



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biología Experimental

“Efectos de la incorporación y distribución intracelular de nanopartículas de oro sobre las propiedades biomecánicas de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario humano”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

M en B.E. CARLOS LARA CRUZ

DIRECTORES

Dr. Nikola Batina
Dr. Pablo G. Damián Matsumura

ASESORA

Dra. Eva Ramón Gallegos

Ciudad de México a 6 de Julio de 2016

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Nanotecnología e Ingeniería Molecular de la DCBI y de Endocrinología Molecular de la DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Nikola Batina y del Dr. Pablo G. Damián Matsumura.

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa se encuentra adscrito como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT (C/PFPN-2002-35-32)

El alumno Carlos Lara Cruz fue apoyado con la beca otorgada por parte de CONACYT con el No. de registro 233333 y estuvo adscrito al Programa de Posgrado en Biología Experimental, UAMI, MEXICO

Parte de este trabajo fue realizado con el apoyo de los Laboratorios Divisionales de Microscopia Confocal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, y al Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras por el apoyo con la espectroscopia Raman, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y por el proyecto de nanotecnología DCBS-UAM y el ICYTDF-UAM

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR

Dr. Nikola Batina

Laboratorio de Nanotecnología en Ingeniería Molecular, Área de Electroquímica
Departamento de Química
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
bani@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Laboratorio de Endocrinología Molecular
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Eva Ramón Gallegos

Laboratorio de Citopatología Ambiental
Departamento de Morfología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco
eramon72@gmail.com

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Efectos de la incorporación y distribución intracelular de nanopartículas de oro sobre las propiedades biomecánicas de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario humano”**

JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. Michel Picquart

Departamento de Física. UAM-I

División de Ciencias Básicas E Ingeniería

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



SECRETARIO

Dra. Eva Ramón Gallegos

Departamento de Morfología

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco

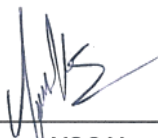


VOCAL

Dr. Ulises Páramo García

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Instituto Tecnológico de Ciudad Medero



VOCAL

Dr. Javier E. Jiménez Salazar

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana y en especial a la Unidad Iztapalapa que me dieron las herramientas necesarias para forjar mi camino como un investigador de excelencia y por brindarme sus paredes para refugiar mi vida estudiantil en esta que será por siempre mi alma mater. Mis más sincero agradecimiento a esta mi casa abierta al tiempo.

A los Drs Nikola Batina y Pablo G. Damián Matsumura por ayudarme en el desarrollo de mi carrera científica y por hacerme crecer como persona responsable. Por brindarme lo necesario para que me incursionara en este apasionante campo de investigación que juntos logramos estructurar formalmente desde que me incorpore a sus grupos de trabajo. Muchas gracias por su amistad, por sus palabras de aliento y apoyo moral que permitieron sacar adelante este proyecto científico que poco a poco se fue convirtiendo en un área de investigación y que formo parte del desarrollo pionero en la UAM y en nuestro país: La incursión de la Nanotecnología en el Cáncer de Mama. Y a la Dra. Eva Ramón Gallegos por haberme guiado y asesorado a lo largo de este camino de mi formación científica.

A mis compañeros de trabajo, mis amigos de Universidad. Mis amigos de Laboratorio que en todo momento estuvieron apoyándome y enseñándome sobre otras áreas del conocimiento. A Israel MR por su amistad y su habilidad para instruirme en temas de Ingeniería, a Javier EJS y Roberto CLL por su amistad que me brindaron a lo largo de este pasó por la Universidad y por su constante enseñanza sobre el cáncer de mama y microscopía confocal. A Rosa G, Bani, Paulina, Alma, Alexandro, Fernando por su amistad e infinito apoyo.

A mi familia que siempre han estado al pendiente de mis logros y preocupados por mis fracasos. A mis padres que son y siempre serán los mejores maestros que he tenido, a ellos que les debo parte fundamental de mi carrera científica. A mis hermanas, las mejores amigas que he tenido, aquellas que siempre me han brindado su apoyo incondicional, a ustedes les dedico este trabajo. A mis sobrinos que son el motor que me impulsa a seguir aprendiendo porque de ellos quiero ser ejemplo, a ellos que esperan de mí ser su guía en la vida.

A mi novia por su infinito apoyo y por su compañía incondicional. A ti Dennis Paola Ferreyra Picazo por ser mi complemento de vida y por acompañarme en este arduo camino de la ciencia. Por compartir conmigo tus pensamientos, tus ideales, tus conocimientos y tus ideales. Gracias por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas. Por haberme apoyado siempre en el comienzo y la culminación de este proyecto científico que se plasma en esta obra. Te amo.

Al posgrado en Biología Experimental por todo el apoyo brindado durante mi formación científica. Gracias a los coordinadores que estuvieron cuando inicie, durante y al finalizar mis estudios de posgrado en etas dos fascinantes etapas. Al financiamiento otorgado por el CONACYT a través de las becas de estudio de posgrado.

INDICE	
RESUMEN	11
ABSTRAC	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Nanotecnología aplicada al cáncer de mama	13
1.2. Propiedades de las AuNP	14
1.3 AuNP contra células cancerosas	14
1.4 Propiedades biomecánicas de la membrana plasmática de las células cancerosas	15
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Interacción de las AuNP con la membrana plasmática celular.	19
2.2 Modificaciones en la superficie membrana por efecto de la interacción con AuNP	20
2.3 Incorporación y distribución intracelular de las AuNP	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVO GENERAL	24
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. HIPÓTESIS	24
6. MATERIAL Y METODOS	25
6.1 Reactivos	25
6.2 Cultivo celular	25
6.3 Experimentos	26
6.4 Análisis de viabilidad celular.	26
6.5 Análisis de la morfología celular	27
6.6 Microscopia de fuerza atómica	27

6.7 Cultivo celular en placas de oro para AFM	28
6.8 Análisis de la rugosidad superficial de las células MCF-7	29
6.9 Captación celular y distribución intracelular de las AuNP	29
6.9.1 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Determinación de la concentración/tiempo de incubación de AuNP en las células MCF-7	30
7.2 Efecto de las AuNP sobre la morfología de células MCF-7	30
7.3 Caracterización de las regiones de análisis en la superficie celular	34
7.4 Visualización por AFM de la superficie membranal de las células MCF-7	38
7.5 Detección de las AuNP en células MCF-7 mediante AFM y espectroscopia Raman	40
7.6 Detección de las AuNP por espectro de emisión fluorescente	43
7.8 Captación y distribución intracelular de las AuNP	47
7.9 Efecto de las AuNP sobre la rugosidad en la superficie de la membrana plasmática de células MCF-7	52
7.9.1 Las AuNP inducen la formación de poros en las membranas de células mcf-7	60
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIÓN	69
10. PROSPECTIVAS	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71
12. ANEXO 1: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN GENERADO POR ESTE TRABAJO	79

ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Fuerza Atómica (del idioma inglés Atomic Force Microscope)
AuNP:	Nanopartículas de Oro (del símbolo químico Au:Oro y NP:Nanopartículas)
DMEM:	Medio de cultivo propuesto por Eagle y modificado por Dubelcco
DAPI:	Marcador nuclear (Dietil-Amidinofenil-indol)
DU-145:	Línea celular de cáncer de próstata
HeLa:	Línea celular ce cáncer cérvicouterino (acrónimo de Henrietta Lacks)
KB:	Línea celular de carcinoma epidermoide
CLSM:	Confocal Lasser Scanning Microscope (por sus siglas en ingles de Microscopia Confocal de Barrido Láser)
MCF-7:	Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de Michigan Cancer Foundation)
MDA-MB-231:	Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo M. D. Anderson Cancer Center)
RMS[Rq]	Valores de Rugosidad (Del idioma ingles Root Mean Square)
RPS:	Resonancia del Plasmón Superficial
Rat 2:	Línea celular de fibroblastos de ratón
SEM:	Microscopia Electrónica de Barrido (del idioma inglés Scanning Electron Microscopy)
SERS	Espectroscopia Raman mejorada por efecto de la superficie (del idioma inglés Surface-enhanced Raman spectroscopy)
SMAR 1	Scaffold/Matrix Attachment Region-Binding Protein 1
T98G:	Línea celular de glioma humano
TEM:	Microscopia Electrónica de Transmisión del idioma inglés Transmission Electron Microscopy)
THP-1:	Línea celular de leucemia
Vh:	Vehículo
Z-Stack:	Reconstrucción en 3D del eje Z.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.

Análisis de rugosidad. Evaluación de las variaciones en la altura medida (vector Z).

Figura 2.

Análisis de sección sobre la superficie membranal de células cancerosas por AFM.

Figura 3.

Efectos subletales de las AuNP sobre la viabilidad de las células MCF-7.

Figura 4.

Efecto a nivel morfológico de las diferentes concentraciones de AuNP sobre las células MCF-7

Figura 5.

Análisis topográfico de alta resolución por AFM de una célula MCF-7 en diferentes zonas de la membrana plasmática.

Figura 6.

Imagen tridimensional de una célula MCF-7 adherida al sustrato de oro y escaneada por AFM, en modo tapping-Altura.

Figura 7.

Obtención de imágenes de alta resolución por AFM

Figura 8.

Localización de aglomerados de AuNP sobre la superficie membrana de las células MCF-7.

Figura 9.

Espectro Raman-SERS de AuNP en células MCF-7

Figura 10.

Detección de las AuNP en células MCF-7 por análisis espectral.

Figura 11.

Localización de la señal de emisión fluorescente de las AuNP.

Figura 12.

Localización de aglomerados de AuNP en el interior de las células MCF-7, por microscopía de campo claro.

Figura 13

Captación y distribución intracelular de AuNP en las células MCF-7.

Figura 14.

Reconstrucción por Z-stack de las células MCF-7 tratadas con las AuNP.

Figura 15.

Transporte vesicular de las AuNP en el interior de las células MCF-7.

Figura 16.

Efecto de las AuNP sobre la rugosidad de la superficie en la membrana plasmática de células MCF-7.

Figura 17.

Cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de las células en función del tiempo de incubación con AuNP.

Figura 18.

Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 6 h de exposición

Figura 19.

Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 12 h de exposición

Figura 20.

Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 16 h de exposición

Figura 21.

Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 24 h de exposición

Figura 22.

Formación de nanoporos en la membrana plasmática de las células MCF-7.

Figura 23.

Las AuNP inducen la formación de nanoporos en las membranas de células MCF-7

RESUMEN

Las nanopartículas de oro (AuNP) juegan un papel importante contra el cáncer de mama al servir como un excelente marcador de diagnóstico temprano, transportador de quimiofármacos y regulador de la expresión de diferentes genes. Por lo cual comprender la interacción de las AuNP con la superficie celular y las modificaciones en sus propiedades biomecánicas de la membrana plasmática de las células cancerosas es esencial para el desarrollo de un eficiente sistema liberador de fármacos. En este estudio se empleó la Microscopia de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés) para evaluar los cambios que suceden en la superficie de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario humano MCF-7 por efecto de la incorporación de AuNP desnudas de 20 nm de diámetro y la Microscopía Confocal de Barrido Laser (CLSM por sus siglas en inglés) para monitorear la distribución intracelular de dichas nanopartículas. Los resultados demostraron que las células MCF-7 incubadas con AuNP a una concentración subletal de 80 $\mu\text{g/mL}$ (concentración máxima que mostró efectos sobre la morfología celular sin llegar a ocasionar la muerte de las mismas, esto con base a los datos obtenidos en el análisis de viabilidad) a diferentes tiempos de exposición, mostraron incremento en la rugosidad superficial, mientras que las células incubadas solo con el vehículo (agua ultrapura) no mostraron cambios significativos en la rugosidad. Los efectos sobre esta propiedad biomecánica de la membrana plasmática se observaron con mayor intensidad a las 12 h de incubación. Por otra parte, la CLSM mostró la localización de las AuNP conformadas en conglomerados (clústeres) en el interior celular mediante el análisis espectral determinando que las nanopartículas emiten señal fluorescente a 623 nm de longitud de onda. A través de estos datos del análisis espectral fue posible monitorear la distribución intracelular de las AuNP mostrando que a las 6 h se encontraban dispersas en el citoplasma mientras que para las 12 h se localizaron en la periferia nuclear y para las 24 h provoca desestabilidad del núcleo. El análisis de Z-stack mostró que a partir de las 6 h varios conglomerados de AuNP lograron internalizarse en el núcleo lo cual sugiere la acumulación después de las 24 h de exposición provocando daño irreversible del organelo.

Basados en estos resultados se concluyó que los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de las células cancerosas se asocian a la incorporación de las AuNP a través de los procesos de endocitosis y exocitosis para la excreción.

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNP) play an important role against breast cancer while serving as an excellent marker for early diagnosis, chemotherapy drugs and genes regulator. Understanding the interaction of AuNP with the cell surface and changes in the biomechanical properties of the plasma membrane of cancer cells is essential for the proper development of an efficient drug delivery system. In this study the Atomic Force Microscopy (AFM) was used to assess the changes that occur on the surface of the plasma membrane of cells of human breast carcinoma MCF-7 effect on incorporating AuNP naked 20 nm in diameter and Confocal Laser Scanning microscopy (CLSM) was used to monitor the intracellular distribution of nanoparticles. Results showed that MCF-7 cells incubated with AuNP to a sublethal concentration of 80 µg/mL (maximum concentration that showed effects on cell morphology without causing the death of cells according to data obtained from the analysis of viability) at different times, they showed an increase in surface roughness, whereas cells incubated with the control showed no significant changes in roughness. The effects of changes in the biomechanical property of the plasma membrane were observed with greater intensity at 12 h of incubation. Meantime, the LSCM showed the location of AuNP formed in clusters within the cell by determining spectral analysis nanoparticles emit 623 nm fluorescence signal in the wavelength. Through thus spectral analysis was possible to monitor the intracellular distribution of AuNP showing that at 6 h are dispersed in the cytoplasm while for 12 h are found in the nuclear periphery and for 24 h destabilization is cause of core. Z-stak analysis showed that from 6 h several agglomerates AuNP managed internalized into the nucleus proposing that the accumulation over time of exposure (24 h) generating organelle irreversible damage.

Based on these results it is concluded changes in the roughness of the plasma membrane of the cells is due to constant interaction with AuNP being incorporated via endocytosis and a process of excretion or exocytosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanotecnología aplicada al cáncer de mama

El cáncer de mama es uno de los padecimientos oncológicos que ocupa un gran interés en la medicina actual y donde tiene mayor presencia la nanotecnología; que va desde la síntesis de marcadores puntuales, así como agentes terapéuticos diseñados a base de nanomateriales [1]. La incursión de la nanotecnología en la terapia del cáncer de mama se da por la necesidad de desarrollar nuevas estrategias experimentales que proporcionen efectividad en los tratamientos empleando una reciente generación de bionanomateriales como marcadores y transportadores de fármacos, incluyendo diversos tipos de nanopartículas como los liposomas [2], dendrímeros [3], nanotubos de carbono [4], nanobarras [5], nanoesferas [6] y nanocápsulas [7, 8]. El avance en el desarrollo de nuevos nanomateriales y su aplicación en el área biomédica ha sido de mucho interés en los últimos años por un gran número de investigadores en todo el mundo. Los avances significativos que han surgido se encuentran en torno a la síntesis de nanomateriales con geometría controlada, propiedades fisicoquímicas especiales, carga superficial, tamaño adecuado para aplicaciones específicas y adaptación de polímeros bioactivos. Esto ha dado como resultado una mejor biocompatibilidad con las células cancerosas y orientación activa a través de la funcionalización con ligandos específicos hacia los tejidos tumorales, llevando al desarrollo de una amplia gama de nanomateriales que pueden reconocer diferentes tipos de cáncer, la administración específica de medicamentos antineoplásicos y destruir el tumor de manera eficiente empleando una variedad de técnicas terapéuticas como la fotodinámica [9], entre otras [10]. El uso de diversos tipos de nanopartículas contra el cáncer ha despertado un gran interés en el desarrollo de metodologías que mejoren las imágenes *in vivo* para el diagnóstico temprano, la administración específica de los fármacos en sitios específicos de células diana, transportadores de fármacos, agentes fototérmicos, agentes de contraste y radiosensibilizadores [11, 12, 13, 14]. La investigación de nuevas alternativas terapéuticas y de diagnóstico temprano implica el uso de nanopartículas de oro (AuNP) en la terapia eficaz contra esta enfermedad [15].

1.2 Propiedades de las AuNP

Las AuNP se han colocado en la vanguardia de la investigación contra el cáncer de mama en los últimos años debido a que presentan propiedades físicas importantes como la forma, tamaño, fácil modificación de su superficie, excelente biocompatibilidad factible para entornos clínicos y sobre todo por sus propiedades ópticas únicas proporcionadas por su Resonancia de Plasmón Superficial (RPS, efecto que surge de la interacción entre una onda electromagnética y los electrones de conducción de este metal) que depende principalmente del tamaño y forma de las nanopartículas [16, 17]. Las AuNP generan una dispersión máxima de luz que se puede lograr excitándolas con una longitud de onda de 543 nm, iluminándolas tan intensamente que se hacen visible para los sistemas de detección por microscopía óptica de alta resolución [18, 19]. Este singular comportamiento fotodinámico se encuentra muy influenciado por su geometría que las convierten en un excelente biomarcador para el diagnóstico temprano [10]. Cuando aumenta el tamaño de las AuNP, la absorción del plasmón superficial se maximiza acercándose ligeramente al rojo, por lo tanto cuando las nanopartículas forman conjuntos o agregados, la resonancia del plasmón aumenta y por ende su absorción, logrando un desplazamiento hacia la región cercana al infrarrojo del espectro de la luz. Además, cuando la geometría de las AuNP cambia de esferas a barras, el espectro de absorción de la RPS se divide en dos bandas: una de longitud de onda larga más fuerte en la región cercana al infrarrojo debido a la oscilación longitudinal de los electrones y una banda de longitud de onda corta más débil en la región visible alrededor de los 520 nm debido a la oscilación transversal de los electrones. Esa peculiar característica propicia que las AuNP sean una potencial herramienta para el diagnóstico del cáncer [20].

1.3 AuNP contra células cancerosas

El éxito de las AuNP en el tratamiento y en el diagnóstico del cáncer de mama depende de su adecuada interacción con las células cancerosas; por lo tanto, la incorporación y distribución en el interior celular para ejercer un efecto citotóxico eficaz sigue siendo poco comprendido. Las AuNP se han considerado una excelente alternativa terapéutica para contrarrestar los efectos letales del cáncer de mama, debido a sus características únicas, incluyendo su permeabilidad mejorada y retención en el tejido tumoral, absorción de luz y la presencia del fenómeno de resonancia de plasmón superficial cercano al infrarrojo [21], así como su interacción con una fuente de radiación para generar electrones secundarios y provocar un efecto hipertérmico, y su capacidad de ser

conjugadas con fármacos u otros agentes de interés farmacológico [22]. Como agentes transportadores de fármacos, las AuNP han mostrado un enorme interés gracias a la facilidad que poseen para ser funcionalizadas con una gran variedad de agentes químicos empleados en la terapia contra esta enfermedad y que pueden mejorar la farmacocinética. La captación, distribución intracelular y el efecto citotóxico de las AuNP sobre las células cancerosas depende en gran medida del tamaño, la concentración administrada, así como la forma (esferas, huecas, barras, estrellas, diamante) y la modificación de su superficie. Si bien las AuNP de diferentes formas y tamaños (1-100 nm) tienden a acumularse en diferentes células cancerosas, su cinética de absorción y toxicidad puede variar profundamente. Este fenómeno se encuentra asociado a la interacción de las nanopartículas con la superficie de la membrana plasmática y en general las cargas positivas en la superficie de las AuNP estimulan la absorción celular posiblemente debido a interacciones electrostáticas con la superficie de las células [23]. En el diagnóstico temprano del cáncer de mama se pueden emplear biomarcadores como receptores membranales que son cruciales para ser detectados y cuantificados con precisión en secciones de tumores individuales mediante el empleo de AuNP conjugados con anticuerpos específicos [24]. Marcadores moleculares de la superficie membranal de células de cáncer de mama han sido blancos farmacéuticos por su alta sobreexpresión en pacientes con esta enfermedad. La funcionalización de moléculas anti-HER2 (Trastuzumab) con AuNP ha despertado un gran interés ya que se ha observado que al ser expuestas en células SK-BR-3 y BT474 AZ LR (sensitiva y resistentes respectivamente) hay una mayor interacción del fármaco y una alta incorporación de AuNP al interior celular. Este fenómeno propicia que se estimule a las AuNP mediante la emisión de un láser cercano al infrarrojo provocando un efecto hipertérmico y su consecuente muerte celular por calor [25].

