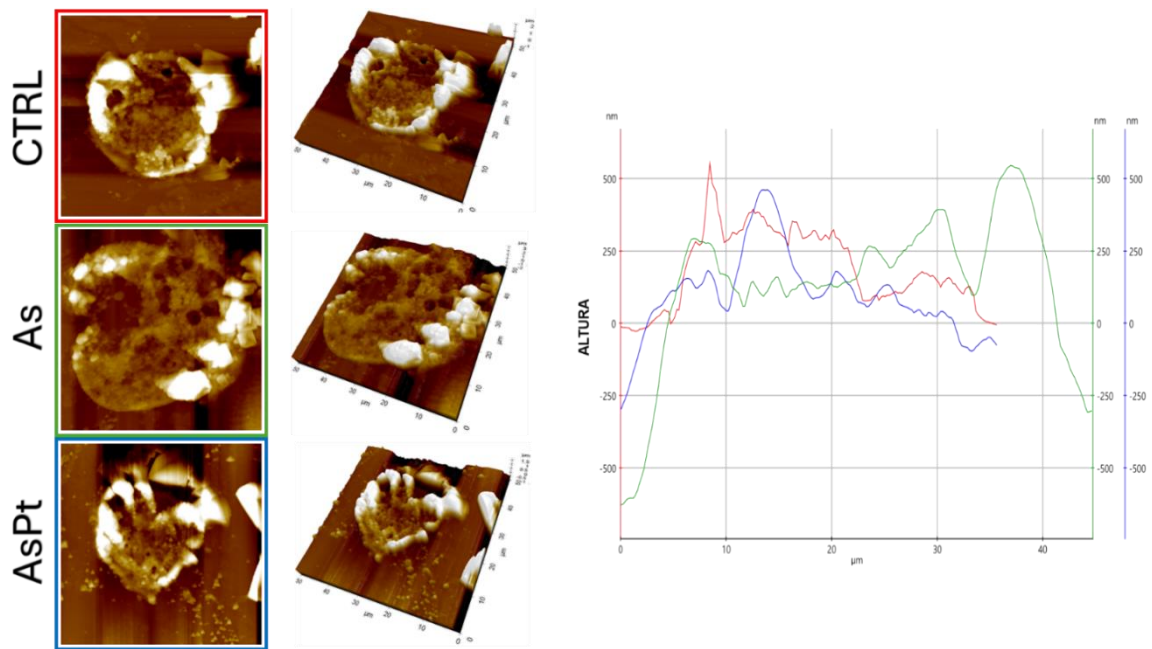


Figura 19. Línea celular MDA-MB-231 con tratamientos de AsPtNPs analizadas con AFM a 5 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha). Las imágenes, al igual que la línea correspondiente en la gráfica de alturas, están marcadas con rojo para control, verde para tratamientos con arsénico y azul para tratamientos con arsénico-platino.

Con el objetivo de analizar cuantitativamente los resultados, se graficaron los valores de Ra obtenidos para cada muestra, por tiempo de aplicación de tratamientos. Al observar la Figura 20, la cual muestra los valores anteriormente mencionados, las células tratadas durante 1 y 3 días muestran un comportamiento muy similar, siendo aquellas células con los tratamientos de arsénico-platino las que mostraron un mayor valor de Ra. Esta diferencia tan sustancial en dicho valor indica que las AsPtNPs tienen un mayor efecto en las células, provocando un mayor daño a la estructura celular lo cual inicialmente incrementa la rugosidad en la superficie de la muestra. Los resultados con tratamientos a 5 días muestran

un comportamiento diferente a los anteriores, donde el valor de Ra de la muestras con tratamientos de arsénico fue mayor al control y el otro tratamiento. En general, el control mostró un valor de Ra muy similar en las muestras a 1, 3 y 5 días de tratamiento con AsNPs, con un pequeño incremento proporcional al avance de los días de tratamiento que se puede atribuir al daño normal que sufren las células debido a la limitada área superficial del portaobjetos donde se realizan las fijaciones.