1.4 Propiedades biomecánicas de la membrana plasmática de las células cancerosas.

Se ha descrito que la transformación tumoral y la neoplasia están fuertemente asociadas con cambios significativos en el citoesqueleto celular [26, 27]. La desorganización del citoesqueleto puede desencadenar alteraciones en la estructura de la membrana plasmática y de sus propiedades biomecánicas [28]. Muchas técnicas como las TEM (Transmission Electro Microscopy por sus siglas en inglés), pinzas ópticas, aspiración por micropipeta y la AFM (Atomic Force Microscopy por sus siglas en inglés) se han empleado para estudiar los cambios en las propiedades biomecánicas y las nanoestructuras de la membrana plasmática (biomoléculas) en las células cancerosas las cuales

pueden servir como marcadores de detección en estadios tempranos del proceso tumoral. Recientemente se han desarrollado diversas técnicas microscópicas para estudiar las propiedades biomecánicas de las células [29]. La AFM representa una poderosa herramienta en el estudio de la interacción de las AuNP con las membranas de la superficie de células cancerosas [30, 31] comparado con otras técnicas como SEM (Microscopia Electrónica de Barrido) o TEM [32] que debido a sus limitaciones no es posible determinar dicha interacción. Las imágenes de AFM pueden ser representadas en tres dimensiones (3D) y ayudan en la medición de las variaciones del eje Z la superficie celular debido a la interacción de las nanopartículas con la membrana.

La AFM es la técnica más empleada para el análisis de las propiedades biomecánicas de las células de cáncer de mama debido a que presenta diversas ventajas como la fácil preparación de muestras, la capacidad de analizar las superficies celulares en condiciones naturales incluyendo en líquido y con una aplicación precisa de fuerzas con daño celular mínimo. Las imágenes topográficas y la fuerza de interacción entre la sonda del AFM y la superficie de la membrana pueden ser monitoreadas mediante esta técnica que puede proveer de información importante acerca de las propiedades biomecánicas de la célula tales como la elasticidad (parámetro biomecánica importante que indica rigidez de la célula), rugosidad superficial y viscosidad, estos dos últimos elementos fundamentales que reflejan el estado de la célula [29]. Estas propiedades dependen fuertemente de la regulación en la expresión de proteínas de adhesión celular como las integrinas y las caderinas. La baja expresión de estas moléculas propicia el desprendimiento de las células tumorales para iniciar su transporte hacia otras partes tisulares. En células metastásicas (MDA-MB-231) se ha encontrado que la reducción en la expresión de moléculas de adhesión genera alteraciones en sus propiedades biomecánicas [33].

La rugosidad superficial membranal es una de las propiedades biomecánicas de la célula que juega un papel importante en el estudio de la progresión tumoral. La información que se obtiene del análisis de este parámetro arroja información importante sobre los cambios que suceden en la superficie membranal de las células cancerosas como por ejemplo la sobre expresión de receptores asociados a proliferación y migración celular. Por ejemplo, la sobre expresión de la proteína SMAR1 (proteína de unión asociada a una región de la matriz celular) incrementa la rugosidad en células tumorales de mama. Estos cambios morfológicos en las células y tejidos cancerosos asociados a la sobreexpresión de esta proteína son un punto de referencia importante para el diagnóstico del cáncer así como la prevención del proceso de metástasis [34].

El parámetro de rugosidad se mide a través de la evaluación cuantitativa de las propiedades morfológicas de la superficie membranal de las células cancerosas mediante AFM. Esto significa que el análisis de la propiedad biomecánica asociada a la rugosidad de la membrana plasmática se basa en el siguiente planteamiento: en un terreno uniforme (poco rugoso), los vectores perpendiculares a la superficie del mismo serán aproximadamente paralelos y, en consecuencia, presentarán una dispersión baja (mide variaciones en la dimensión Z). Al contrario, en un terreno rugoso, los cambios de pendiente y orientación harán que dichos vectores presenten una dispersión mayor [Figura 1]. Una vez obtenidas las imágenes en el AFM, el software permite realizar análisis de sección en las imágenes de AFM que se obtienen en cualquier posición y dirección en la que se desee obtener un perfil de la superficie. La figura 2 ilustra los perfiles obtenidos a partir de diferentes cortes de sección hechos a una imagen donde se observa el análisis de sección realizado. Ahí se obtuvo un perfil del que se obtienen mediciones de altura y distancia entre los marcadores que pueden ser colocados en cualquier punto de interés.

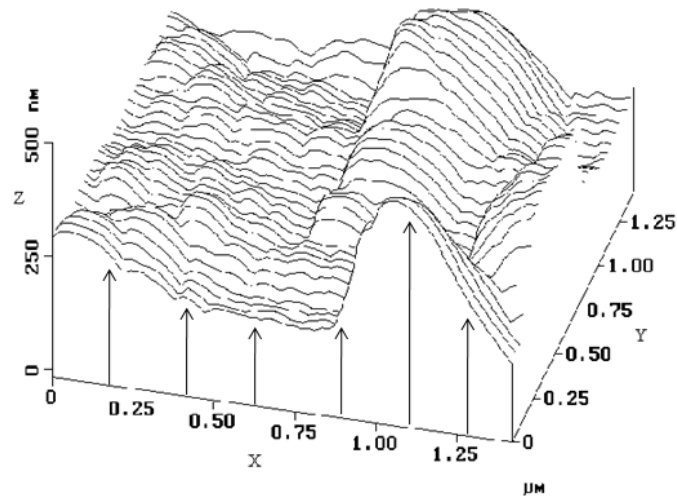
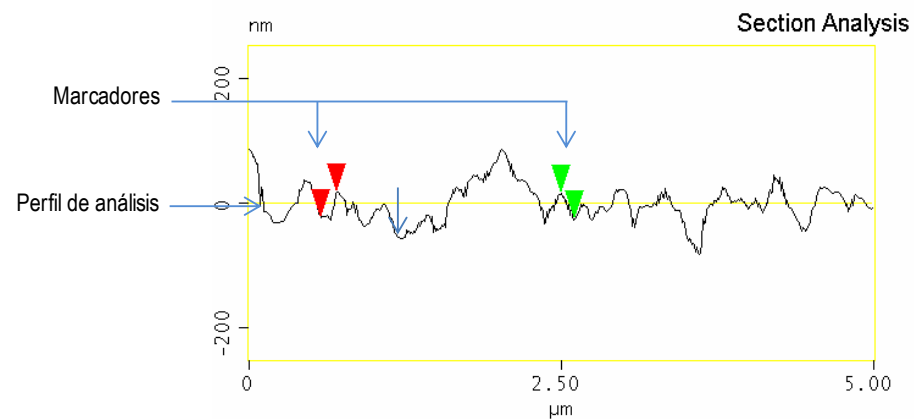
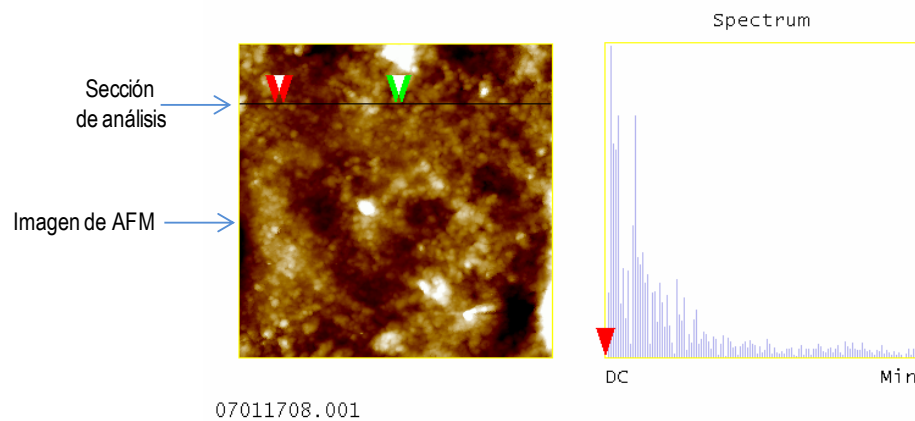


Figura 1. Análisis de rugosidad. Evaluación de las variaciones en la altura medida (vector Z). La rugosidad esta representara por R_q (RMS) (root-mean-square), que es la desviación estándar del total de las alturas medidas.



L	107.42 nm
RMS	14.128 nm
lc	DC
Ra(lc)	2.272 nm
Rmax	16.324 nm
RZ	8.032 nm
RZ Cnt	valid
Radius	39.244 nm
Sigma	16.534 nm



Surface distance	147.96 nm
Horiz distance(L)	126.95 nm
Vert distance	40.651 nm
Angle	17.755 °
Surface distance	146.66 nm
Horiz distance	107.42 nm
Vert distance	41.400 nm
Angle	21.076 °
Surface distance	
Horiz distance	
Vert distance	
Angle	
Spectral period	DC
Spectral freq	0 / μm
Spectral RMS amp	0 nm

Datos obtenido de la medición de los marcadores

Figura 2. Análisis de sección sobre la superficie membranal de células cancerosas por AFM. Análisis de Sección para una imagen de AFM donde se obtienen datos sobre la topografía y rugosidad superficial.

2. ANTECEDENTES

2.1. Interacción de las AuNP con la membrana celular

La comprensión de la interacción e internalización de las AuNP con la membrana celular puede ayudar al desarrollo de un instrumento efectivo para el transporte de quimiofármacos altamente selectivos. Los cambios en las características superficiales de las AuNP y de las propiedades de la membrana plasmática de las células cancerosas influyen en la adecuada adhesión con la superficie celular. Sin embargo, no existe la forma de determinar directamente la interface de la interacción entre la AuNP y la superficie de la membrana plasmática. La membrana plasmática es el primer sitio de contacto entre las nanopartículas y las células. La interacción AuNP-membrana se ve severamente afectadas por las propiedades de superficie de las AuNP como tamaño, forma y carga [35]. Se han demostrado que la interacción de AuNP con la membrana plasmática de células de riñón de mono verde africano (VERO; riñón verde) genera cambios en las propiedades mecánicas de la membrana plasmática (rugosidad) provocando la formación de poros y permitiendo una mayor permeabilidad de la nanopartículas en la membrana [36, 37]. Hong y Col., observaron que existe la disrupción de la membrana plasmática de células KB (carcinoma epidermoide) y Rat2 (células de fibroblasto de ratón) cuando son incubadas con nanopartículas poliméricas. Sus observaciones incluían la formación de poros nanométricos a lo largo de la superficie membranal de las células aumentando la permeabilidad membranal [38]. En otro estudio se observó que la formación de estos “nanoporos” se debe a la interacción de las nanopartículas poliméricas con la membrana plasmática y su posterior incorporación mediado por procesos de endocitosis cuando se analizaron por AFM [39].

En un estudio realizado por Zhang y colaboradores, detectaron que AuNP de 13 nm de diámetro provocaron un efecto citotóxico en células de carcinoma mamario metastásicas MDA-MB-231 asociado al proceso de captación por endocitosis, mediado por receptores (clatrin y caveolinas), formando vesículas endosómicas que posteriormente fueron envueltas dentro de lisosomas y autofagosomas, provocando la disrupción de la arquitectura y estructura interna de la célula llevándola finalmente a su muerte [40]. Por su parte, Kang y Cols., demostraron que AuNP de 30 nm de diámetro provocan graves daños a la estructura nuclear de células, llevándolas a la apoptosis por muerte celular programada y de un arresto de la citoquinesis. Estos resultados fueron obtenidos

mediante la emisión de una señal fluorescente de las AuNP al ser funcionalizadas con el fluorocromo FITC y detectándolas mediante microscopia confocal [41].

García y Cols., utilizaron TEM para estudiar los fenómenos de interacción entre AuNP y células de leucemia THP-1. Los resultados mostraron la distribución uniforme de AuNP de 35 nm sobre la superficie de la membrana plasmática y posteriormente estas fueron incorporadas hacia el interior. Sin embargo, observaron que AuNP de menor tamaño (5 nm) provocan modificaciones en la superficie membranal al formarse conglomerados que posteriormente son captados por la membrana plasmática. Las AuNP de 15 nm provocaron mayor rugosidad en la superficie membranal al entrar en contacto con la célula y, a diferencia de las nanopartículas de los diferentes tamaños, detectaron una mayor incorporación, fenómeno que lo asocia con la capacidad de agregación en el medio de cultivo [42].

2.2 Modificaciones en la superficie de la membrana por efecto de la interacción con AuNP

Recientemente se ha observado que la captación celular de nanopartículas es un proceso que consta de dos etapas; en primer lugar, las nanopartículas inicialmente se adhieren a la superficie de la membrana plasmática y subsecuentemente son internalizadas por la célula a través de mecanismos dependientes de energía. Posteriormente son incorporadas hacia el interior de las células y transportadas hacia diferentes compartimentos subcelulares que normalmente termina en la acumulación lisosomal como lo demostró Taylor y Cols [43]. Así mismo, se ha demostrado que la incorporación de AuNP modula la rugosidad y elasticidad de la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, tanto maligno como normal, y los subsecuentes eventos intracelulares río abajo de la membrana plasmática [44]. Algunos de los mecanismos de acción que provocan este efecto puede estar asociado a la interacción iónica entre las AuNP y la superficie membranal, fenómeno asociado al potencial negativo de la membrana (cuando la membrana es permeable a iones positivos) de algunas células que interactúan con AuNP con densidad de cargas positivas diferentes, así como a la desestabilización de los complejos de adhesión focal e intercelulares, generando poros que permite el paso de las AuNP a su interior provocando disrupción del citoesqueleto dando como resultado la modulación de la rugosidad de su superficie [45, 46, 47].

Tapia y colaboradores (2009) emplearon la AFM para estudiar los efectos de la interacción de AuNP con la superficie de células HeLa. Los resultados mostraron la presencia de grandes aglomerados

de AuNP sobre la superficie de la membrana plasmática de las células analizadas y observaron que este fenómeno incrementa la rugosidad superficial conforme avanzaba el tiempo de incubación. Esta investigación propone que la modificación en la rugosidad de la membrana plasmática es paulatina debido a la acumulación de las AuNP sobre la superficie membranal, sin embargo al paso del tiempo estos aglomerados se van incorporando al interior celular alterando la estabilidad de la membrana plasmática y permitiendo el paso de otros agentes externos que pueden ser nocivos para las células [31].

2.3 Incorporación y distribución intracelular de las AuNP

La comprensión y control de la interacción e incorporación de AuNP son de suma importancia para desarrollar una terapia efectiva contra el cáncer de mama. Diversos estudios han analizado los procesos de captación de AuNP y su distribución intracelular, tal es el caso de Nativo y Cols. [48] que demostraron la incorporación de AuNP utilizando TEM y CLSM donde observaron que las AuNP son endocitadas a través de proteínas ancladas a la membrana plasmática (caveolinas y clatrin) para posteriormente desplazarse al interior celular mediante endosomas. Al estar dentro de la célula se produce una distribución intracelular de las AuNP en diversos sitios del citosol, lo que conlleva a un efecto citotóxico provocando daño en los niveles subcelulares y moleculares, efectos que provocan la modulación de varios procesos moleculares implicados en la sobrevivencia o muerte celular [49; 50]. La observación directa de la interacción de AuNP con el núcleo ha sido de suma importancia en la investigación del efecto nocivo ocasionado por estos nanomateriales y su aplicación como agentes desestabilizadores de la estructura nuclear, ya que interrumpen la función del organelo y provocan una extrema deformación llevando a la célula a un colapso irreparable [51]. Se debe considerar que la captación intracelular depende de una serie orquestada de eventos que requieren una coordinada función de lípidos y proteínas de la membrana plasmática. Además de la dinámica de la membrana, el papel del citoesqueleto también debe tenerse en cuenta, ya que es fundamental para el tráfico intracelular de las AuNP [52]. La distribución de las AuNP en el interior celular afecta la función general de las células ya que las nanopartículas viajan a través del citoplasma a los diferentes organelos intracelulares provocando daños irreparables como lo demostró Taggart y Cols., [53] al observar que AuNP generaban daño mecánico al ADN; así como, a la mitocondria de células de carcinoma mamario MDA-MD-231, células de cáncer de próstata (DU-145) y de células de glioma humano (T98G). Los resultados mostraron que las AuNP provocaron

fragmentación del núcleo cuando las nanopartículas entraban en contacto con el organelo, del mismo modo la presencia de AuNP en la mitocondria provoco daños excesivos que se tradujeron en la despolarización de su membrana debido a la presencia de radicales libres y una alta concentración de calcio intracelular. La inducción de especies reactivas de oxígeno induce estrés oxidativo y finalmente la muerte celular por apoptosis. La información recabada de este estudio indico que la concentración de AuNP en la mitocondria está asociado directamente con el daño ocasionado en el núcleo y también la distribución intracelular afecta los componentes celulares internos y que también se ven reflejado en la membrana plasmática [53].

3. JUSTIFICACIÓN

El papel de las AuNP en la lucha contra el cáncer de mama ha sido estudiado intensamente para desarrollo de terapias alternativas, debido a sus propiedades físicas y excelente biocompatibilidad (nulo rechazo por el sistema inmunológico), que generen elementos específicos para el diagnóstico temprano y tratamiento eficaz contra esta enfermedad; sin embargo, no han sido determinados con claridad los mecanismos que influyen en su interacción con la superficie de las células cancerosas, así como el papel que juegan en los procesos fisiológicos cuando son internalizadas por las células. Si bien se han realizado investigaciones en el campo de la interacción AuNP-membrana celular, no se han detectado con precisión los efectos que estas ocasionan en la membrana por efectos de la interacción e incorporación de las AuNP por lo que se desarrolló el presente trabajo de investigación, el cual busca comprender los cambios en las propiedades biomecánicas (particularmente la rugosidad) de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario humano. Los resultados permitirán comprender con más detalle los cambios que ocurren en la membrana plasmática de las células asociados con las internalización de las AuNP y de esta manera se podrá plantear nuevos procedimientos para el desarrollo de sistemas de Nanoterapia dirigida y contrarrestar los efectos secundarios de las quimioterapias.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios, a nivel nanométrico, en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 que genera la captación de AuNP de 20 nm, así como su distribución intracelular.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la concentración de AuNP y el tiempo de incubación óptimos, en función de la viabilidad celular, para analizar los cambios en la rugosidad de la membrana de las células MCF-7.

Analizar la captación y distribución intracelular de las AuNP en células MCF-7, mediante la emisión de fluorescencia detectada por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

Cuantificar los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7, inducidos por la incubación con AuNP mediante Microscopía de Fuerza Atómica.

5. HIPÓTESIS

Si la interacción de las AuNP con la superficie de la membrana celular, así como su incorporación y distribución intracelular afectan su rugosidad. Entonces empleando el análisis de rugosidad mediante imágenes de alta resolución por AFM y análisis de espectro de emisión por MCBL, es posible observar el fenómeno de incorporación y también los cambios dinámicos en la superficie de la membrana plasmática de las células por el proceso de captación de AuNP de 20 nm de diámetro.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo de investigación la interacción de las AuNP de 20 nm de diámetro, con la superficie de la membrana plasmática de las células de carcinoma mamario MCF-7 fue caracterizada empleando análisis cuantitativos y cualitativos por AFM. El análisis de incorporación y distribución intracelular fueron realizados a través microscopia confocal de barrido laser mediante la emisión de la señal fluorescente que generaron las AuNP desnudas. Para determinar los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática antes y después de la incubación con AuNP, las células fueron fijadas mediante un tren de deshidratación por etanol a diferentes concentraciones (absoluto, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 96% respectivamente). Para visualizar los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de las células ocasionados por la interacción de las AuNP a diferentes tiempos de incubación (0, 6, 12, 18 y 24 h) se realizó el análisis de cambios de rugosidad en la superficie membranal empleando imágenes de altura y análisis topográficos en el modo tapping.