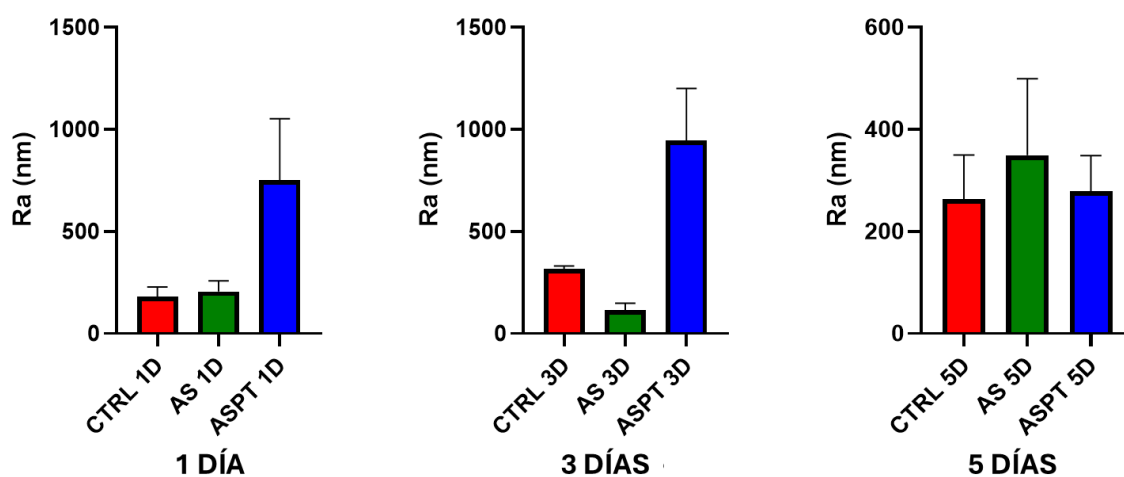


Figura 20. Gráficas de valores de Ra para las muestras, organizadas de acuerdo con el número de días de tratamiento. Las barras muestran la desviación estándar (DE) de la media.

4.4 Aplicación de tratamientos a línea celular MG-63

Se aplicaron los tratamientos con las NPs para estudiar su efecto en la morfología y topografía de las células MG-63, manteniendo los mismos parámetros de siembra y fijado. En la Figura 21, se observan las respuestas de las células después de 1 día de crecimiento con y sin tratamientos de NPs. En las imágenes que corresponden a control y tratamiento con AsNPs, se puede observar la morfología de la célula elongada que caracteriza a esta línea celular, con unas ligeras deformaciones superficiales. En cuanto a los valores obtenidos de Ra y la altura del control, a 1 día de crecimiento, Ra promedio fue de 173 nm con picos de hasta 198 nm, y la altura promedio fue de 226 nm con una altura máxima de 562 nm.

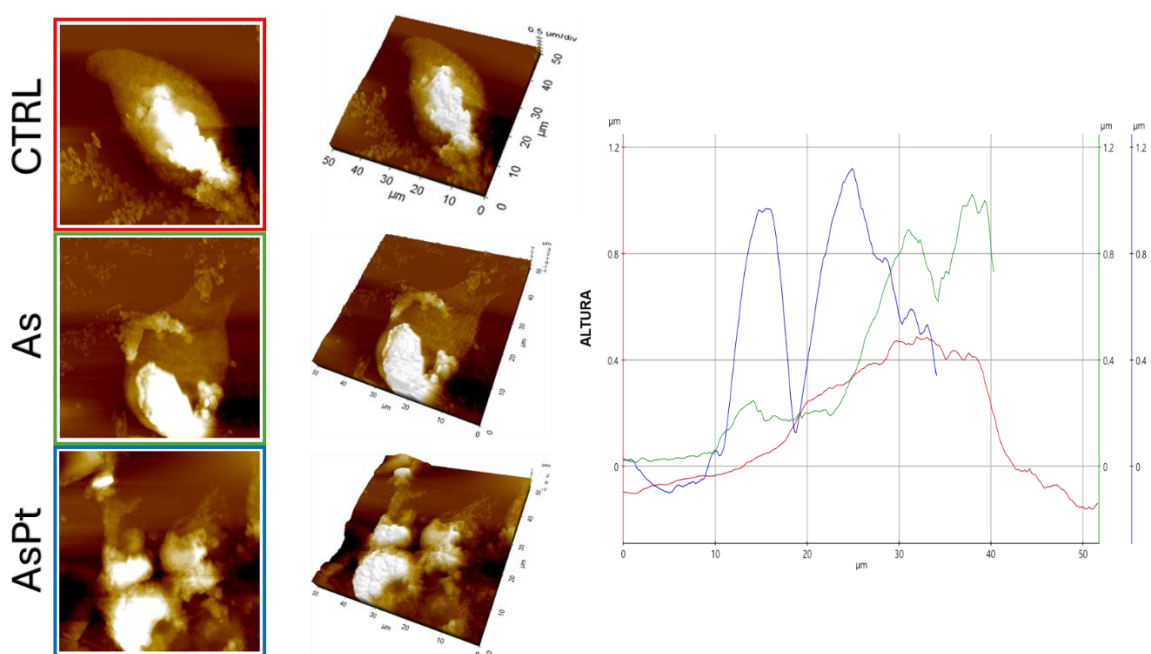


Figura 21. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 1 día de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).

La muestra con tratamientos de AsNPs muestra valores mayores de altura que aquella que fue cultivada sin tratamientos, pero un valor promedio menor de Ra. Las muestras con 1 día de tratamiento cuentan con 411 nm de altura promedio y 102 nm de Ra promedio. Estos valores, comparados con las células sin tratamiento con 1 día de crecimiento, representan un incremento de hasta dos veces los valores obtenidos de altura. Al igual que con la línea celular MDA-MB-231, las muestras tratadas con las AsPtNPs fueron las que mayor deformación celular sufrieron. En el caso de las muestras con tratamientos de 24 horas, el valor de altura promedio fue de 318 nm con altura máxima de hasta 1000 nm y 401 nm de Ra promedio con picos de hasta 555 nm. Esto, comparado con el control a 1 día de crecimiento, significa un incremento en el valor de Ra, lo cual es coherente con la teoría mencionada anteriormente.

Las muestras con 3 días de tratamiento y su respectivo control también se presentan en la Figura 22. Las muestras de control con 3 días de crecimiento arrojaron valores de 45 nm para la Ra promedio y 78 nm para la altura promedio, con una altura máxima de 275 nm. Esto significa una reducción en ambos valores a comparación de las células con solo 24 horas de crecimiento. En cuanto a la muestra con 3 días de tratamiento con AsNPs, estas presentaron una forma elongada tradicional de esta línea celular, que, a diferencia de la muestra a 1 día de crecimiento, no sufrió una deformación sustancial en su morfología. En esta muestra se obtuvieron valores de 216 nm para la altura promedio y 168 nm para la Ra promedio, con unos picos de hasta 205 nm en zonas específicas.

Las células tratadas con AsPtNPs muestran una deformación en la morfología de la célula, con unos valores de altura promedio de 322 nm con altura máxima de 1200 nm y un valor de 379 nm de Ra promedio, con picos de hasta 396 nm. A comparación de la muestra

de control de 3 días, donde sus valores de Ra son menores a 50 nm, la rugosidad incrementó, lo cual es esperado debido a la aparente deformación que sufrió la célula.

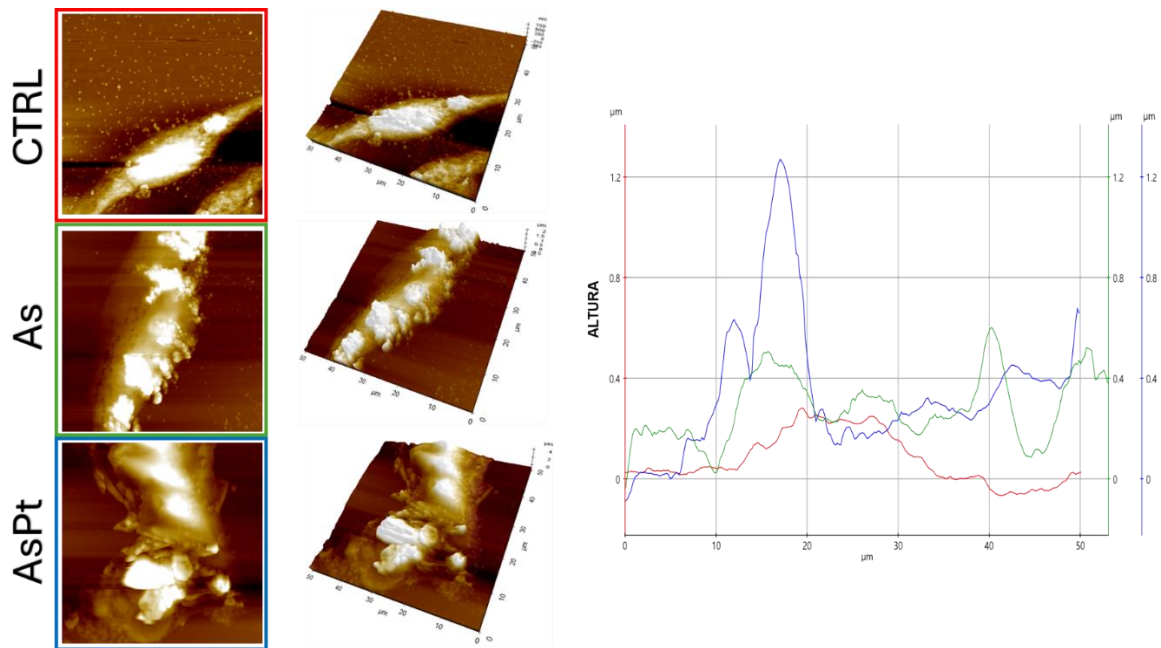


Figura 22. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 3 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).