6.1 Reactivos. Las células de carcinoma mamario humano MCF-7 fueron adquiridas de la empresa American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). El medio Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM), el Suero de Feto Bovino (SFB) se adquirió de Life Technologies (Gaithersburg, MD) y el antibiótico-antimicótico fueron adquirido de Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). El anticuerpo DAPI se adquirió de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), signal Cell Technology, Beverly, MA. Las nanopartículas de oro coloidal esféricas de 20 nm de diámetro fueron obtenidas de BBI International (UK) para uso exclusivo de investigación. Todos los reactivos químicos son de grado investigación.

6.2 Cultivo celular. Las células MCF-7 fueron cultivadas en medio DMEM el cual contenía 10% de SBF hasta alcanzar una confluencia del 90% y la formación de una monocapa. Antes de los tratamientos, las células fueron sincronizadas mediante la deprivación secuencial de SBF, esto significa que después de haber alcanzado la confluencia adecuada se cambió el medio DMEM sin rojo fenol por uno que contenía SBF al 5% durante 24 h para finalmente reemplazarlo por medio DMEM con SBF al 2.5% tratado con carbón-dextran (SBFC), L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (100 mM), piruvato de sodio (100 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/mL) y antimicótico anfotericina B (250 ng/ml), también durante 24 h Las células se incubaron a

una atmósfera y 5% de CO₂ a 37°C. En todos los experimentos las células fueron cultivadas en alta confluencia.

6.3 Experimentos

Las células MCF-7 fueron expuestas a los siguientes tratamientos: se emplearon AuNP de 20 nm de diámetro en diferentes concentraciones como se menciona en la tabla 1. Se usó agua ultrapura (MilliQ) como control (Vehículo).

Tratamientos: AuNP a 20, 50 y 80 µg/mL, así como el vehículo.

Tiempo de exposición: 6, 12, 18 y 24 h.

6.4 Análisis de viabilidad celular. Se empleó el ensayo de viabilidad por exclusión de azul tripano (Life Technologies, Gaithersburg, MD) para determinar el porcentaje de viabilidad de las células que fueron incubadas con las AuNP a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. El azul tripano es un colorante derivado de la toluidina, caracterizado por tener la capacidad de teñir la membrana plasmática de las células muertas pero no de células vivas. Este principio se basa en el hecho de que las células vivas tienen intacta una membrana plasmática e inhiben el paso de determinadas sustancias como el colorante, mientras que las células muertas han perdido esta cualidad en su estructura membranal permitiendo que el colorante del azul tripano pase a través de la membrana. Por lo tanto las células muertas se muestran con el distintivo color azul bajo el microscopio. Esta prueba es utilizada para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células. Las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 20 pocillos (10,000 células por pozo) durante 24 h. Posteriormente se incubaron con una mezcla de medio DMEM más AuNP a las diferentes concentraciones empleadas (20, 50 y 80 µg/ml) a diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Transcurrido el tiempo de incubación, las células con las AuNP fueron removidas de los pozos mediante la adición de 3 ml de tripsina por 3 min y depositadas en tubos eppendorf de 5 ml para centrifugarlas durante 5 min a 1000 rpm y finalmente retirar el sobrenadante. Posteriormente, se tomó una alícuota de 90 µL de la suspensión celular recogida previamente en tubos eppendorf y para depositarla en otro tubo eppendorf de 0.5 mL al cual se le adiciono 10 µL del colorante azul tripano, se mezcló de manera homogénea y se incubo por 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó el recuento celular en la cámara de Neubauer donde se añade

una pequeña cantidad de la mezcla (20 μL) de células y azul de tripano sobre el portaobjetos de la cámara y se coloca un cubreobjetos sobre la muestra. Posteriormente se enfocaron las cuadrículas donde se localizaron las células que en los recuadros divididos en 16 secciones como se muestra a continuación:

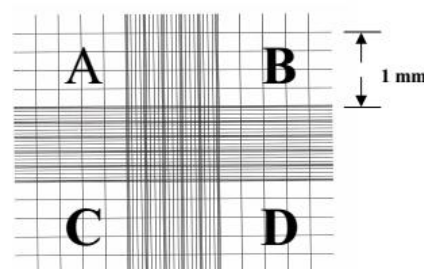
Amplificación de una cámara del hemocitómetro

Conjunto de 16 cuadrículas (1)

Volumen de recuento= 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

$$V= 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3$$

Factor de la cámara= 10^4



Finalmente las células son contadas mediante un microscopio invertido. El porcentaje de células viables se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación del análisis de viabilidad:

Células Viables (%)

$$= \frac{\text{Número total de célula viables por mL de la alicuota}}{\text{Número total de células por mL de la alicuota}} \times 100$$

6.5 Análisis de la morfología celular. El análisis de la morfología celular se realizó mediante el uso de un microscopio invertido Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss (GmbH, Jena, Germany), equipado con una cámara Cannon PowerShot A640, empleando un objetivo ocular 10 X. Se analizaron las células que fueron expuestas a las AuNP bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas. Los parámetros que se midieron fueron cambios en la forma celular (de alargada a circular o esferoide), la aparición de células flotando en el medio de cultivo.

6.6 Microscopia de Fuerza Atómica. Las imágenes y análisis de la superficie de la membrana plasmática de las células MCRF-7 fueron obtenidos mediante un AFM NanoScope IIIa y IV Multimode (Veco Inc., EE.UU) en el modo de altura-tapping (oscilación constante) usando sondas limpias estándar de nitruro de silicio (Si_3N_4) con una frecuencia de resonancia promedio de 256 y 365 kHz, y una constante de resorte de 20-80 pN/nm. Todos los parámetros para la adquisición de las imágenes fueron ajustadas manualmente de manera constante con la finalidad de mantener la

señal óptima y la resolución adecuada. Los valores de amplitud del cantiléver se mantuvieron en aproximadamente 1.500 mV y un setpoint de 1.3 V. La velocidad de barrido de la sonda se mantuvo entre 0.3 y 0.9 Hz, todo obtenido en condiciones de aire.

6.7 Cultivo celular en placas de oro para AFM. Se sembraron células MCF-7 sobre placas de vidrio recubiertas con una monocapa de oro (Au (111)) que consiste en un soporte rectangular de vidrio de 2 mm de espesor, una película de cromo de 200 nm que recubre el cristal y que funcionó como capa de adhesión para la película de Au de 2000 nm. Las placas fueron previamente esterilizadas por autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión (120°C).

Las placas de oro fueron colocadas en cajas Petri que contenía 3 mL de la mezcla de ampicilina-estreptomicina para evitar contaminación fúngica y bacteriana durante 30 min. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se transfirieron las placas de oro en cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular de 6 pozos y enseguida se adicionaron 100 μ L de la suspensión celular sobre la superficie de la placa, posteriormente se dejó que las células se adhirieran al substrato (3 h aproximadamente) y posteriormente se adicionó un volumen final de 300 μ L de DMEM con SBF al 10% de manera cuidadosa para evitar desprendimiento de las células del substrato. Cabe mencionar que en este proceso también se llevo a cabo la sincronización celular mediante la técnica de privación secuencial de SBF como se describió anteriormente. Posteriormente se removió el medio para administrar el tratamiento con la mezcla de DMEM+AuNP a 80 μ g/mL e incubar a 6, 12, 16 y 24 h. Al término de los tratamientos, las células se fijaron por deshidratación secuencial con etanol a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 96%) durante 2 min en cada concentración y finalmente se analizaron por AFM en modo tapping.

Las células fueron seleccionadas por microscopía óptica acoplada a AFM (Nikon, Japón) buscando morfología normal (alargada) de las células, con la finalidad de realizar un correcto análisis por el escáner AFM. El análisis se realizó en células individuales obteniendo imágenes de 100 x 100 μ m para localizar una célula individual, y posteriormente se realizaron análisis sobre la superficie de la célula donde se obtuvieron imágenes de 50, 20, 10, 5, 2,5 y 1 μ m² de manera secuencial a lo largo de tres diferentes zonas de la célula y en tres células diferentes por triplicado en los modos de altura, fase y amplitud. Tiempo de adquisición para cada imagen fue de aproximadamente 20 min. Se realizó el análisis de imágenes utilizando el software r3003-AFM-NanoScope III (Veeco Inc).

6.8 Análisis de la rugosidad superficial de las células MCF-7. Para los análisis de la superficie de la membrana plasmática, las placas de vidrio fueron introducidas en una placa de cultivo de 24 pozos donde se colocó una placa individual en cada pozo para posteriormente depositar 10,000 células en 20 μL directamente sobre la superficie de Au y finalmente llevándola a un volumen final de 400 μL con DMEM + SFB al 5%. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 h, hasta alcanzar 70% de confluencia, posteriormente se cambió el medio a uno nuevo con baja concentración de SBF para sincronizar las células. Las células fueron incubadas con los tratamientos correspondientes DMEM + 5% de FBS + AuNP 80 $\mu\text{g/ml}$ a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h). Finalmente las células se fijaron mediante un tren de deshidratación por etanol a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 96% durante 2 min en cada una de las concentraciones. El área de escaneo para todos los análisis de rugosidad fue de 5 y 1 μm^2 .

6.9 Captación celular y distribución intracelular de las AuNP. Para el análisis de la emisión de fluorescencia e incorporación de las AuNP, las células fueron cultivadas en cajas de cultivos especiales para microscopia confocal de 8 pocillos (Lab-Tek II Chamber Slides) durante 24 h donde fueron sincronizadas mediante el mismo método de deprivación secuencial de SBF. Posteriormente se incubaron con AuNP a una concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ durante 2, 6, 12, 18 y 24 h. Por su parte, las células control fueron incubadas con agua ultrapura (vehículo) a los mismos periodos que las células tratadas con AuNP. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con solución salina de fosfatos (PBS) y fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS. Posteriormente, las células se incubaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) para teñir los núcleos y se montaron con medio de montaje para la inmunofluorescencia (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Los análisis de emisión espectral y de fluorescencia se realizaron utilizando un Microscopio Confocal de Barrido Láser de fotón múltiple (Carl Zeiss, LSM-780 NLO).

6.9.1 Análisis estadístico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en al menos tres experimentos diferentes, los datos se presentan como medias \pm DE. Se empleó el software GraphPad Prism (San Diego, CA) para el análisis de variancia (ANOVA). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la concentración/tiempo de incubación de AuNP en las células MCF-7

El potencial uso de las AuNP en el tratamiento contra el cáncer de mama depende de su adecuada interacción e incorporación en las células cancerosas. La membrana plasmática es la primera barrera celular con la que estos nanomateriales entran en contacto, y tanto la forma como el tamaño de las AuNP juegan un papel importante en la correcta captación celular. Actualmente se ha demostrado que la exposición de estas nanopartículas a diferentes tipos celulares puede generar un efecto citotóxico irreversible determinado por la vía de incorporación, concentración y el tiempo de exposición de estos nanomateriales en un sistema biológico [23].

En este contexto, el primer objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones subletales de las AuNP que se utilizaron en los estudios de incorporación a través de un estudio de viabilidad celular empleando el método de incorporación de azul tripano. Se incubaron células MCF-7 a concentraciones de 20, 50 y 80 $\mu\text{g/mL}$ por 24, 48 y 72 h de incubación tomando en cuenta la información recabada por la bibliografía revisada donde muestran que a estas condiciones con concentraciones por arriba de 100 $\mu\text{g/mL}$ el efecto de las AuNP son citotóxicas (véase capítulo 2). Los resultados obtenidos señalan que las AuNP no inducen disminución de la viabilidad cuando se incuban durante 24 h. Los efectos significativos ($p < 0.05$ vs V_h) sobre la viabilidad de las células MCF-7 fueron observados a las 48 h de incubación únicamente con la concentración más alta de AuNP, es decir a 80 $\mu\text{g/mL}$, y a las 72 h con las tres concentraciones estudiadas como se muestra en la gráfica de la Figura 3. Es necesario aclarar que este objetivo solo buscaba demostrar las condiciones adecuadas para la realización de los análisis de rugosidad en la superficie de la membrana de las células estudiadas por lo que no se pretendió encontrar las concentraciones letales (citotoxicidad).

7.2 Efecto de las AUNP sobre la morfología de células MCF-7

Para determinar el efecto de las AuNP sobre la estructura morfológica de las células MCF-7, se realizó análisis morfológico mediante microscopía óptica donde se observó (Figura 4) que los cambios estructurales más evidentes fueron en aquellas células que se incubaron con 80 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP durante 48 y 72 h, en comparación con las células incubadas con el vehículo (H_2O -MilliQ), mientras que las células que se incubaron con las concentraciones de 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP se

observó que los efectos sobre la morfología celular se generaron a partir de las 48 h de incubación. Los cambios observados incluyeron la reducción del tamaño de las células, la formación de estructuras esferoidales, en lugar de su forma alargada normal, y el consecuente desprendimiento del substrato, lo cual es representativo de muerte celular [54]. La obtención de estos resultados permitió establecer las condiciones idóneas para el estudio de los procesos, a nivel de la membrana plasmática, de la incorporación de AuNP esféricas de 20 nm, utilizando la concentración de 80 µg/mL y en tiempos de incubación inferiores a 24 h.

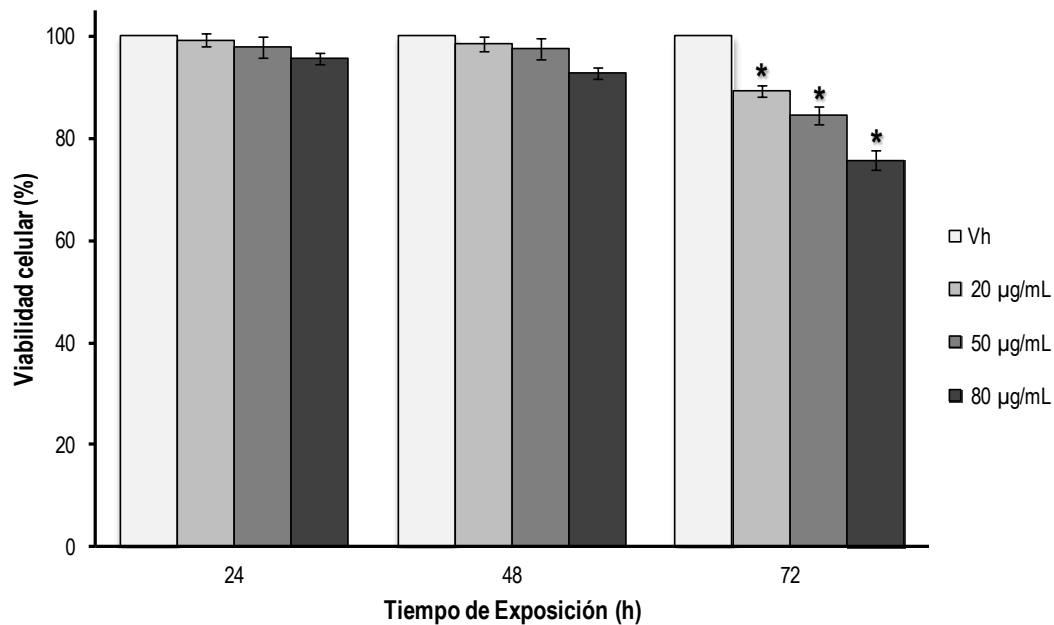


Figura 3. Efectos subletales de las AuNP sobre la viabilidad de las células MCF-7. Las células MCF-7 fueron incubadas con diferentes concentraciones de AuNP (20, 50, 80 µg/mL) durante 24, 48 y 72 h y el análisis de viabilidad fue realizado a través del ensayo de exclusión de azul tripano. Los resultados del ensayo mostrados en la Figura 2, exhiben un efecto dependiente de la dosis y del tiempo de exposición de las AuNP sobre las células tratadas en comparación con las células que fueron expuestas solo al vehículo. La gráfica representa los valores obtenidos del análisis de viabilidad donde se muestra que la concentración más alta (80 µg/mL) provoca disminución del porcentaje de viabilidad en los tres tiempos de incubación, observándose el efecto máximo a las 72 h. Esta información fue la base para la realización de los siguientes experimentos determinando que el tiempo máximo de exposición de las AuNP sobre las células MCF-7 es a las 24 h de incubación. Todas las barras de error representan la desviación estándar de al menos n=9 medidas. Los asteriscos indican la diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

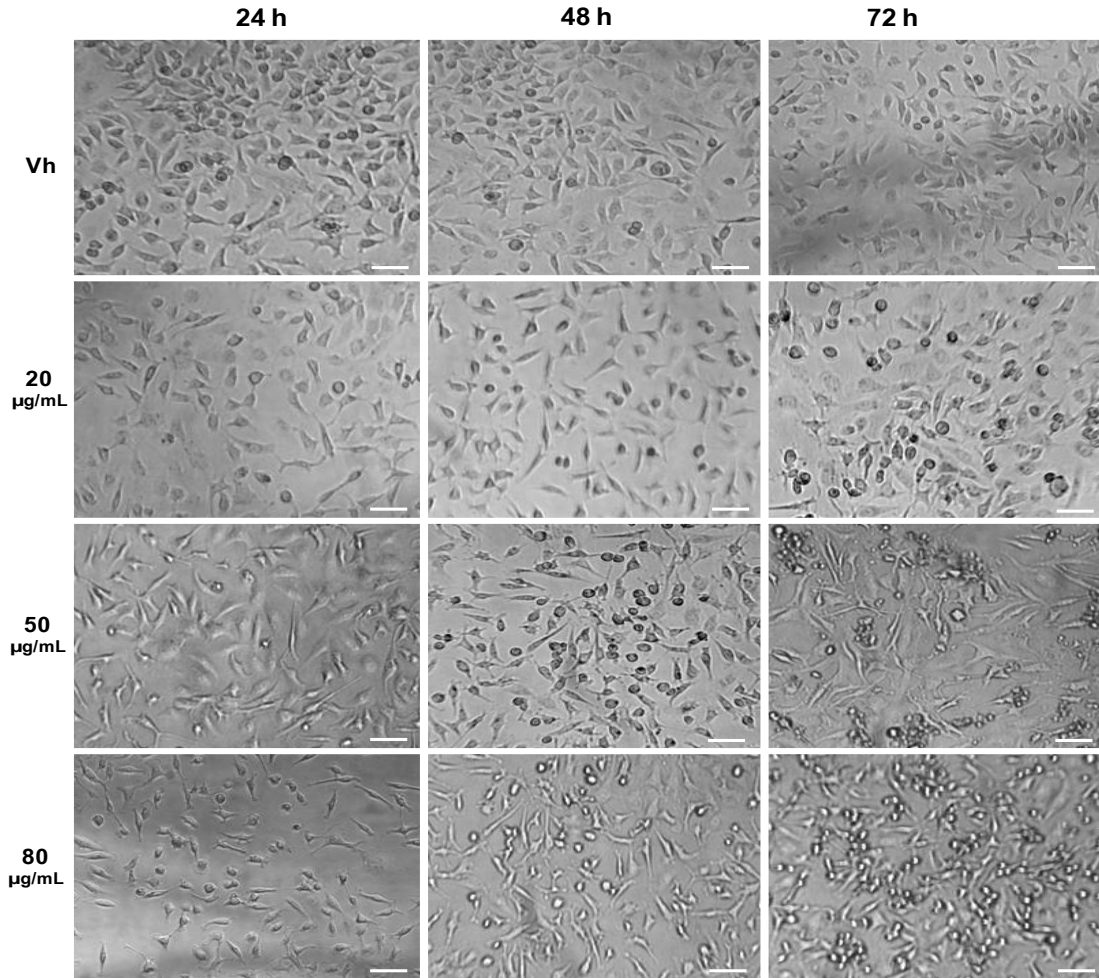


Figura 4. Efecto a nivel morfológico de las diferentes concentraciones de AuNP sobre las células MCF-7. El análisis morfológico por microscopía óptica mostró que la morfología celular se modificaba con respecto al tiempo de incubación con las diferentes concentraciones de AuNP. Sin embargo, efecto maximo fue observado cuando las células fueron incubadas con la concentración más alta (80 $\mu\text{g/mL}$) desde las 48 h. Los datos arrojaron que la estructura celular fue alterada a las 72 h de incubación con 20 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a 50 $\mu\text{g/mL}$ desde las 48 hrs. Este fenómeno es atribuido al daño que mecánico, ocasionado por las AuNP sobre las células. Los parámetros que se consideraron para determinar el cambio en la morfología celular fueron: alargamiento de las extensiones citoplasmáticas (células viable), perdida en la adhesión al substrato (células flotando en el medio), células esferoidales (muertas) que han perdido su estructura original. En las células tratadas con la mayor concentración y a 24 h no se observaron tanto estos cambios en comparación con el control. Todas las imágenes fueron adquiridas en una magnificación original de 40X.