Las muestras con 5 días de tratamiento y su control se presentan en la Figura 23. La muestra control ilustra valores de Ra promedio y altura promedio de 43 nm y 164 nm, respectivamente. El valor de Ra promedio asemeja al obtenido a 3 días de crecimiento, sin embargo, el valor de altura es mayor. Ahora, las muestras con 5 días de tratamiento presentaron un comportamiento poco usual. Debido al daño provocado por los tratamientos, solo fue posible obtener imágenes de los residuos de las células. Esto se debe a un posible despegue de las células por daño a la superficie celular y pérdida en la integridad de las

proyecciones citoplasmáticas. Sin embargo, los datos obtenidos de Ra y altura, para las muestras tratadas con As, fueron de 140 nm y 54 nm, respectivamente. Por otra parte, a comparación de las muestras con tratamientos de 5 días de AsNPs, si fue posible obtener imágenes de la célula deformada. En este caso, la Figura 23 muestra una célula deformada por los tratamientos de 5 días de AsPtNPs. Para esta muestra se obtuvieron alturas máximas por encima de los 1000 nm y Ra promedio de 187 nm, indicando que fue la de mayor Ra MG-63.

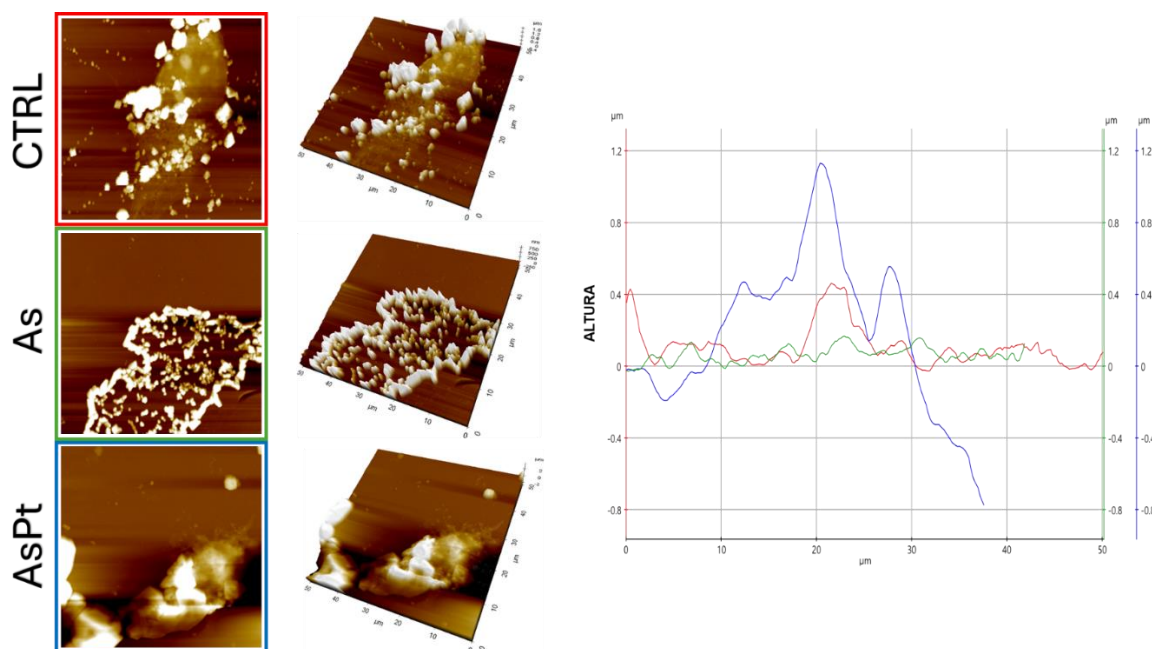


Figura 23. Línea celular MG-63 con tratamientos de NPs analizadas por AFM a 5 días de crecimiento. Las imágenes que se muestran corresponden a la imagen original en 2D, su imagen correspondiente en 3D y el perfil de alturas de las muestras (de izquierda a derecha).

Los valores de Ra obtenidos para las muestras con la línea celular MG-63 se presentan en la Figura 24. En cuanto al control, el comportamiento de Ra se mantuvo muy similar en

los 3 diferentes periodos de aplicación de tratamiento, siendo a 1 día de crecimiento donde se obtuvo los mayores valores de Ra. Las muestras tratadas con AsNPs arrojaron valores de Ra muy similares a 1, 3 y 5 días de crecimiento. Por último, al igual que en las muestras con la línea celular MDA-MB-231, las células MG-63 tratadas con AsPtNPs fueron las que mayor daño sufrieron, por ende, arrojaron valores de Ra mayores que las otras muestras.

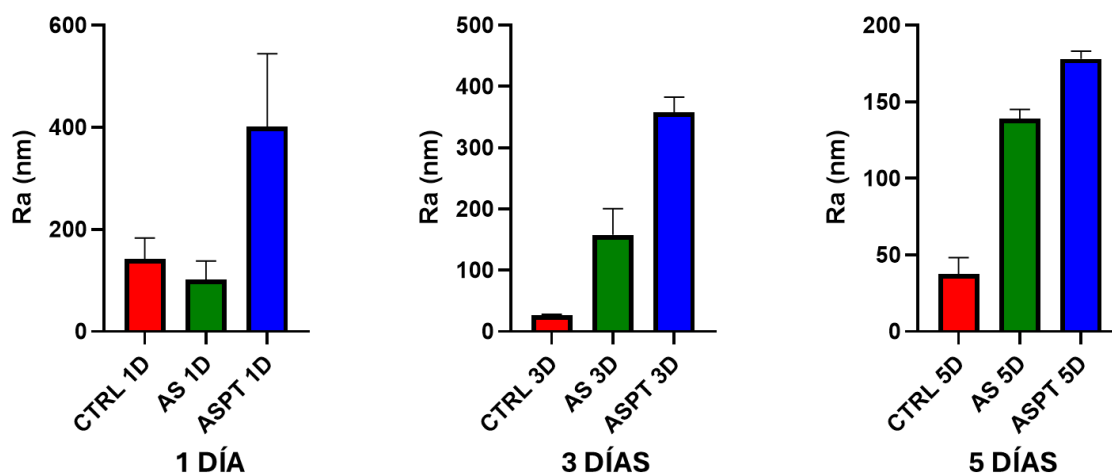


Figura 24. Gráficas de valores de Ra para las muestras experimentales, organizadas de acuerdo con el número de días de tratamiento. Las barras muestran la DE de la media.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Una manera de identificar y analizar la eficacia de tratamientos contra líneas celulares cancerígenas es evaluando los cambios en su morfología y topografía celular. Para ello, se necesitan protocolos para el análisis con instrumentos y equipos de alta tecnología como son microscopía de fuerza atómica y Cytoviva, que incluyan procesos de preparación muy estrictos que permitan obtener imágenes y datos con alta precisión. Por ello, se diseñaron y estandarizaron los protocolos de preparación de muestras y su análisis por AFM y Cytoviva, para identificar los cambios morfológicos y cuantificar las alteraciones topográficas celulares. De igual manera, utilizando los valores de Ra, fue posible demostrar los cambios estructurales estimuladas por las NPs contra las células de cáncer de mama y hueso, observando una reducción en la rugosidad en ambas líneas celulares, siguiendo un incremento conforme transcurrieron los días de aplicación del tratamiento. Para la línea celular cancerígena MDA-MB-231, se obtuvieron valores de rugosidad menores en los controles, mientras que las células tratadas duplicaron estos cambios en función al tiempo. Este comportamiento fue similar en la línea MG-63 demostrando que la acción anticancerígena expresa cambios estructurales significativos de acuerdo con el daño celular. Estos datos fueron posibles de obtener gracias a la estandarización de los métodos desarrollados sugiriendo que son eficaces para medir los cambios morfológicos de las células cancerígenas cuando se aplican tratamientos nanoestructurados.

CAPÍTULO 6. TRABAJO A FUTURO

Para poder tener un punto de comparación en relación con los cambios fenotípicos encontrados, se propone realizar un análisis con microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), para observar más a fondo la interacción de las células con las nanopartículas y su capacidad de formar monocapas.

Por último, para analizar con mayor precisión los resultados obtenidos con los tratamientos utilizados, se recomienda comparar los efectos de un medicamento antitumoral utilizado en las terapias contra el cáncer (por ejemplo, paclitaxel) contra las líneas celulares estudiadas y así detallar una hipótesis mejor fundamentada sobre los cambios fenotípicos o posible inducción de apoptosis.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Franz CM, Puech PH. Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics. *Cell Mol Bioeng.* diciembre de 2008;1(4):289–300.
2. Li G, Xi N, Wang DH. Probing membrane proteins using atomic force microscopy. *J Cell Biochem.* el 15 de abril de 2006;97(6):1191–7.
3. Caneva Soumetz F, Saenz JF, Pastorino L, Ruggiero C, Nosi D, Raiteri R. Investigation of integrin expression on the surface of osteoblast-like cells by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy.* marzo de 2010;110(4):330–8.
4. Hörber JKH, Miles MJ. Scanning probe evolution in biology. *Science.* el 7 de noviembre de 2003;302(5647):1002–5.
5. Microscopio de Fuerza Atómica NX10. Park Systems. [Internet]. Disponible en: <https://www.parksystems.com/products/small-sample-afm/park-nx10/overview>
6. Hansma et al. Simple schematic of atomic force microscope (AFM) apparatus.
7. Gavara N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc Res Tech.* enero de 2017;80(1):75–84.
8. Hoh JH, Schoenenberger CA. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J Cell Sci.* mayo de 1994;107 (Pt 5):1105–14.
9. Tipos de punta de AFM. [Internet]. Disponible en: <https://www.adama.tips/>

10. Vahabi S, Nazemi Salman B, Javanmard A. Atomic force microscopy application in biological research: a review study. *Iran J Med Sci.* junio de 2013;38(2):76–83.
11. Braet F. A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells. *J Electron Microsc (Tokyo).* el 1 de julio de 2001;50(4):283–90.
12. Domke J, Dannöhl S, Parak WJ, Müller O, Aicher WK, Radmacher M. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* diciembre de 2000;19(4):367–79.
13. Fotiadis D. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron.* enero de 2002;33(4):385–97.
14. Braet F, Wisse E. AFM imaging of fenestrated liver sinusoidal endothelial cells. *Micron.* diciembre de 2012;43(12):1252–8.
15. Liu S, Wang Y. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning.* marzo de 2010;32(2):61–73.
16. Greenleaf WJ, Woodside MT, Block SM. High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007;36:171–90.
17. Rotsch C, Jacobson K, Radmacher M. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* el 2 de febrero de 1999;96(3):921–6.