7.3 Caracterización de las regiones de análisis en la superficie celular

La AFM se caracteriza por el análisis de la superficie de una muestra a través de una sonda la cual recorre el área de estudio mediante una punta afilada de forma piramidal o cónica que tiene un final promedio de 20 nm y que se encuentra anclada a una viga o cantiléver, la cual funciona como una palanca microscópica flexible y muy sensible que sirve como sensor de cambios en el relieve de una superficie. Al presentar estas características, altas diferencias en las dimensiones de altura sobre la superficie de una muestra provoca graves daños en la sonda, produciendo información errónea del análisis de barrido y forzando al cantiléver a flexionarse severamente de tal forma que alcance su ruptura. Por su parte, la superficie membranal de una célula animal está cubierta por una gran cantidad de moléculas biológicas que le confiere enormes diferencias topográficas a lo largo de toda la superficie celular.

Con la finalidad de evitar la obtención de datos erróneos provocados por artefactos mecánicos ocasionados por un mal barrido de la sonda de AFM sobre la superficie membranal, así como la obtención de imágenes con falsos positivos decidimos realizar varios barridos en diferentes zonas de la membrana plasmática de las células MCF-7 etiquetadas como control a modo de obtener datos homogéneos en los valores de RMS[Rq]. En primer lugar se realizaron barridos en tres zonas de la superficie celular comenzando con la región del extremo de la célula, es decir la región que denominamos como borde (corresponde a la zona donde la extensión celular termina y se encuentra el sustrato), posteriormente se analizó la zona del citoplasma y finalmente la región que corresponde a la zona nuclear. En la figura 5 se muestra una célula MCF-7 analizada mediante AFM en modo altura donde se marcan las zonas de análisis por las cuales se determinaron las condiciones necesarias que llevaron al análisis de rugosidad de la membrana plasmática de las células estudiadas. En este experimento se analizaron por lo menos 3 regiones de 3 diferentes células que fueron incubadas solo con el vehículo (control) por 12 h solo para establecer las zonas que presentaran mayor homogeneidad. En la Figura 5A se muestra una célula a $50 \mu\text{m}^2$ de área de barrido donde se señalan las regiones analizadas e indicadas como: b=Zona del Borde: esta representa la región que corresponde a la zona entre la extensión citoplasmática y la superficie del sustrato; i= Zona Intermedia: se refiere a la zona denominada como región citoplasmática donde no se observaron altos relieves; finalmente n= Zona Nuclear y está representada por la región que cubre al núcleo y nucléolo. La imagen 5B describe una representación gráfica del barrido de la

sonda y las regiones donde hay mayor flexibilidad de la sonda encontrando que la región nuclear es la más irregular (5C).

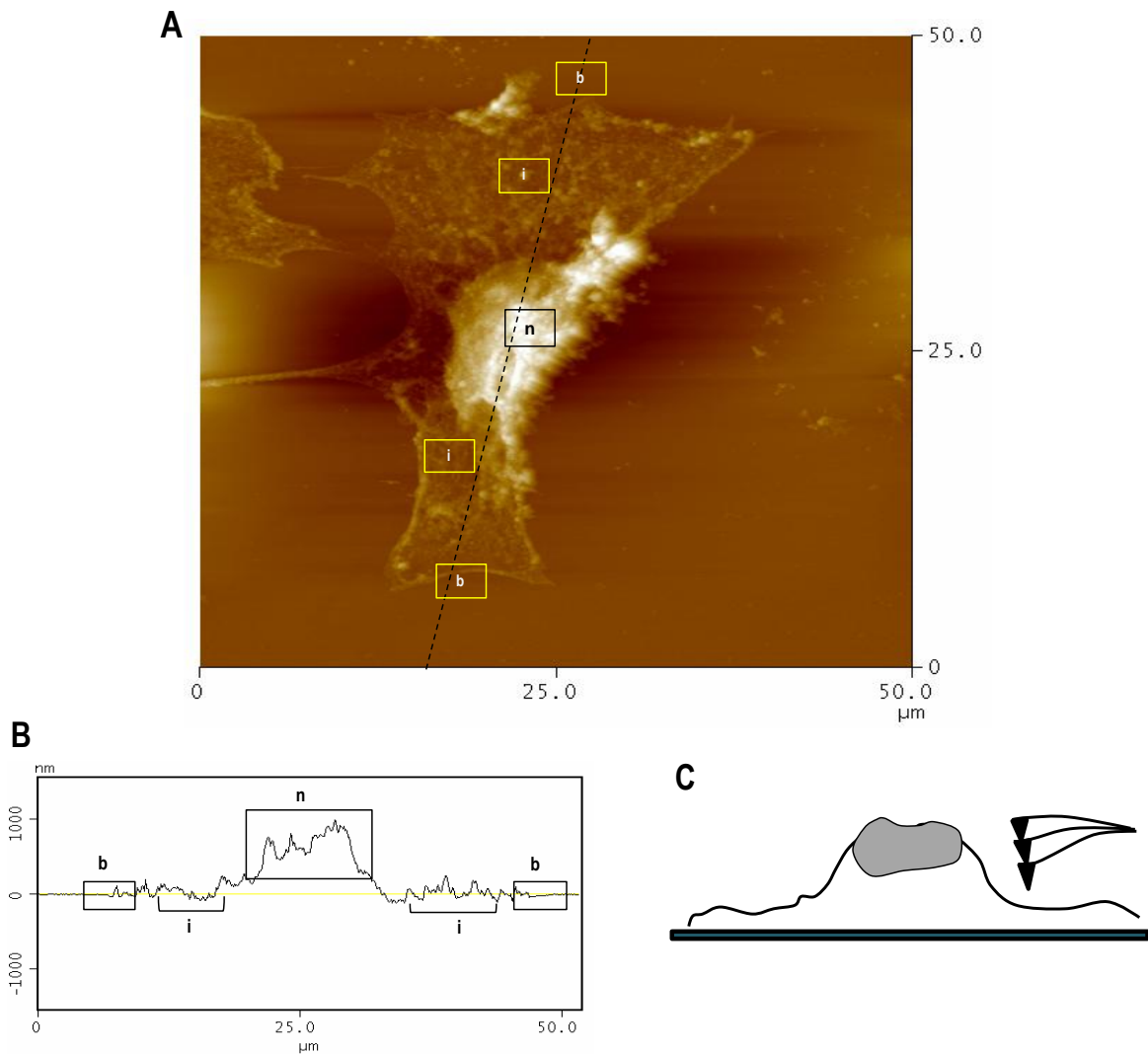


Figura 5. Análisis topográfico de alta resolución por AFM de una célula MCF-7 en diferentes zonas de la superficie membranal. (A) Imagen de una célula MCF-7 donde se señalan las regiones escaneadas y las que representaron mejor sitio de análisis proporcionado por el barrido de la sonda. (B) Gráfica del análisis microtopográfico de las diferentes regiones analizadas y donde se muestran las diferencias de rugosidad dando como datos relevantes que las zonas del núcleo presentan grandes diferencias en altura lo que provoca daño a la sonda y hasta su posible desprendimiento como se ejemplifica en el esquema (C).

Como se muestra en la figura 6, las diferentes regiones de análisis mostraron que la zona denominada borde tenían valores de rugosidad inferiores a 20 nm de acuerdo a los valores de RMS[Rq]/nm debido a la relación que existe entre la rugosidad de la extensión citoplasmática y la superficie del sustrato donde se encontraba adherida para su crecimiento. La superficie del sustrato muestra resultados de rugosidad uniformes como se mostró anteriormente en trabajos realizados en el Laboratorio de Nanotecnología [31] y sin variación alguna en cuanto la sonda recorría esa región y subía a la membrana plasmática de la célula MCF7, fenómeno atribuido a la expansión de la matriz extracelular sobre la monocapa de oro (Figura 6A). La región que corresponde a la zona nuclear mostró una gran variación en los valores de rugosidad en diferentes puntos de dicha región, la figura 6B muestra la gráfica de los datos obtenidos en los análisis y la relación de rugosidad en la zona nuclear es significativamente diferente a la encontrada en las zonas intermedias alcanzando valores promedio de 70 ± 12 nm, mientras que la zona intermedia (citoplasmática) mostró resultados de rugosidad que cercano a los 42 ± 5 nm en los valores de RMS[Rq]. Los resultados obtenidos en estos análisis sugieren que las regiones que mostraron una mayor homogeneidad en la rugosidad de su superficie correspondieron a la zona del citoplasmática o intermedia por lo que con estos datos se establecen las zonas de análisis para las células que fueron expuestas a las AuNP.

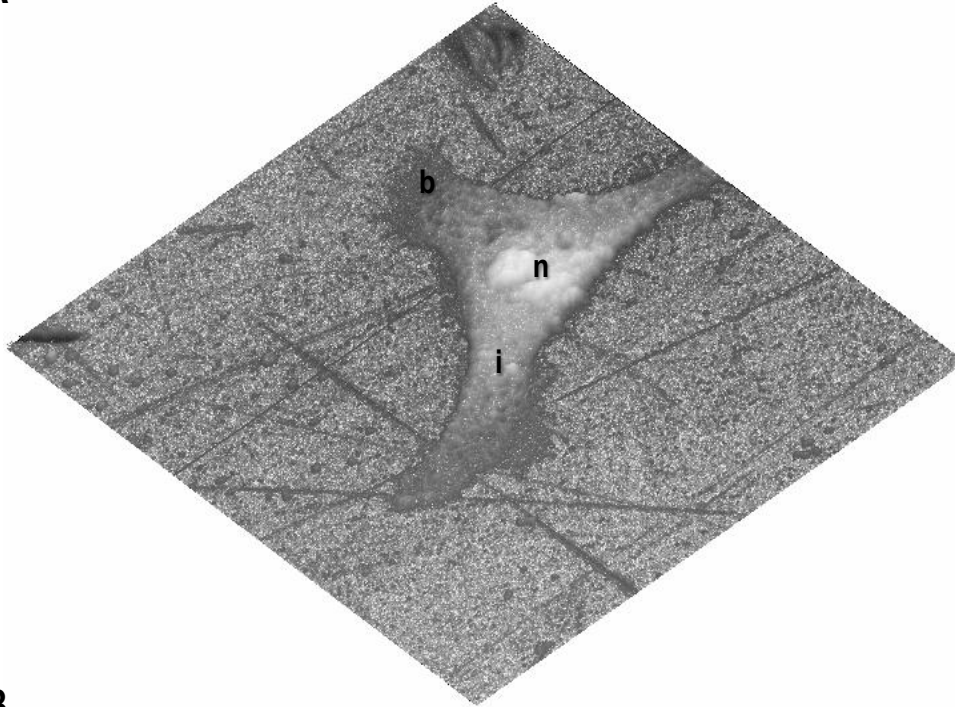
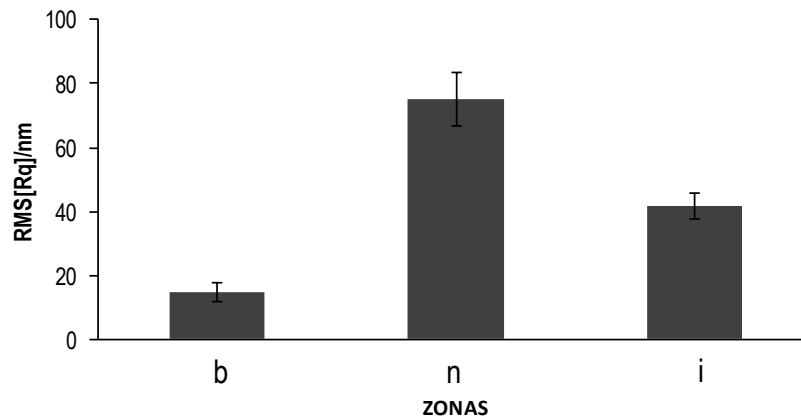
A**B**

Figura 6. Imagen tridimensional de una célula MCF-7 adherida al sustrato de oro y escaneada por AFM en modo tapping-Altura. En la imagen (A) se muestra una célula donde se observa las zonas de barrido donde se realizaron los análisis de rugosidad para establecer el sitio adecuado para el estudio en proceso. La zona del borde presenta condiciones inadecuadas debido a que es la interface entre la superficie del sustrato y la superficie membranal por lo que los valores de rugosidad en ese sitio de la célula no son exactos. Por su parte la zona identificada como región nuclear mostro grandes diferencias en cuanto a los valores de RMS[Rq]/nm haciendo complicado el análisis al forzar de manera agravante la sonda del AFM y en ocasiones provocando desprendimiento de la misma, sin embargo la zona correspondiente a la región intermedia mostro ligera variación en los datos obtenidos de rugosidad al no encontrar grandes diferencias topográficas en los diferentes análisis realizados (datos mostrados en la figura 4B correspondiente a la gráfica). A partir de esta información recabada se determino que el área de barrido con mejores condiciones para los análisis de rugosidad correspondió a la región intermedia o citoplasmática. La imagen fue escaneada en un área de barrido de $70 \mu\text{m}^2$. Valor Z= 1540.25 nm.

7.4 Visualización por AFM de la superficie membranal de las células MCF-7.

Una vez establecidas las condiciones de incubación y concentración de las AuNP, fue necesario caracterizar y estandarizar las regiones en la superficie de la membrana plasmática de las células MCF-7 con el fin de obtener datos correctos de los análisis de rugosidad en la membrana plasmática. Estudios previos han analizado la rugosidad de la membrana plasmática de varias células a la vez sin tomar en cuenta varios detalles como la diferencia morfológica que pudieran tener las células en un campo de barrido. En este contexto, se emplearon células MCF-7 individuales para cada análisis las cuales fueron sincronizadas con anterioridad por el método de disminución secuencial de la concentración del SBF a fin de que la mayoría se encontraran bajo las mismas condiciones fisiológicas. Posteriormente células individuales fueron fijadas y analizadas mediante la AFM en modo tapping con la intención de obtener valores de rugosidad reales, es decir que fueran directamente obtenidos de una región puntual de la membrana plasmática de una célula. Con el fin de comprender el efecto de las AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática fue importante realizar barridos a diferentes resoluciones para establecer el área de escaneo que expresara las mejores condiciones para la obtención de los valores de $RMS_{[Rq]}$, estos análisis se realizaron en diferentes tamaños de barrido (50, 20, 10, 5, 1, 0.6, 0.2 and 0.1 μm^2). Previamente fueron analizadas las células MCF-7 sin tratamiento para obtener imágenes de AFM de la membrana en un total de 512 puntos y este proceso se repitió en tres diferentes regiones de al menos tres diferentes células. Los valores $RMS_{[Rq]}$ obtenidos tienen un comportamiento similar en cada una de las áreas analizadas en los diferentes tamaños de barrido y donde solo se muestra la imagen representativa como se indica en la Figura 7, donde los recuadros amarillos (A-F) señalan las regiones en las que se midió la rugosidad. Las imágenes 7G a 7I fueron adquiridos en el modo fase debido a que la alta resolución del escaneo en áreas de barrido tan pequeñas no pudieron ser obtenidos en modo altura. En la micrografía 7A se muestra la imagen de una célula individual con un tamaño de barrido de 50 μm^2 y las imágenes subsecuentes se realizaron en tamaños de barrido secuencialmente más pequeños en por lo menos 3 zonas homogéneas de las células (recuadro amarillo) alcanzando dimensiones y resoluciones nanométricas de 100 nm^2 . Los resultados obtenidos mostraron que la mejor resolución (área de barrido) para una adecuada obtención de valores $RMS_{[Rq]}$ corresponde a 5 μm^2 por lo que a partir de estos datos, todos los estudios de rugosidad se realizaron en esta resolución debido a que se detectaron con mayor detalle la superficie membranal de la región citoplasmática .

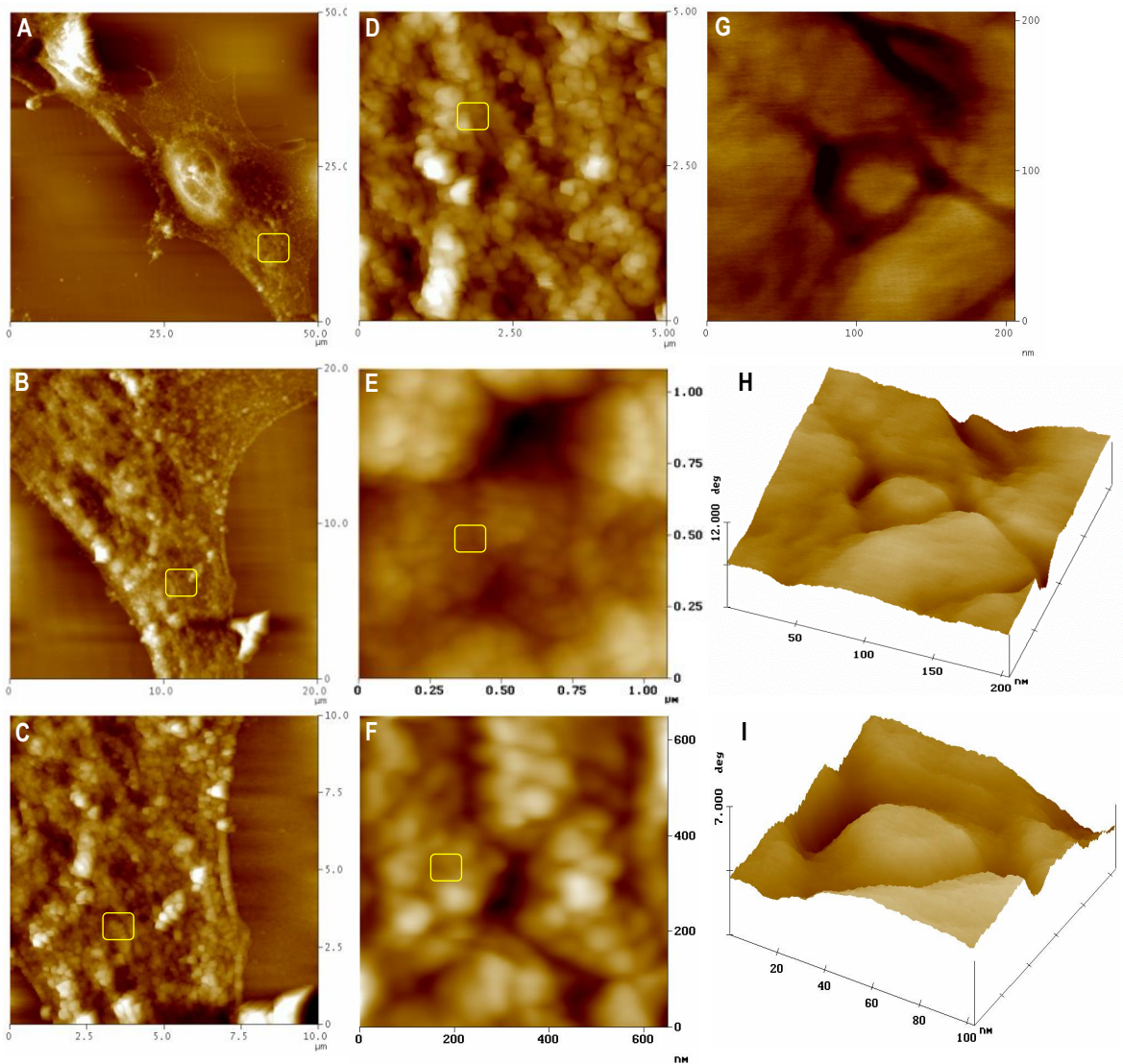


Figura 7. Obtención de imágenes de alta resolución por AFM. Para obtener las condiciones adecuadas para el análisis de rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 fue necesario realizar una serie de barridos a distintas resoluciones sobre la membrana celular a fin de encontrar el área adecuada que permitiera la obtención de valores de $RMS_{[Rq]}$ estadísticamente confiables. Las imágenes (A-C) representan el análisis en áreas de barrido que comenzaron en los $50 \mu\text{m}^2$ (célula individual) y secuencialmente fue aumentando la resolución y disminuyendo el tamaño de barrido. Los recuadros amarillos indican las zonas de acercamiento donde se fue realizando el análisis. En las imágenes (D-F) se muestran imágenes que fueron obtenidas a $5, 2.5$ y $1 \mu\text{m}^2$ respectivamente y fueron adquiridas en el modo tapping-altura. Las imágenes (G-I) fueron adquiridas en modo tapping-fase debido a que a esta resolución el microscopio encontró dificultades para realizar los barridos en modo altura, sin embargo se observó la capacidad generar imágenes de alta resolución del AFM para el análisis en resolución nanométrica. A partir de estos resultados se dedujo que el área de barrido con las mejores condiciones para el estudio de rugosidad se presenta en un área de barrido de $5 \mu\text{m}^2$. Valor $Z = 756.12 \text{ nm}$ (A-C); 432.23 nm (D-F) y 235.21 nm (G-H).