18. Codan B, Del Favero G, Martinelli V, Long CS, Mestroni L, Sbaizero O. Exploring the elasticity and adhesion behavior of cardiac fibroblasts by atomic force microscopy indentation. *Mater Sci Eng C*. julio de 2014;40:427–34.
19. Braet, Seynaeve, De Zanger, Wisse. Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. *J Microsc*. junio de 1998;190(3):328–38.
20. Muller DJ. AFM: A Nanotool in Membrane Biology. *Biochemistry*. el 1 de agosto de 2008;47(31):7986–98.
21. Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res*. diciembre de 2004;15(6):683–92.
22. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. el 1 de mayo de 2006;6(5):392–401.
23. Abercrombie M. Fibroblasts. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1978;12:1–6.
24. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. septiembre de 2016;16(9):582–98.
25. Fibroblastos. Revista X115. [Internet]. Disponible en: <https://magazine.x115.it/es/x115/fibroblastos/>
26. Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*. el 20 de mayo de 1999;18(20):3166–72.

27. Giudicelli. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. el 1 de enero de 1994 [citado el 13 de mayo de 2024];20(4). Disponible en: http://www.spandidos-publications.com/or/article.jsp?article_id=or_20_4_971
28. Lee HS, Seo EY, Kang NE, Kim WK. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Nutr Biochem*. mayo de 2008;19(5):313–9.
29. Línea celular MDA-MB-231. Sigma Aldrich. [Internet]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/cb_92020424
30. Pérez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. *Int Endod J*. agosto de 2003;36(8):564–70.
31. Carmeliet G, Nys G, Bouillon R. Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mayo de 1997;12(5):786–94.
32. Tsai SW, Liaw JW, Kao YC, Huang MY, Lee CY, Rau LR, et al. Internalized gold nanoparticles do not affect the osteogenesis and apoptosis of MG63 osteoblast-like cells: a quantitative, in vitro study. *PloS One*. 2013;8(10):e76545.
33. Keremidarska M, Radeva E, Eleršič K, Iglič A, Pramatarova L, Krasteva N. Plasma deposited composite coatings to control biological response of osteoblast-like MG-63 cells. *J Phys Conf Ser*. el 3 de diciembre de 2014;558:012057.

34. Huang BQ, Yeung EC. Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. En: Yeung ECT, Stasolla C, Sumner MJ, Huang BQ, editores. *Plant Microtechniques and Protocols* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado el 18 de marzo de 2024]. p. 23–43. Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-19944-3_2
35. Crawford GNC, Barer R. The Action of Formaldehyde on Living Cells as Studied by Phase-contrast Microscopy. *J Cell Sci.* el 1 de diciembre de 1951;S3-92(20):403–52.
36. Fijadores celulares a base de formaldehído. [Internet]. Disponible en: <https://www.fishersci.at/shop/products/image-it-fixative-solutions-3/15706345>
37. Kim SO, Kim J, Okajima T, Cho NJ. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Converg.* diciembre de 2017;4(1):5.
38. Lee GJ, Uhm YK, Eo YH, Park JH, Lim JE, Jo TH, et al. Optimization of Wet Fixation Methods for AFM Imaging of Human Fibroblast Cells. *Exp Neurobiol.* 2008;17(1):17.
39. Melan MA. Overview of cell fixation and permeabilization. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1994;34:55–66.
40. Variedad de fijadores. AP Medical. [Internet]. Disponible en: <https://www.apmedical.es/producto/liquido-de-bouin-para/>
41. Chao Y, Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol.* octubre de 2011;92(2):381–92.