7.5 Detección de las AuNP en células MCF-7 mediante AFM y espectroscopia Raman.

Con el objetivo de sustentar los resultados del efecto de las AuNP sobre la viabilidad y morfología de las células MCF-7, fue necesario analizar la localización de las nanopartículas sobre la membrana plasmática de las células MCF-7, en el sustrato y en el interior de las células, por lo que se llevaron a cabo barridos en modo tapping-altura empleando un AFM-Nanoscope III (Veeco, Inc.) y análisis de detección mediante espectroscopia Raman (T6400 Horiba Jobin Yvon). En primera instancia se analizaron, mediante AFM, dos placas empleadas para el crecimiento celular; la primera placa contenía el vehículo y la segunda una suspensión de 80 $\mu\text{g/mL}$ de las AuNP. Ambas se incubaron por 6 h y posteriormente fueron expuestas a temperatura ambiente durante 24 h para descartar cualquier rastro de agua o humedad que interfiriera con el barrido de la sonda. Posteriormente, se analizaron placas que contenían células MCF-7 que fueron incubadas con 80 $\mu\text{g/mL}$ de las AuNP de 20 nm de diámetro y a las 12 h de exposición fueron fijadas mediante un proceso de deshidratación con diferentes concentraciones de etanol para finalmente realizar el análisis topográfico. La figura 8 muestra los resultados del análisis de la superficie de una célula MCF-7 (Figura 8A) obtenidos mediante AFM donde se observan diferentes estructuras con tamaños de entre 80 y 400 nm que sugieren la presencia de agregados (clúster) de AuNP sobre la superficie membranal (Figura 8B). Estos agregados de AuNP localizados en la superficie de las células MCF-7 presentaron las mismas dimensiones de los clústeres de AuNP que se observaron sobre la superficie de la placa con recubrimiento de oro, empleada para el crecimiento de estas células (Figura 8C).

Se emplearon muestras con células MCF-7 que fueron incubadas bajo las mismas condiciones antes descritas y se analizaron por espectroscopia Raman mediante un equipo de espectroscopia confocal Raman. La figura 9 muestra un típico espectro SERS de las células MCF-7 que fueron incubadas con 80 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP a diferentes tiempos en 4 diferentes zonas de la célula. Los resultados mostraron que las AuNP se localizan en el interior de la célula emitida por los aglomerados de AuNP en diferentes regiones del interior celular. Como lo muestra la imagen, la señal obtenida en la región del citosol (picos más altos) fue muy fuerte a las 6 h, al igual que en la periferia nuclear (borde). Para las 12 h la señal Raman se observó con más intensidad dentro de la estructura nuclear.

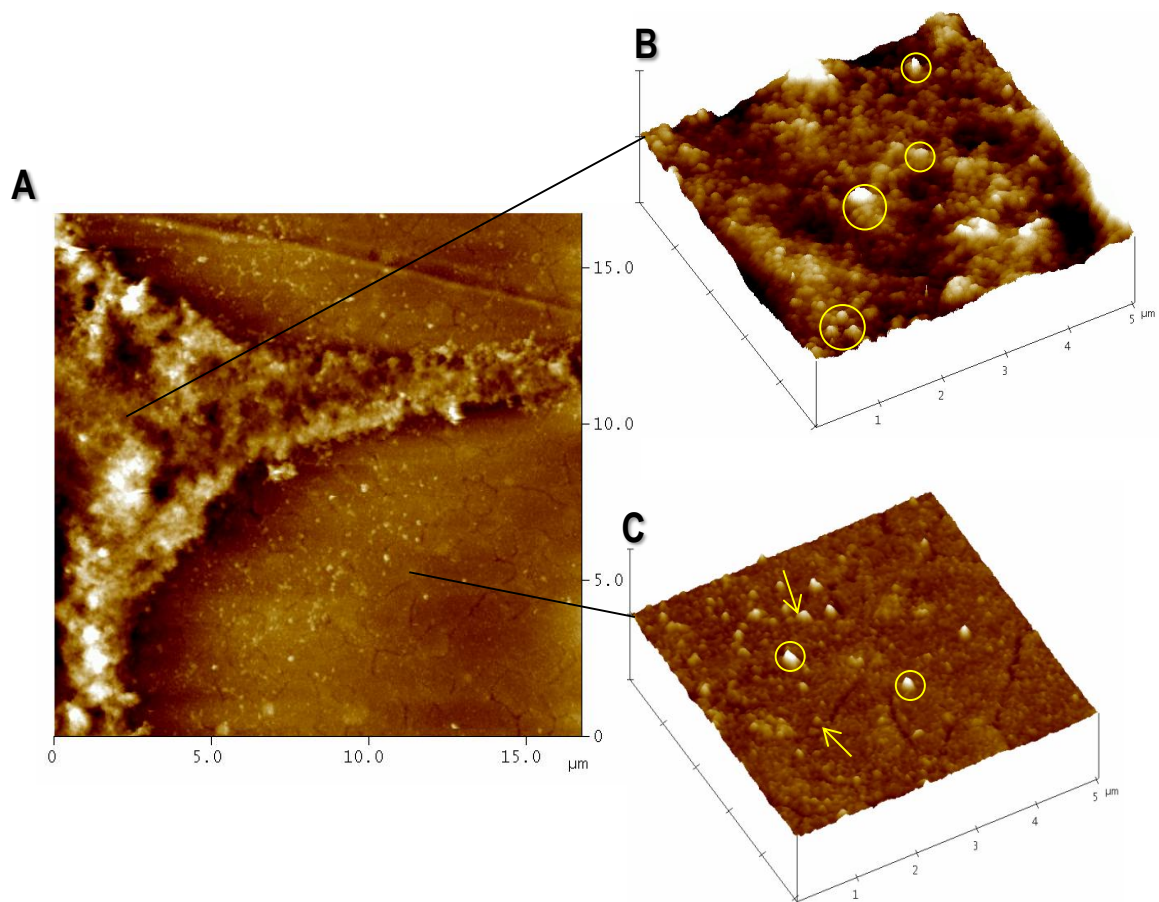


Figura 8. Localización de aglomerados de AuNP sobre la superficie membrana de las células MCF-7. La superficie de la membrana plasmática de las células MCF7 y del sustrato de oro fueron analizados mediante AFM para localizar la presencia de AuNP. (A) imagen de parte de una célula MCF-7 individual analizada en modo altura donde se observa la interface entre el sustrato y la extensión celular. Sobre la superficie membranal se observan estructuras que oscilan los 80 y 400 nm de diámetro (B) en diferentes puntos del área de barrido (círculos amarillos) visto en una imagen en 3D, mientras que en la superficie que corresponde al sustrato también se detectaron dichas estructuras con dimensiones semejantes (flechas y círculos amarillos) a las localizadas en la superficie membrana vistas desde un ángulo tridimensional (C). Los datos obtenidos muestran una semejanza en las dimensiones de las estructuras presentes en ambos casos proponiendo la presencia de conglomerados de AuNP sobre la membrana plasmática de las células. El campo de barrido para las micrografías fue de 16.86 nm² para la micrografía correspondiente a la parte celular, así como 5 nm² para las zonas de la región citoplasmática de la célula y del sustrato. La concentración de AuNP empleada para estos experimentos fue de 80 μg/mL incubadas por 12 h. Valor Z= 756.12 nm.

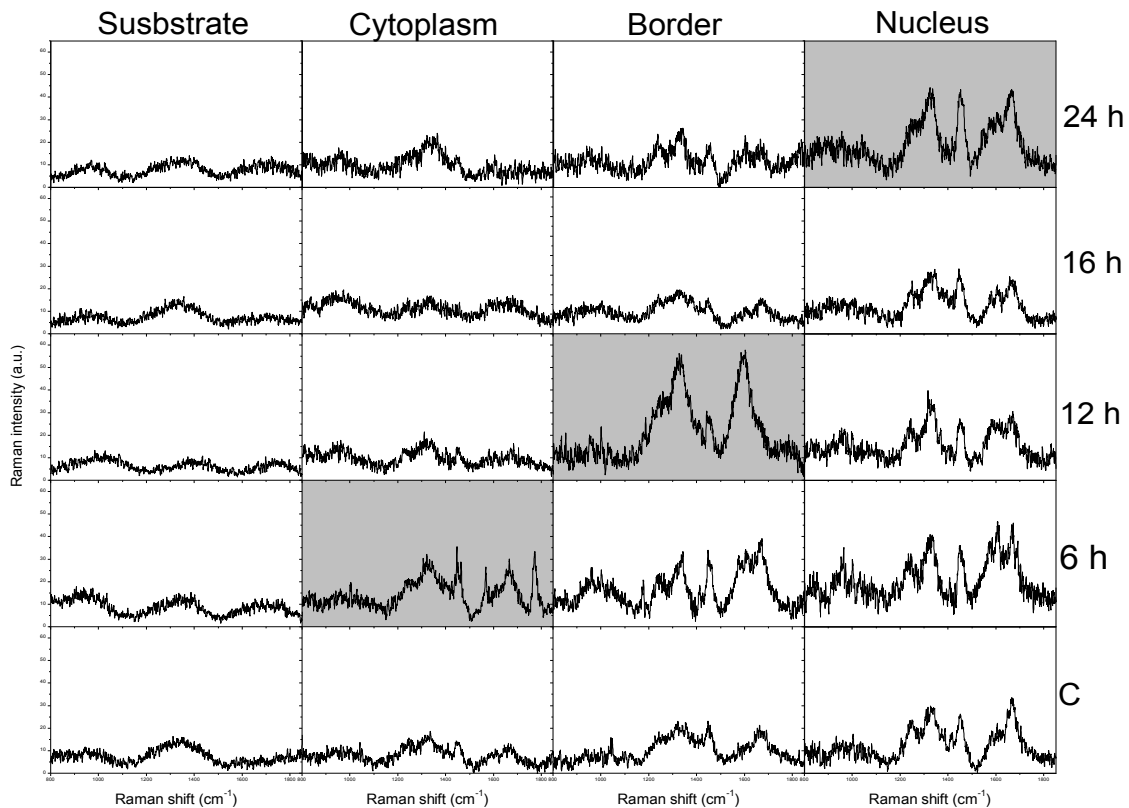


Figura 9. Espectro Raman de AuNP en células MCF-7. Se realizó el análisis en 3 diferentes regiones: citoplasma, borde nuclear y núcleo. La señal del espectro Raman en el citoplasma a las 6 h (cito) fue mayor en comparación con la obtenida en la región que corresponde al borde nuclear a las 6 h (bor). Sorpresivamente también se localizó dicha señal dentro del núcleo a las 12 h (nuc). El análisis en la región del sustrato no mostró resonancia por lo que se descartó la presencia de AuNP. Del mismo modo, los resultados del análisis en células control no mostraron señal semejante a las tratadas con las AuNP salvo en la región del núcleo ya que la señal Raman emitida se debe a la resonancia de las moléculas de ADN y proteínas dentro del organelo [55].

7.6 Detección de las AuNP por espectro de emisión fluorescente

Para comprobar la presencia de los aglomerados de AuNP en las células MCF-7, que fueron observados por los barridos de la AFM sobre la superficie de la membrana plasmática de las células y sobre la superficie del sustrato, se realizaron estudios mediante microscopia confocal empleando un equipo CLSM Carl Zeiss LSM-780 NLO. Esta técnica proporciona información de la estructura interna y superficial de las células con base en el uso de marcadores fluorescentes o de su propia naturaleza fluorescente y las AuNP juegan un papel importante en este fenómeno debido a sus propiedades físicas que dependen de su resonancia del plasmón superficial. La determinación se realizó en muestras de células MCF-7 que se incubaron con 80 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP por 6 h a las cuales se les realizó un análisis de dispersión espectral a partir 416 nm a 687 nm en la longitud de onda. Con el objeto de eliminar la autofluorescencia de fondo generada por las mismas células, el espectro de emisión fue normalizado con respecto al emitido por las células control y los núcleos fueron marcados con el fluoróforo de ácidos nucleicos DAPI.

En la Figura 10 se muestran las imágenes de la emisión espectral de las células MCF-7 que fueron incubadas con las AuNP (Figura 10A), en donde se observó que la máxima señal de emisión fluorescente es a 626 nm de longitud de onda (Figura 10B). Es importante señalar que las células incubadas con el vehículo emitieron baja cantidad de fluorescencia en el espectro del rojo, la cual se eliminó al establecer los valores basales de la fluorescencia de fondo como se muestra en la figura 10C y D. El último recuadro de los análisis espectrales de ambos experimentos se observa la suma de todos los canales analizados y la reconstrucción final de la imagen, donde la emisión de fluorescencia es debida al DAPI que se utilizó como referencia en la CMLS. En la Figura 11 se muestra una micrografía de una célula MCF-7 incubada con las AuNP a 6 h y la imagen de un núcleo DAPI (azul) donde se observa la localización en rojo de las AuNPs (como se indica en la imagen) en el citoplasma muy cercano a la periferia nuclear con lo que se comprueba la emisión de señal fluorescente de las nanopartículas. La línea punteada representa la membrana de la célula. Estos resultados demuestran la presencia de AuNP en el interior de las células y refuerzan los datos obtenidos por la AFM, lo que indica la incorporación de las nanopartículas en el interior celular y su monitoreo, mismo que fueron demostrado mediante las imágenes de campo claro donde se observan la ubicación de los aglomerados de AuNP en el interior de las células MCF-7 (Figura 12).

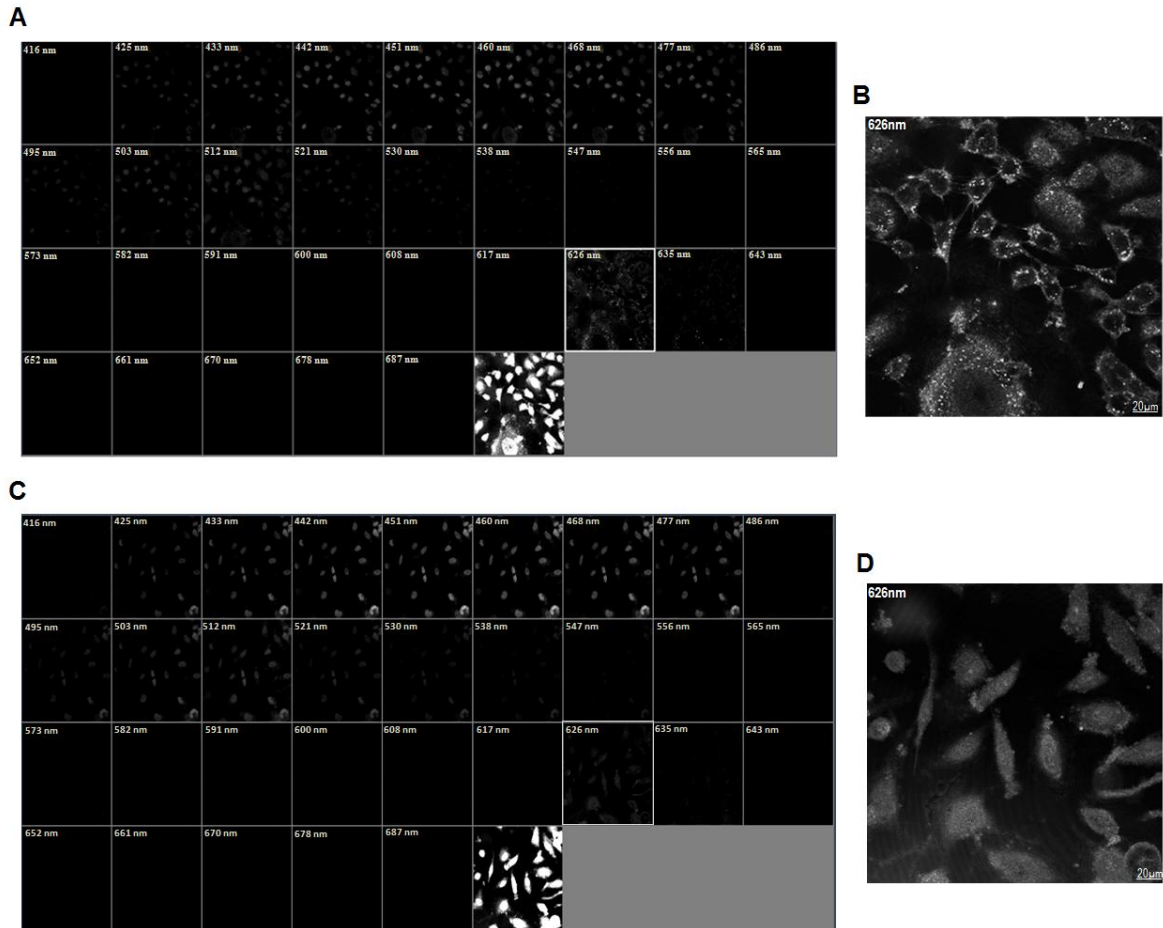


Figura 10. Detección de las AuNP en células MCF-7 por análisis espectral. (A) El análisis de emisión espectral detectó la presencia de AuNP de 20 nm, (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 6 horas de incubación) en el interior de las células MCF-7 a los 626 nm de longitud de onda (recuadro blanco) en comparación al análisis realizado a células incubadas con vehículo (C). Las imágenes (B y D) representan la amplificación del campo de análisis donde se observó la presencia de los aglomerados de AuNP en comparación con el control respectivamente. El barrido se realizó mediante CMLS desde 416 nm hasta 687 nm de longitud de onda. Los núcleos fueron marcados con DAPI (máxima emisión 461 nm). Todas las imágenes tienen dimensiones de $20 \mu\text{m}^2$.