42. Liu BY, Zhang GM, Li XL, Chen H. Effect of glutaraldehyde fixation on bacterial cells observed by atomic force microscopy. *Scanning*. febrero de 2012;34(1):6–11.
43. Dufrêne YF. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat Rev Microbiol*. el 1 de junio de 2004;2(6):451–60.
44. Codan B, Martinelli V, Mestroni L, Sbaizero O. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: An investigation of cell elasticity changes due to fixation. *Mater Sci Eng C*. agosto de 2013;33(6):3303–8.
45. Morkvėnaitė-Vilkončienė I, Ramanavičienė A, Ramanavičius A. Atomic force microscopy as a tool for the investigation of living cells. *Med Kaunas Lith*. 2013;49(4):155–64.
46. Dufrêne YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol*. octubre de 2002;184(19):5205–13.
47. Braet F, Rotsch C, Wisse E, Radmacher M. Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy. *Appl Phys Mater Sci Process*. el 1 de marzo de 1998;66(7):S575–8.
48. Li M, Xi N, Wang Y, Liu L. In Situ High-Resolution AFM Imaging and Force Probing of Cell Culture Medium-Forming Nanogranular Surfaces for Cell Growth. *IEEE Trans NanoBioscience*. julio de 2020;19(3):385–93.
49. Takai E, Costa KD, Shaheen A, Hung CT, Guo XE. Osteoblast Elastic Modulus Measured by Atomic Force Microscopy Is Substrate Dependent. *Ann Biomed Eng*. julio de 2005;33(7):963–71.

50. Mahaffy RE, Park S, Gerde E, Käs J, Shih CK. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys J.* marzo de 2004;86(3):1777–93.
51. Medios de cultivo celular. [Internet]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/gibco-dmem-high-glucose-pyruvate-8/p-4919836>
52. Frey MT, Engler A, Discher DE, Lee J, Wang Y. Microscopic Methods for Measuring the Elasticity of Gel Substrates for Cell Culture: Microspheres, Microindenters, and Atomic Force Microscopy. En: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado el 18 de marzo de 2024]. p. 47–65. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X07830032>
53. Haase K, Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J R Soc Interface.* marzo de 2015;12(104):20140970.
54. Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, Aimé JP, Amédée J, Bareille R, et al. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. *Cytometry A.* julio de 2003;54A(1):36–47.
55. D Antonio P, Lasalvia M, Perna G, Capozzi V. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* diciembre de 2012;1818(12):3141–8.
56. Hansen JC, Yul Lim J, Xu LC, Siedlecki CA, Mauger DT, Donahue HJ. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy. *J Biomech.* 2007;40(13):2865–71.

57. Hu M, Wang J, Zhao H, Dong S, Cai J. Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: From resting, activated to apoptosis. *J Biomech.* julio de 2009;42(10):1513–9.
58. Faria EC, Ma N, Gazi E, Gardner P, Brown M, Clarke NW, et al. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM. *The Analyst.* 2008;133(11):1498.
59. Najera J, Rosenberger MR, Datta M. Atomic Force Microscopy Methods to Measure Tumor Mechanical Properties. *Cancers.* el 22 de junio de 2023;15(13):3285.
60. Huang Z, Yu P, Tang J. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *OncoTargets Ther.* junio de 2020;Volume 13:5395–405.
61. Ishmukhametov I, Fakhrullin R. Dark-Field Hyperspectral Microscopy for Carbon Nanotubes Bioimaging. *Appl Sci.* el 20 de diciembre de 2021;11(24):12132.
62. Lawrence S. Enhanced Darkfield Optical Microscopy Opens New Nano-Scale Imaging Possibilities. *Microsc Today.* enero de 2021;29(1):50–5.
63. Verebes GS, Melchiorre M, Garcia-Leis A, Ferreri C, Marzetti C, Torreggiani A. Hyperspectral enhanced dark field microscopy for imaging blood cells. *J Biophotonics.* diciembre de 2013;6(11–12):960–7.
64. Mehta N, Shaik S, Devireddy R, Gartia MR. Single-Cell Analysis Using Hyperspectral Imaging Modalities. *J Biomech Eng.* el 1 de febrero de 2018;140(2):0208021–02080216.

65. Rodríguez-Fajardo V, Sanz V, De Miguel I, Berthelot J, Aćimović SS, Porcar-Guezenec R, et al. Two-color dark-field (TCDF) microscopy for metal nanoparticle imaging inside cells. *Nanoscale*. 2018;10(8):4019–27.
66. Gnerucci A, Faraoni P, Romano G, Fusi F. Unstained cell imaging: Morphological insights from coupled fixation and darkfield microscopy. *Acta Histochem*. febrero de 2019;121(2):248–52.
67. Thomas R, Janardhanan A, Varghese RT, Soniya EV, Mathew J, Radhakrishnan EK. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol*. 2014;45(4):1221–7.
68. Mehta N, Sahu SP, Shaik S, Devireddy R, Gartia MR. Dark-field hyperspectral imaging for label free detection of nano-bio-materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. enero de 2021;13(1):e1661.
69. Zamora-Perez P, Tsoutsi D, Xu R, Rivera Gil P. Hyperspectral-Enhanced Dark Field Microscopy for Single and Collective Nanoparticle Characterization in Biological Environments. *Mater Basel Switz*. el 6 de febrero de 2018;11(2):243.
70. Wen Y, Liu W, David B, Ren W, Irudayaraj J. Multifunctional Oxygenated Particles for Targeted Cancer Drug Delivery and Evaluation with Darkfield Hyperspectral Imaging. *ACS Omega*. el 15 de noviembre de 2022;7(45):41275–83.
71. Bernardo-Mazariegos E, Valdez-Salas B, González-Mendoza D, Abdelmoteleb A, Tzintzun Camacho O, Ceceña Duran C, et al. Silver nanoparticles from *Justicia spicigera*

and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(2):103–9.

72. Valdez-Salas B, Beltran-Partida E, Cheng N, Salvador-Carlos J, Valdez-Salas EA, Curiel-Alvarez M, et al. Promotion of Surgical Masks Antimicrobial Activity by Disinfection and Impregnation with Disinfectant Silver Nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:2689–702.
73. Weinkauff H, Brehm-Stecher BF. Enhanced dark field microscopy for rapid artifact-free detection of nanoparticle binding to *Candida albicans* cells and hyphae. *Biotechnol J.* junio de 2009;4(6):871–9.
74. Cruje C. Enhanced uptake of polyethylene glycol coated gold nanoparticles for improved therapeutics [Internet]. 2021 may [citado el 18 de marzo de 2024]. Disponible en:
https://rshare.library.torontomu.ca/articles/thesis/Enhanced_uptake_of_polyethylene_glycol_coated_gold_nanoparticles_for_improved_therapeutics/14668407/1
75. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Jeyaraj M, Kim JH. Cytotoxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1–10.
76. Luo H, Wang F, Bai Y, Chen T, Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids Surf B Biointerfaces.* junio de 2012;94:304–8.

77. Macnab RM. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J Clin Microbiol.* septiembre de 1976;4(3):258–65.
78. Valdez-Salas B, Beltrán-Partida E, Zlatev R, Stoytcheva M, Gonzalez-Mendoza D, Salvador-Carlos J, et al. Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism. *Mater Sci Eng C.* febrero de 2021;119:111501.
79. Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, García-López Portillo M, Gutierrez-Perez C, Castillo-Uribe S, Salvador-Carlos J, et al. Atherosclerotic-Derived Endothelial Cell Response Conducted by Titanium Oxide Nanotubes. *Mater Basel Switz.* el 13 de enero de 2023;16(2):794.
80. Shoucair I, Weber Mello F, Jabalee J, Maleki S, Garnis C. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Extracellular Vesicles in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* el 17 de septiembre de 2020;21(18):6837.
81. Yan Y, Chen X, Wang X, Zhao Z, Hu W, Zeng S, et al. The effects and the mechanisms of autophagy on the cancer-associated fibroblasts in cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* diciembre de 2019;38(1):171.
82. Wang L, Ling Y, Chen Y, Li CL, Feng F, You QD, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* noviembre de 2010;297(1):42–8.
83. Zhao Y, Onda K, Sugiyama K, Yuan B, Tanaka S, Takagi N, et al. Antitumor effects of arsenic disulfide on the viability, migratory ability, apoptosis and autophagy of breast

cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. el 9 de octubre de 2018 [citado el 4 de junio de 2024]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6780>

84. Subastri A, Arun V, Sharma P, Preedia Babu E, Suyavaran A, Nithyananthan S, et al. Synthesis and characterisation of arsenic nanoparticles and its interaction with DNA and cytotoxic potential on breast cancer cells. *Chem Biol Interact*. noviembre de 2018;295:73–83.
85. Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung MH, Yoon KS, Park HK. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. Muller DJ, editor. *PLoS ONE*. el 17 de enero de 2012;7(1):e30066.
86. Azizi M, Ghourchian H, Yazdian F, Dashtestani F, AlizadehZeinabad H. Cytotoxic effect of albumin coated copper nanoparticle on human breast cancer cells of MDA-MB 231. Ahmad A, editor. *PLOS ONE*. el 29 de noviembre de 2017;12(11):e0188639.
87. Wang DC, Chen KY, Tsai CH, Chen GY, Chen CH. AFM membrane roughness as a probe to identify oxidative stress-induced cellular apoptosis. *J Biomech*. noviembre de 2011;44(16):2790–4.
88. Lara Cruz C, Jimenez Salazar J, Ramon Gallegos E, Damian Matsumura P, Batina N. Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. octubre de 2016;Volume 11:5149–61.
89. Zhu X, Qin R, Qu K, Wang Z, Zhao X, Xu W. Atomic force microscopy–based assessment of multimechanical cellular properties for classification of graded bladder

cancer cells and cancer early diagnosis using machine learning analysis. *Acta Biomater.* marzo de 2023;158:358–73.

90. Wang Y, Xu C, Jiang N, Zheng L, Zeng J, Qiu C, et al. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning.* noviembre de 2016;38(6):558–63.
91. Kaul-Ghanekar R, Singh S, Mangain H, Jalota-Badhwar A, Paknikar KM, Chattopadhyay S. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study. *BMC Cancer.* diciembre de 2009;9(1):350.