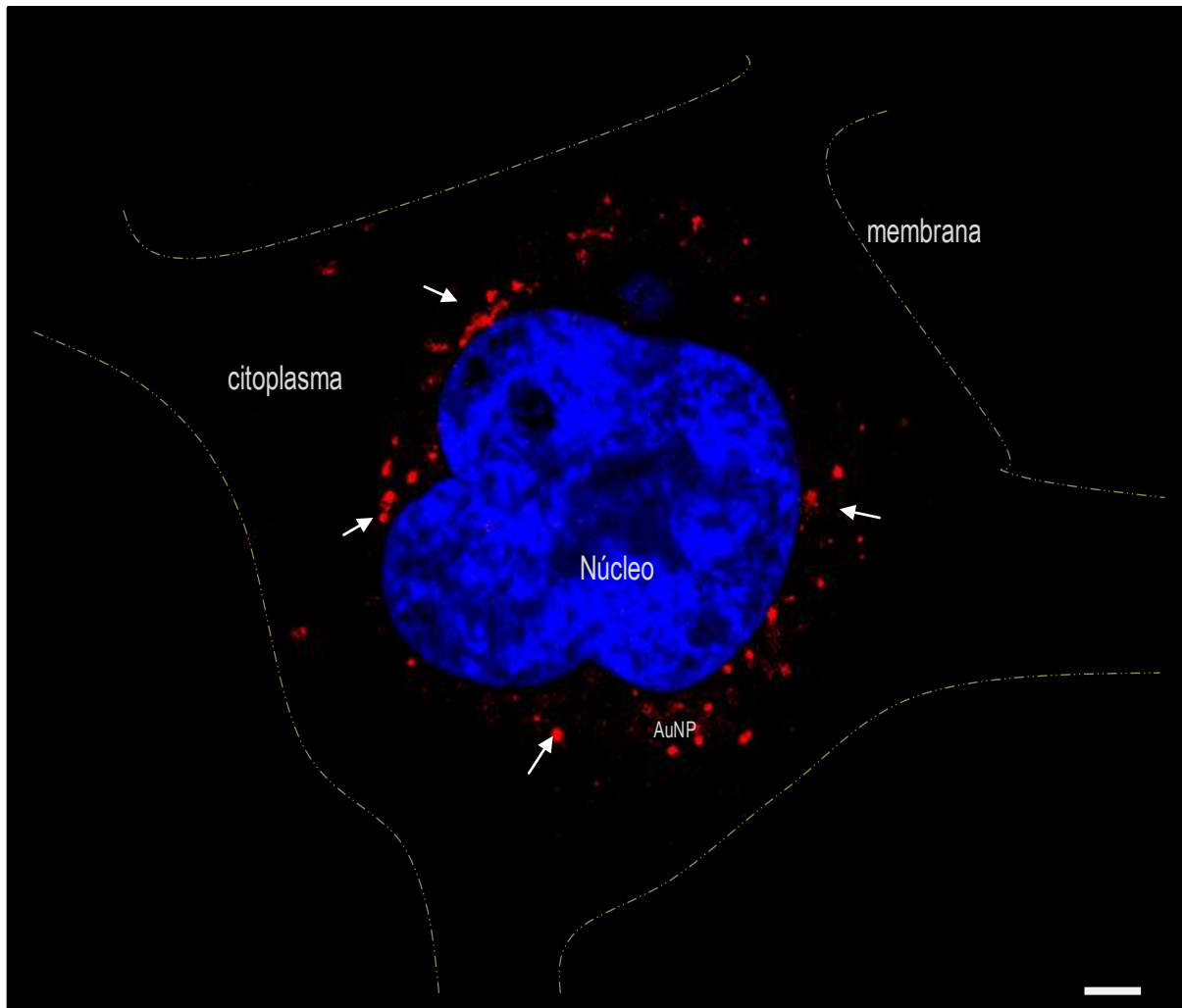


Figura 11. Localización de la señal de emisión fluorescente de las AuNP. El análisis mostró la ubicación de la señal fluorescente de las AuNP en el interior celular en una longitud de onda cercana al rojo. Las flechas señalan la ubicación de los conglomerados de AuNP alrededor del núcleo (azul) de una célula MCF-7. Como se observa en la imagen, las AuNP se encuentran dispersas en el citoplasma y en la periferia nuclear. La emisión de señal fluorescente de los aglomerados de AuNP fue de vital importancia para monitorear su distribución intracelular. Amplificación: 63X.

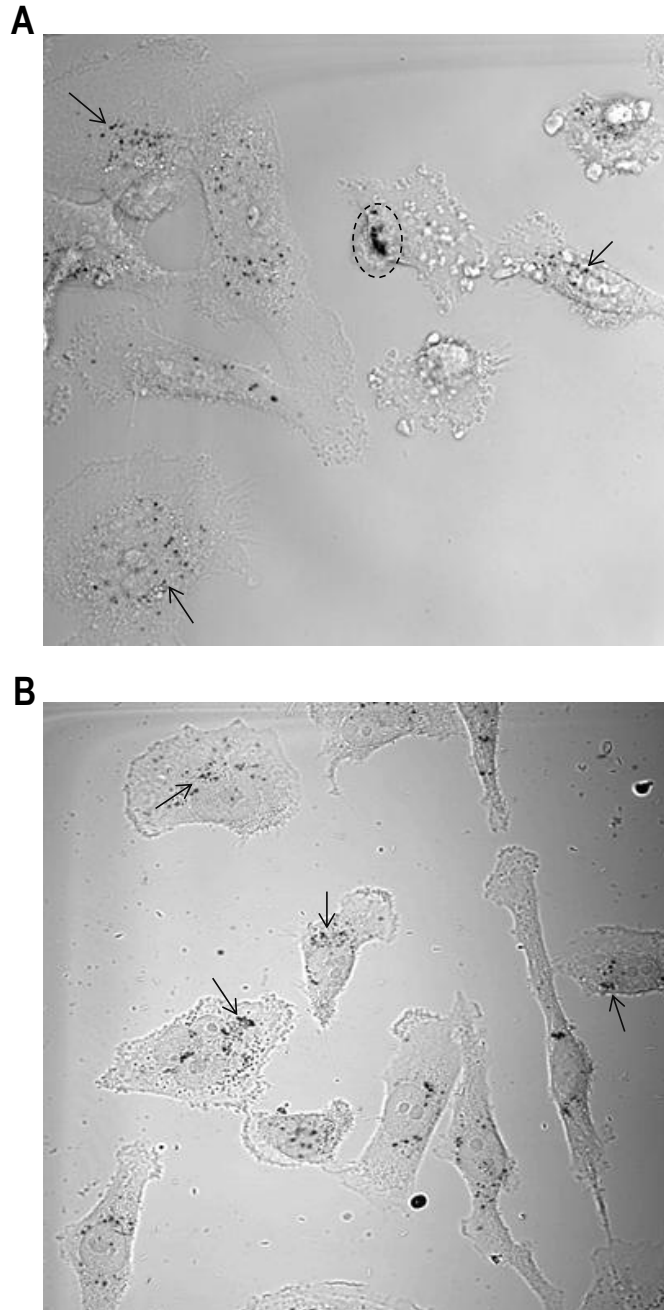


Figura 12. Localización de aglomerados de AuNP en el interior de las células MCF-7 por imágenes de campo claro. Los resultados del análisis espectral mostraron la detección de los aglomerados de AuNP en el interior células sustentando así la poca información que se conocía de este fenómeno disponible en la literatura actual. Estos análisis fueron reforzados mediante el escaneo por microscopia de campo claro del mismo CMLS donde se logaron detectar varios aglomerados distribuidos en el interior celular. Con estos resultados se determina que no fue necesario el análisis de las células mediante la técnica de TEM lo que permitió emplear simultáneamente las muestras para los procesos de fluorescencia y campo claro. En la imagen(A) se muestran células MCF-7 incubadas con AuNP a 80 µg/mL durante 6 h y en la imagen (B) se observan células incubadas con la misma concentración pero a 12 h. Las flechas y el círculo punteado en negro indican la localización de las AuNP agrupadas en clústeres. Amplificación: 60X.

7.8 Captación y distribución intracelular de las AuNP.

Una vez demostrada la localización de las AuNP en el interior de las células, se continuó con el monitoreo de estas a diferentes tiempos de incubación. Para determinar la incorporación y distribución intracelular de las AuNP, se empleó el análisis de fluorescencia por CMLS a 626 nm a partir de los resultados obtenidos en el estudio espectral, en donde las células MCF-7 fueron incubadas con vehículo (Figura 13A) o con 80 µg/mL de AuNP (Figura 13B) durante 6, 12 y 24 h y los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Los datos obtenidos señalan que después de las 6 horas de incubación con las AuNP su distribución intracelular es heterogénea y no todas las células las captaron en la misma proporción. Alrededor de las 12 horas se observó que las AuNP se incorporan al núcleo en mayor cantidad; esto se puede asegurar debido a que la emisión de fluorescencia detectada es el resultado la colocalización de la fluorescencia emitida por las AuNP y por el DAPI, este efecto fue comprobado por el análisis de “Z-stack” (Figura 14). Los resultados obtenidos a las 24 h de incubación con las AuNP muestran que la emisión de fluorescencia es menor en comparación con la emitida a las 12 h (Figura 13D), lo cual puede ser debido a que las células sacaron las AuNP o que las células dañadas generan que los agregados de AuNP se observen en el medio de cultivo. Los resultados muestran que a las 6 h de incubación se presenta el mayor ingreso de AuNP a las células MCF-7 y su distribución en el citoplasma es más evidente que en el núcleo. Los agregados de AuNP se visualizan como puntos rojos de diferentes tamaños que se encuentran distribuidos de manera heterogénea en la célula (Figura 13B): En las células que fueron tratadas con el vehículo no se detectó señal en la longitud de onda de 626 nm (Figura 13D).

Como se mencionó anteriormente, la figura 14 muestra un análisis de sección realizado en el microscopio confocal (Z-stack) donde se pudo determinar la internalización de las AuNP en el núcleo de las células. La Figura 14A muestra el análisis de sección mediante una imagen orto en donde se puede apreciar la colocalización de la señal emitida por las nanopartículas y del marcador nuclear dando como señal una coloración rosa y mediante la reconstrucción en 3D (figura 14B) se pudo observar con mayor detalle la localización de los conglomerados de AuNP en el interior del núcleo al irnos acercando (figura 14C) para finalmente posicionar el análisis en el interior del núcleo como lo muestra el acercamiento en la figura 14D.

Así mismo, se pudo observar la distribución intracelular de las AuNP al incubar a las células con el marcador lisosomal LysoTracker® Green y donde se puso determinar que las nanopartículas son transportadas a través de vesículas que se localizaron en diferentes regiones de la célula pero más en la periferia nuclear cuando el tiempo de incubación fue de 12 h como se puede observar en la figura 15. Estos resultados apoyan los datos existentes en la bibliografía actual y aporta información importante para seguir investigando los mecanismos de incorporación de las AuNP.

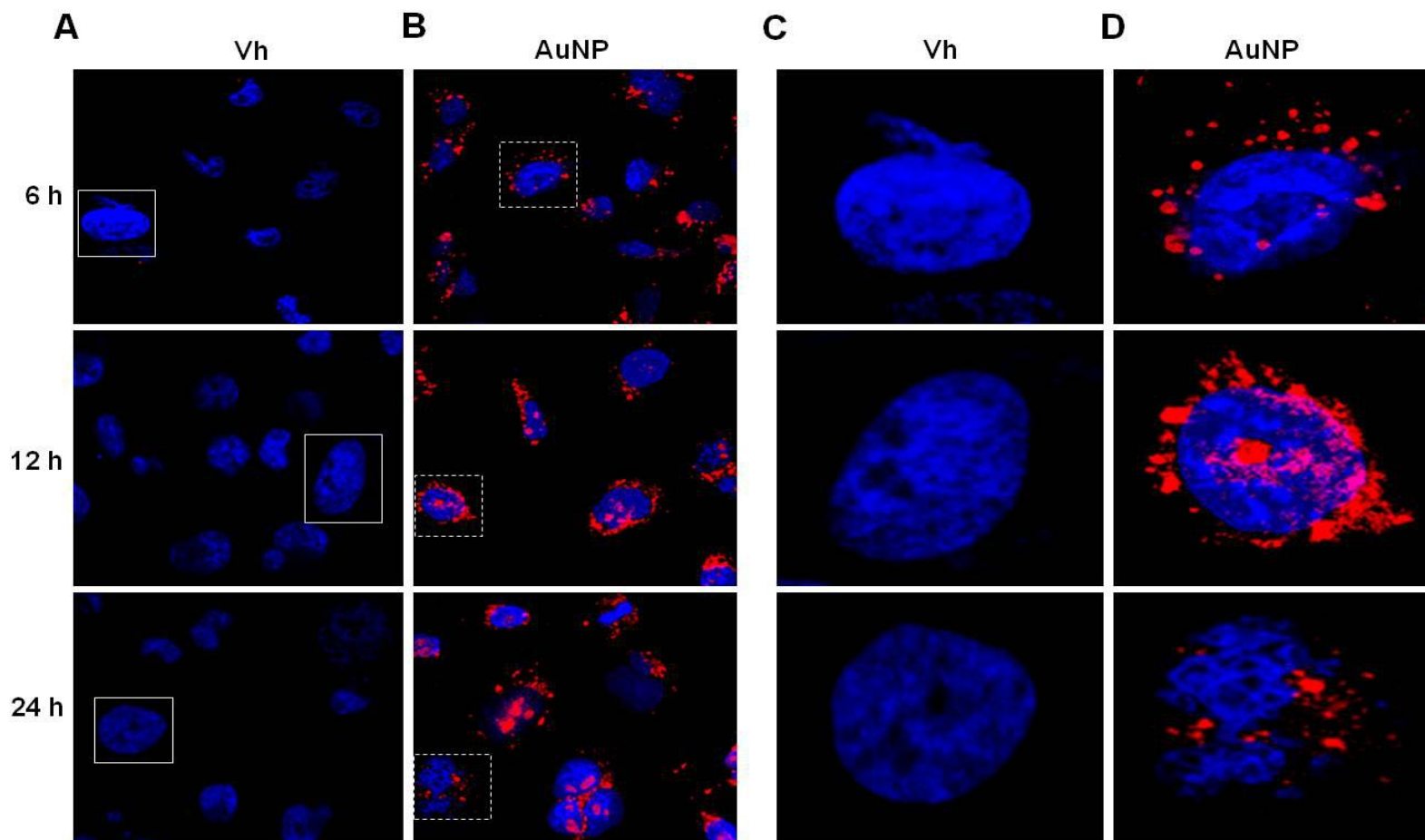


Figura 13. Captación y distribución especial intracelular de AuNP en las células MCF-7. Agregados de AuNP de 20 nM fueron detectadas en el interior de las células MCF-7 cuando se incubaron en concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 6, 12 y 24 h mediante CMLS. Los agregados de AuNP se detectan en la longitud de onda de 626 nm (rojo), mientras que el núcleo se tiñó con DAPI (azul). (A y B) Amplificación de 40X; (C y D) Amplificación 63X. La máxima incorporación de AuNP en el núcleo se observó a las 12 h de incubación.

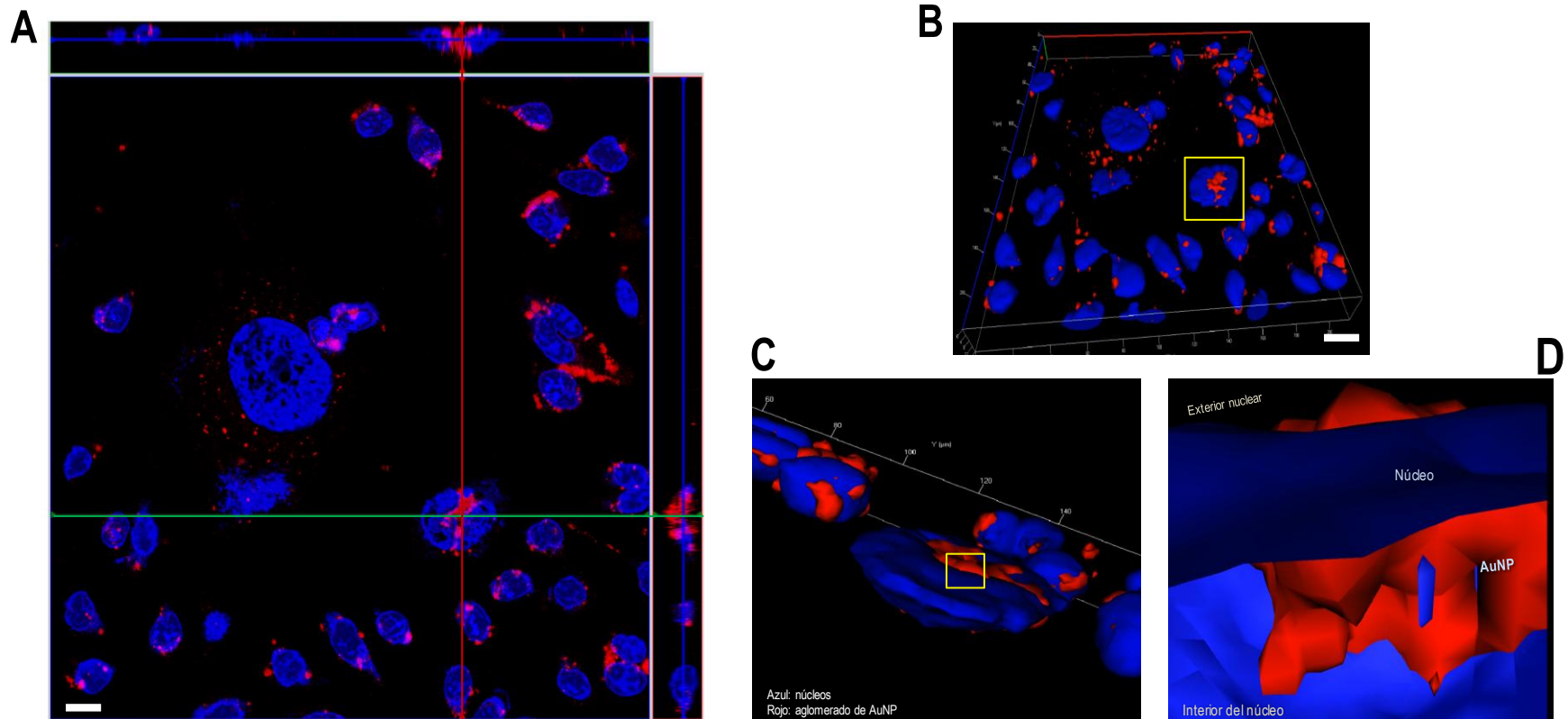


Figura 14. Imagen confocal Z-stack del cultivo de células MCF-7 tratadas con las AuNP. (A) Imagen orto del análisis Z-stack del núcleo de las células (azul) y su penetración al interior del organelo por las AuNP. En el punto de intersección (líneas roja y verde) se observa el entrecruzamiento de la señal fluorescente emitida por las AuNP (rojo) con la señal del marcador DAPI (azul) del núcleo dando como resultado la señal en color rosa que indica la incorporación de las nanopartículas. En la imagen (B) se muestra una reconstrucción en 3D del análisis de Z-stack donde se pudo corroborar la penetración de las AuNP al realizar un acercamiento (C) en el que los cortes del Z-stack mostraron la localización de aglomerados de AuNP en el interior del núcleo (imagen D) demostrando que estas tienen la capacidad de incorporarse a la célula y posteriormente alojarse en el núcleo. Las células fueron incubadas con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AuNP durante 12 h. Barra de medición: 20 μm .

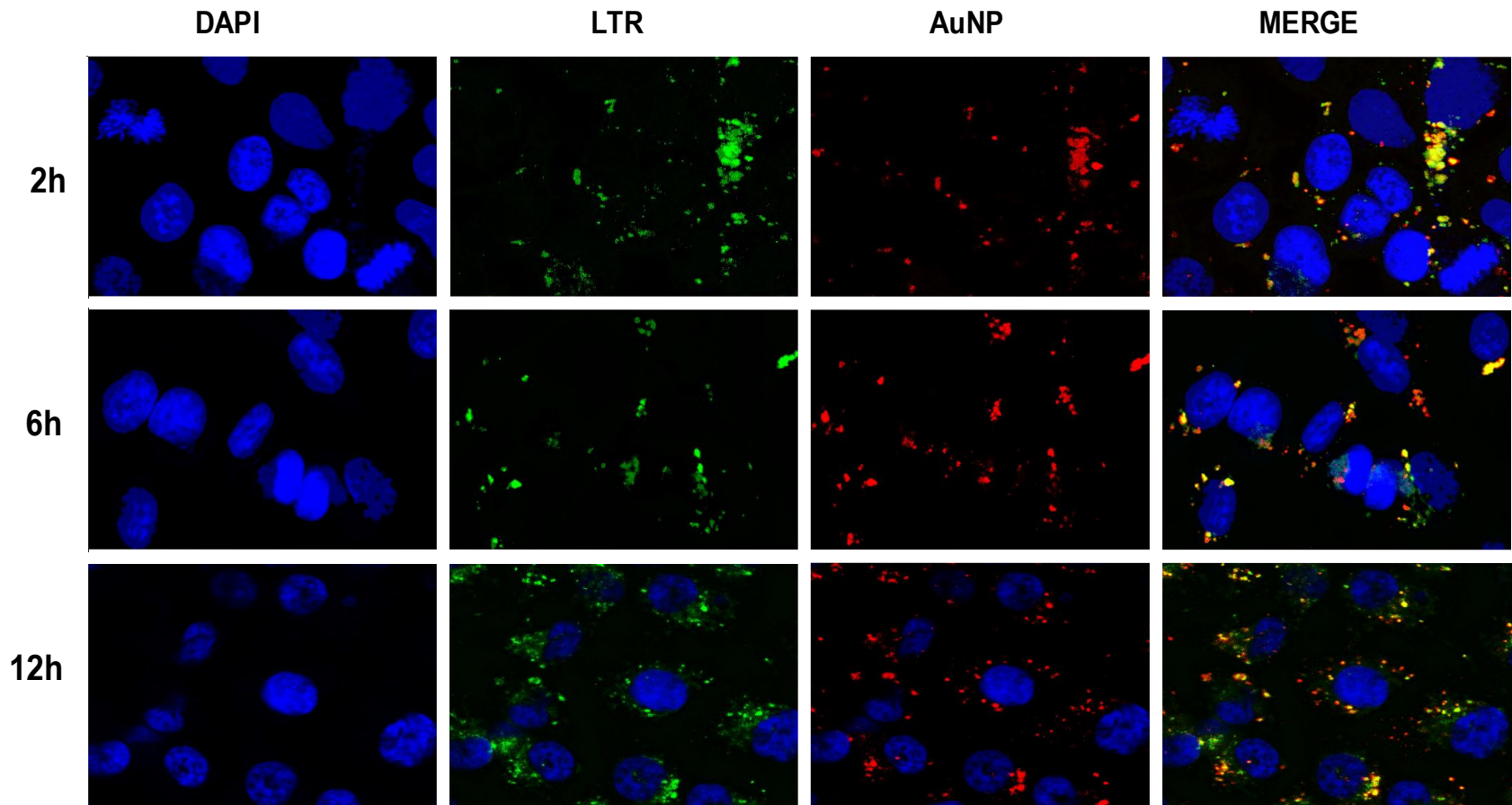


Figura 15. Transporte vesicular de las AuNP en el interior de las células MCF-7. Localización intracelular de vesículas de transporte en las células al ser incubadas con las AuNP a diferentes tiempos. La imagen muestra las micrografías de los diferentes canales donde se ubicó a cada uno de los marcadores empleados para monitorear el transporte vesicular utilizando DAPI (azul) para marcar ácidos nucleicos, el marcador lisosomal (verde) LysoTracker Green®. AuNP (rojo) y colocalización de los tres marcadores (MERGE). A partir de las 2 h de incubación las AuNP se encuentran incorporadas a las vesículas de transporte como se observa en las imágenes de co-localización (merge) y a las 12 h estas se encuentran alrededor de la periferia nuclear.

7.9 Efecto de las AuNP sobre la rugosidad en la superficie de la membrana plasmática de las células MCF-7

Una vez que se demostró la incorporación de las AuNP en el interior de las células mediante el estudio por microscopía confocal, se continuó con el análisis de las propiedades morfotopográficas de la membrana plasmática de las células MCF-7 que fueron incubadas con las nanopartículas. Se determinó el efecto de las AuNP sobre la rugosidad de las membranas de las células MCF-7, a través de la AFM, tomando en consideración los parámetros de $RMS_{[Rq]}$. Uno de los principales problemas que se presentan a través de esta técnica es el hecho de que al analizar la rugosidad, los resultados obtenidos no puedan ser heterogéneos debido principalmente al hecho de que cada porción de la membrana plasmática es diferente y está puede modificarse en función de la fase del ciclo celular en el que se encuentran las células. Por este motivo se realizaron barridos en tres zonas diferentes de cada célula como ya se mencionó anteriormente: Zona N, encima de los núcleos de las células MCF-7; Zona B, en el borde entre la membrana celular y el sustrato al cual se adhiere; Zona I, en la región intermedia (citoplasmática) entre las zonas N e I. En dichas zonas se realizaron los análisis en áreas de barrido desde 20 hasta $0.5 \mu m^2$. Previo al análisis del efecto de las AuNP sobre la rugosidad, los cultivos celulares fueron sincronizados mediante la deprivación secuencial de suero, con la finalidad de que la mayor parte de las poblaciones celulares se encuentre en la misma etapa del ciclo celular y que las condiciones del experimento fueran lo mas homogéneas posibles.

Los análisis de rugosidad se realizaron en células MCF-7 sincronizadas, en ausencia o presencia de AuNP (20 nm, $80 \mu g/mL$), mediante barridos en áreas de $5 \mu m^2$ en 3 regiones diferentes de la zona I, en al menos 9 células individuales y de 3 a 5 experimentos independientes. Los resultados demuestran que la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación hasta las 12 h, después disminuye pero no se alcanzan los valores observados inicialmente.

En la figura 16 se muestran los cambios en la rugosidad sobre la membrana plasmática de las células MCF-7 tratadas con las AuNP y con el vh a través del tiempo de incubación. Los resultados mostraron que a partir de las 6 h de tratamiento la rugosidad de la membrana se incrementa en las células experimentales (incubadas con $80 \mu g/mL$ de las AuNP) en comparación con las células control (incubadas con agua ultrapura). La figura 16a muestra los cambios ocurridos en la superficie membranal de las células control y donde se observó una ligera modificación en la rugosidad

mientras que en las imágenes del panel b se observa claramente el aumento en la rugosidad membranal. Estos datos se corroboran mediante el análisis estadístico (Figura 17) donde se observó el máximo aumento en los valores de rugosidad hacia las 12 h de incubación, efecto que fue disminuyendo hacia las 24 h al llegar a valores semejantes a los del control.

Los efectos de las AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células se pueden asociar a las etapas del ciclo celular (Figura 17). A las 6 h de incubación, lo que correspondería a la fase G1, los valores de $RMS_{[Rq]}$, se incrementan 20% con respecto al tiempo inicial, sin presentar diferencias significativas entre las células incubadas con AuNP o el vehículo. Entre las 12 y las 16 h se observa el máximo incremento en los valores de $RMS_{[Rq]}$, siendo 60% mayores cuando se incuban con AuNP con respecto al tiempo inicial y 30% con el Vh ($p < 0.05$). Se observa que el efecto de la incubación con las AuNPs sobre la rugosidad de la membrana disminuye a las 24 h, sin presentarse diferencias significativas entre los grupos vehículo y experimental ($p < 0.05$).

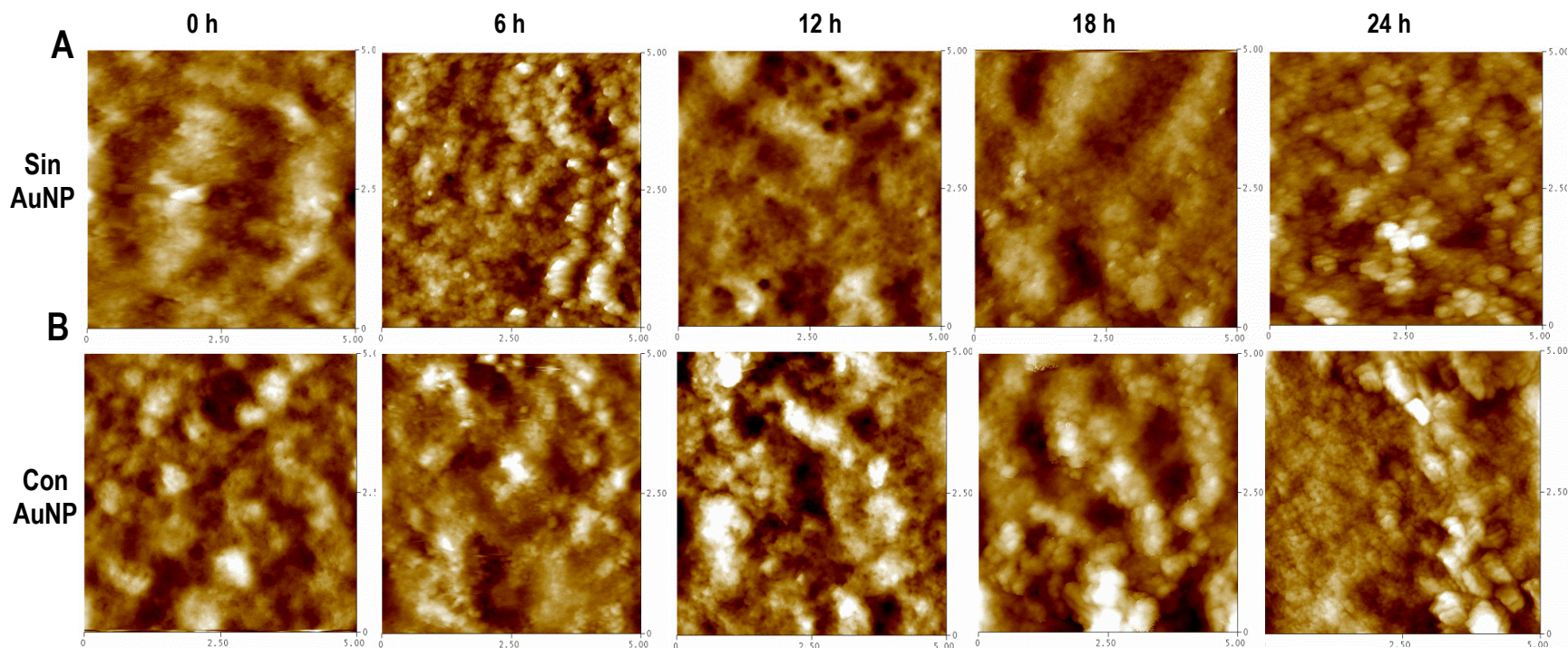


Figura 16. Efecto de las AuNP sobre la rugosidad de la superficie en la membrana plasmática de células MCF-7. Los análisis de rugosidad de la superficie membranal mostraron cambios en la topografía de las células cuando fueron expuestas a los tratamientos con AuNP. Las imágenes de la fila superior (A) muestran micrografías representativas de la superficie de la membrana plasmática de células MCF-7 que fueron incubadas con el vehículo a los diferentes tiempos de tratamientos mientras que las imágenes de la fila inferior (B) representan las regiones del análisis de las células incubadas con las AuNP a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los diferentes tiempos de incubación. Los resultados de rugosidad mostraron que los cambios en la topografía de la superficie membranal se incrementan a partir de las 6 h de exposición a las AuNP, generando un efecto máximo en los valores de rugosidad a las 12 h de incubación. En las imágenes que corresponden a las células tratadas con las AuNP se lograron detectar la formación de diversas subestructuras que tenían diferentes medidas en los valores de altura (regiones blancas) proponiendo que se trata de fenómenos asociados a la captación de las nanopartículas, estructuras que no se detectaron en las imágenes de AFM de las células control. Todos los experimentos se realizaron en 3 regiones diferentes de una célula y en 9 células diferentes por tratamiento. La altura se calculó a partir de los valores de $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$ y fueron procesadas con el software Nanoscope 5.30r3sr3. Valor $Z=619.2$ nm para todas las imágenes.

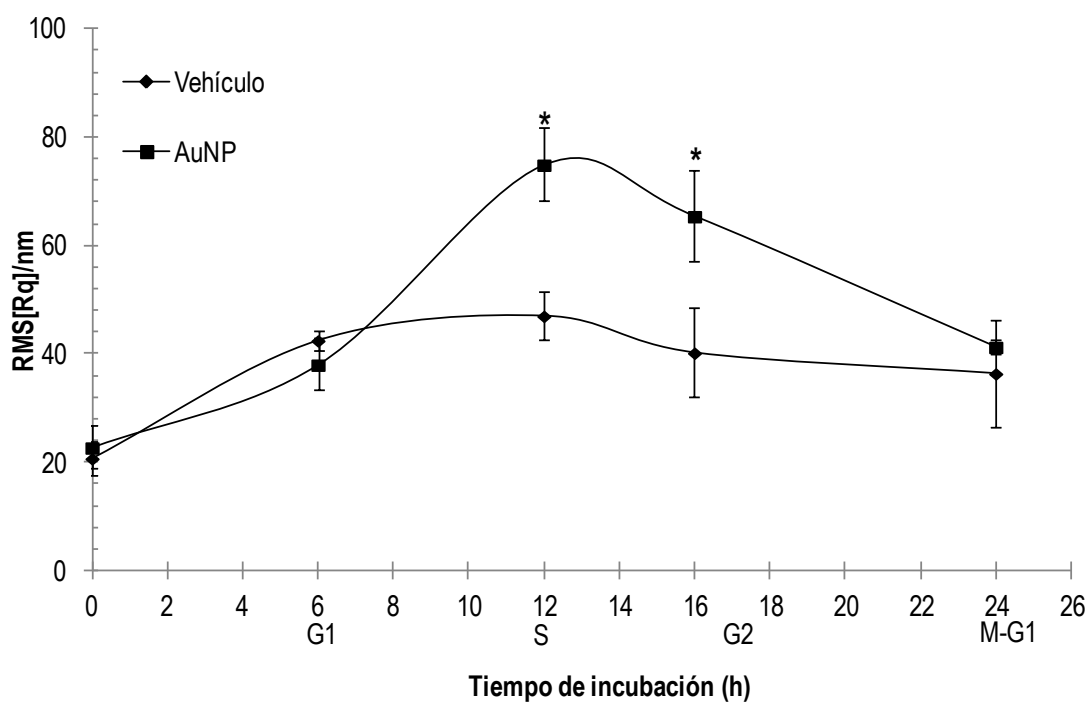


Figura 17. Cambios en la rugosidad de la membrana plasmática en función del tiempo de incubación con AuNP o con Vh. Los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática se muestran en términos de valores de $RMS_{[Rq]}$ donde los datos obtenidos sugieren un aumento en la rugosidad membranal a partir de las 6 h de incubación. Como se muestra en la gráfica, este incremento de la rugosidad va propagándose y alcanzando su punto máximo hacia las 12 y 13 h de exposición de las células hacia las AuNP comparadas con aquellas que fueron incubadas solo con el vehículo (control). Estos cambios en la rugosidad fueron disminuyendo a partir de las 14 h y hacia las 24 se observó variación en la rugosidad similar a las células control. Los datos se presentan como la media de la desviación estándar de tres experimentos independientes, en 3 regiones diferentes de una célula y en 9 células diferentes por tratamiento. * $P \leq 0.05$ comparado con Vh.

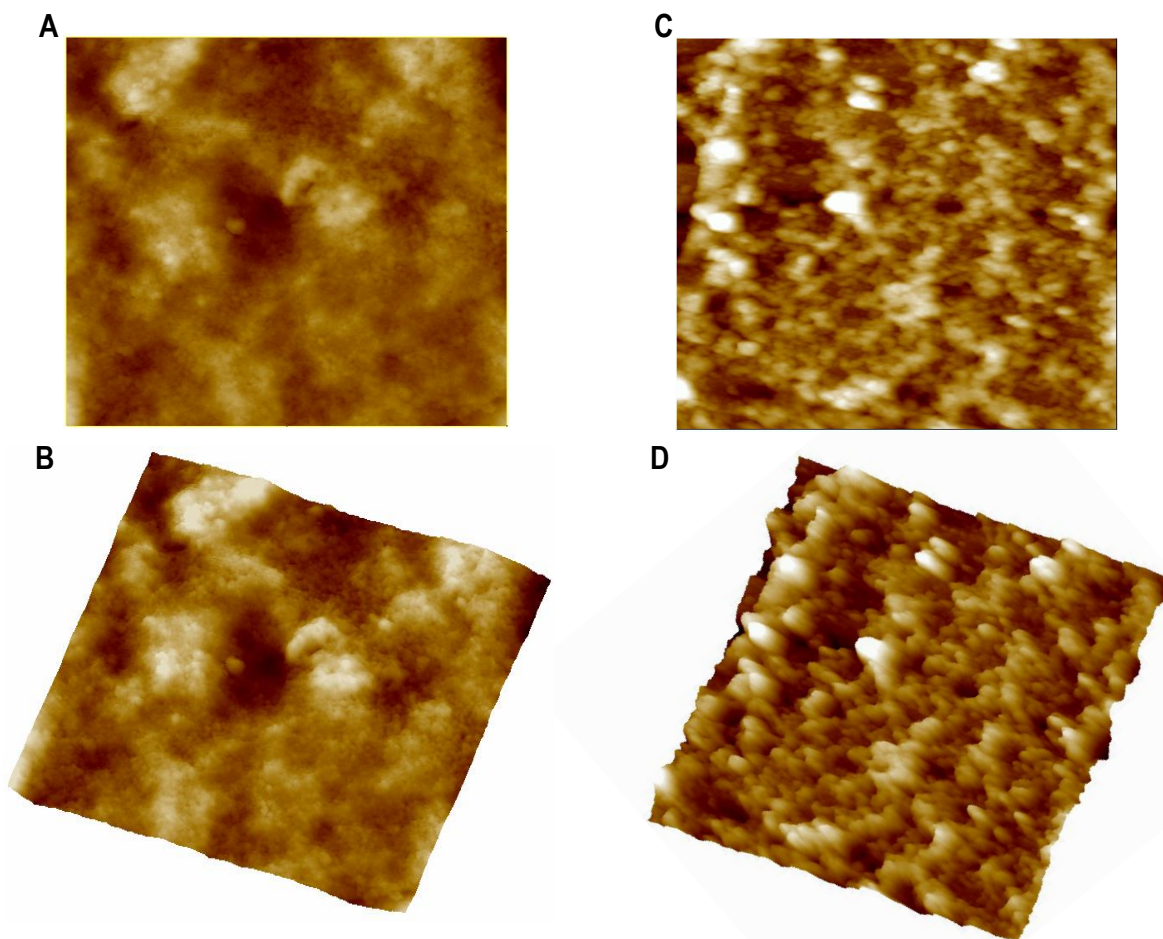


Figura 18. Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 6 h de exposición a las AuNP. Las imágenes de alta resolución muestran cambios en la topografía de la membrana plasmática de las células MCF-7 incubadas con los diferentes tratamientos. Las imágenes muestran micrografías adquiridas por AFM en modo altura donde se observan la mínima rugosidad en la superficie de la membrana de las células incubadas con el Vh (A y B) donde se observó una superficie lisa o menos rugosa (23.5 ± 72 nm) comparadas con aquellas que fueron tratadas con las AuNP (C y D) en la que se localizaron pequeñas estructuras a lo largo del campo de barrido (48.3 ± 56 nm). Los cambios que se consideraron importantes en el fenómeno de la rugosidad consisten en la formación de estructuras consideradas como aumento en los relieves (valles y crestas) de la superficie. Las regiones más claras (color blanco o crestas) representan las zonas de mayor altura en comparación con aquellas que muestran una coloración oscura (regiones bajas o valles). Valor Z= 787.56 nm.

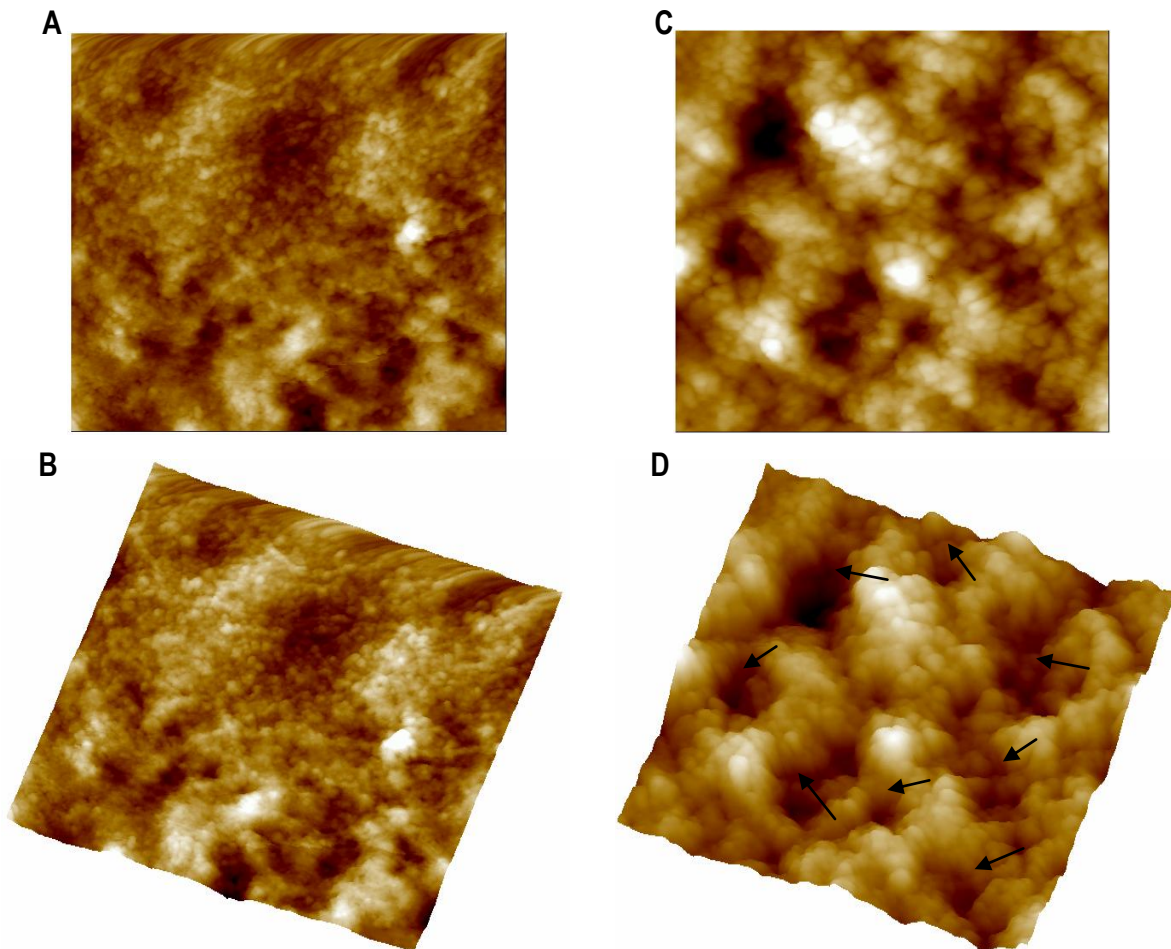


Figura 19. Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 12 h de exposición a las AuNP. El mayor efecto de la incorporación de las AuNP sobre la rugosidad membranal de las células MCF-7 fue observadas en aquellas que se incubaron por 12 h con las nanopartículas. Las imágenes de alta resolución no mostraron cambios en la rugosidad de la membrana de las células incubadas con el Vh (A y B), mientras que en las células incubadas con las AuNP se observó un marcado cambio en la rugosidad (73.28 ± 15 nm) como se muestran en las imágenes de altura y 3D (C y D). El análisis topográfico (datos no mostrados) indicó que la rugosidad incremento debido a la presencia de subestructuras con dimensiones mayores a los 400 nm de diámetro mientras que en la superficie de las células control no se observó este fenómeno. Como se muestra en la imagen tridimensional de la superficie membranal de la célula tratada con las AuNP (Figura D) existe la presencia de grandes depresiones (flechas) que no se observaron en las células control. Este fenómeno se propone que este asociado a procesos de incorporación de AuNP o a mecanismos de excreción, mecanismos que requieren ser estudiados puntualmente. Valor Z= 745.98 nm.

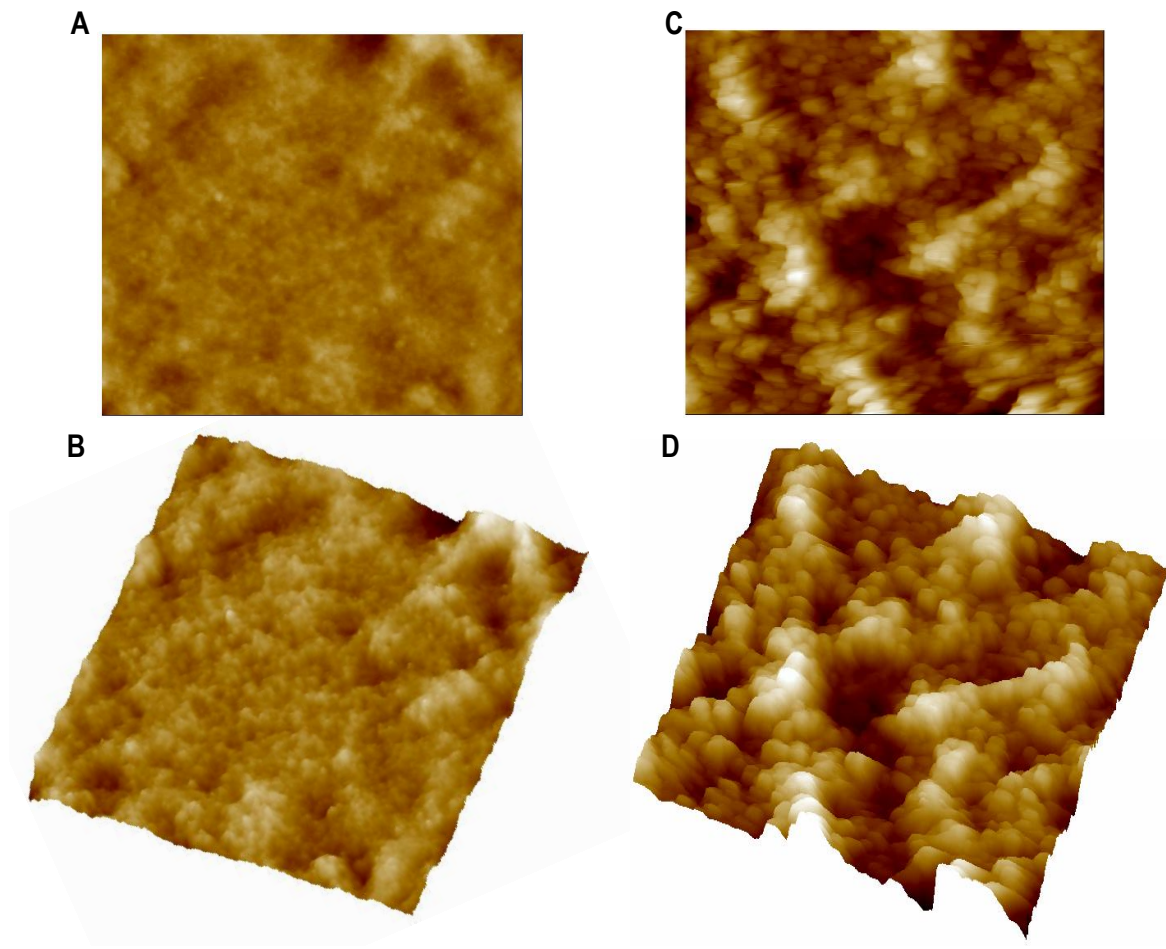


Figura 20. Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 16 h de exposición a las AuNP. Al igual que las células incubadas con el tratamiento de las AuNP, los cambios observados en aquellas expuestas a las nanopartículas por 16 h sufrieron modificaciones en la superficie de su membrana en comparación de aquellas expuestas solo al Vh (C y D; A y B respectivamente). Como se muestran en los valores de rugosidad, los valores de RMS[Rq] (63.5 ± 42 nm) arrojaron datos en la variación topológica de la membrana de las células MCF-7 incubadas con las AuNP por 16 h no muy diferentes a las expuestas por 12 h. Las imágenes de alta resolución (C y D) mostraron alteraciones en la rugosidad similares a las tratadas por 12 h proponiendo los mismos fenómenos que originan los cambios. Valor Z= 427.52 nm.

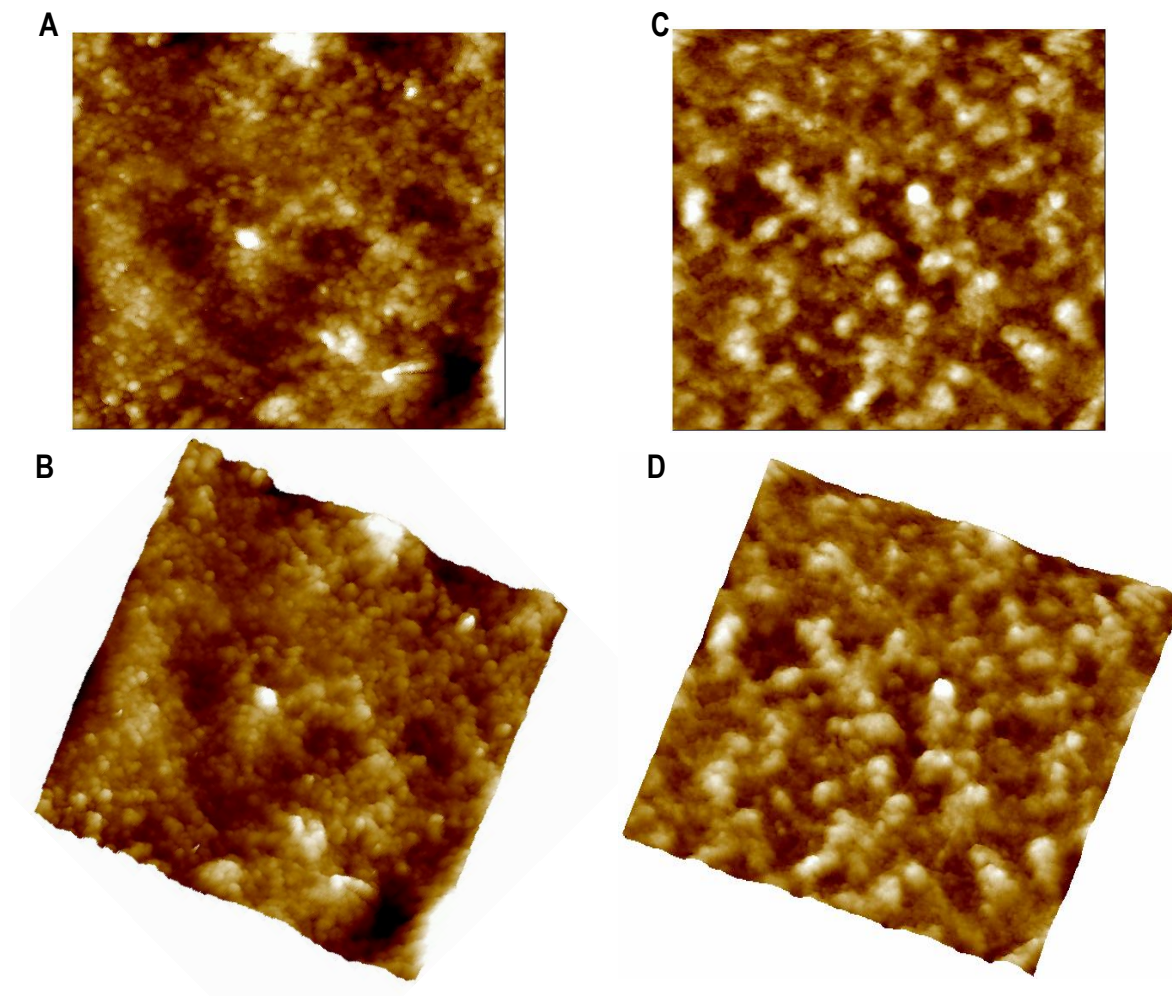


Figura 21. Efecto de las AuNP sobre la rugosidad a las 24 h de exposición a las AuNP. Las imágenes de alta resolución por AFM mostraron una disminución en la rugosidad de las células que fueron expuestas a ambos tratamientos durante 24 h. Las imágenes (A y B) representan la superficie de la membrana de células expuestas al Vh y donde la variación en los valores de rugosidad no fue muy diferente a las células control (25.5 ± 32 nm) de los diferentes tiempos de tratamiento. Como se observa en las imágenes (C y D), la rugosidad de la membrana plasmática de las células con el tratamiento muestran patrones topográficos similares a las células expuestas a las 6 h de tratamiento con las AuNP (43.5 ± 91 nm). Valor Z= 845.34 nm.

7.9.1 Las AuNP inducen la formación de poros en las membranas de células MCF-7.

Uno de los aspectos más relevantes detectados en los análisis de rugosidad mediante AFM y que ocasionaron los cambios en la rugosidad de la membrana fue la presencia de numerosas depresiones con profundidades cercanas a los 90 nm, fenómeno que se observó en las células tratadas con las AuNP pero no en las células control. En la figura 22 se muestra una imagen por AFM de una región de la membrana plasmática de una célula MCF-7 que fue incubada con 80 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP donde se aprecian diversos orificios o poros a lo largo del campo de barrido, mismos que se encontraron en las diferentes células escaneadas y del grupo experimental, es decir de las tratadas con AuNP. La imagen 22A representa una imagen en modo altura donde se observan las depresiones (círculos amarillos) mientras que la imagen 3D (Figura 22B) confirma esta aseveración y se aprecia con mayor detalle la localización de los poros. Cabe señalar que la sonda de AFM no puede determinar toda la información que hay a lo largo del poro debido a la limitación del cantiléver para desplazarse sobre los bordes que delimitan el orificio. Esta información puede ser corroborada por los análisis microtopográfico (Figura 22C) donde la línea de trazo muestra el sitio del análisis y los puntos donde se encuentran los orificios señalados anteriormente.

Por otra parte, en la Figura 23 se muestran imágenes de la superficie de la membrana plasmática de una célula MCF-7 control (Figura 23A) donde se puede observar la superficie membranal uniforme sin modificaciones en la rugosidad mientras que en la Figura 23B muestra una imagen de la membrana de una célula tratada con las AuNP y donde se observa la formación de varios orificios. Cuando estas estructuras son escaneadas por AFM mediante análisis topográficos, a una resolución de 1 μm , se observa una estructura tridimensional (Figura 23C) con forma de hendidura, con bordes bien definidos en forma circular la cual presenta dimensiones de 467.21nm de diámetro, mientras que la profundidad arroja un valores cercanos a los 113.95 nm considerando la dificultad del AFM para analizar a mayor profundidad (Figura 23D). Cabe señalar que las dimensiones en los verticales están asociadas al barrido de la sonda del AFM en la parte más elevada de la célula (núcleo) por lo que la profundidad del poro presenta dichos valores. Los resultados proponen que dicha depresión u orificio tiene una profundidad mayor a la obtenida por la sonda del AFM por lo cual sugiere la formación de posibles “nanoporos” asociados a diversos mecanismos de endocitosis celular, fenómeno atribuido a la interacción de las AuNPs con la superficie de las membranas plasmáticas [36].

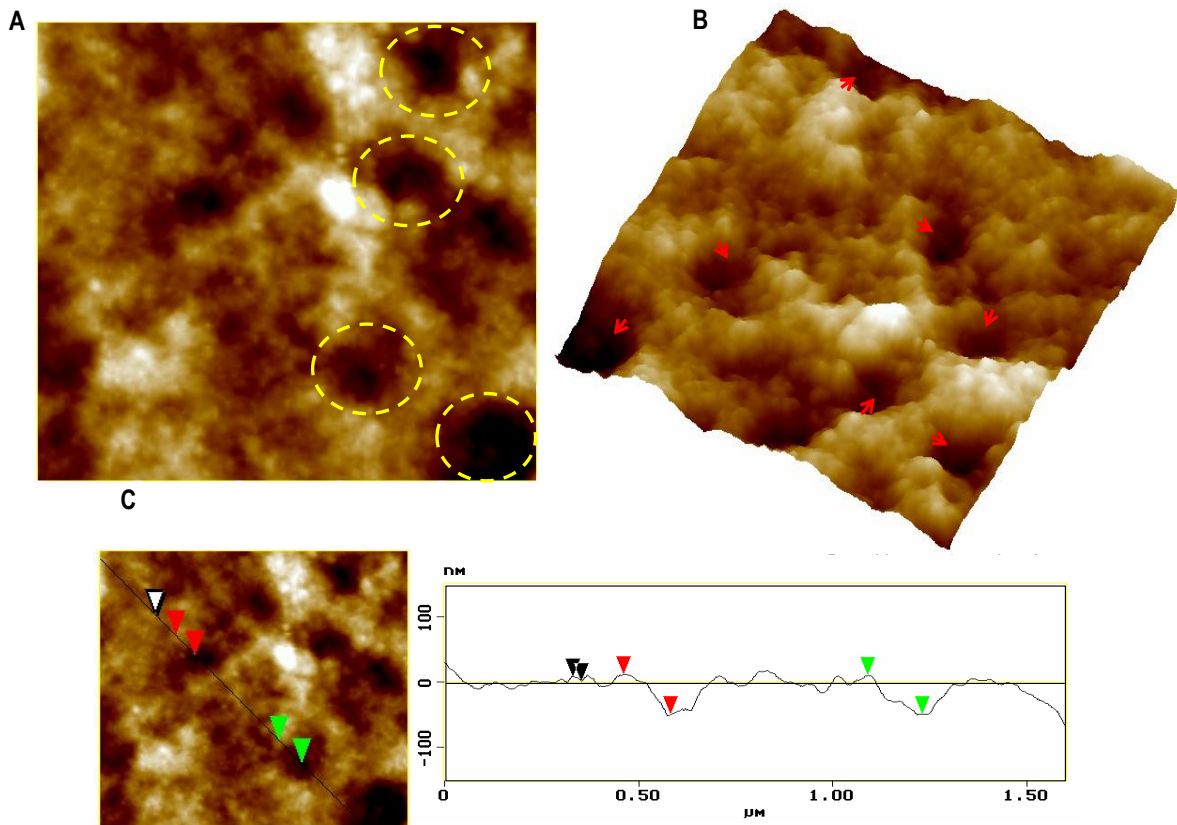


Figura 22. Formación de diversos orificios en la membrana plasmática de las células MCF-7. Micrografías de AFM donde se pueden observar la presencia de diferentes orificios en la membrana plasmática de las células MCF-7 incubadas por 12 h con las AuNP. La imagen (A) muestra una micrografía en modo altura donde se señala la ubicación de las depresiones (círculos amarillos) a lo largo de la superficie escaneada. Este efecto se muestra también en la imagen tridimensional (B) donde las flechas indican la presencia de los orificios que presentan diferentes longitudes y dimensiones (datos no mostrados) como lo muestra la línea de trazo del análisis microtopográfico. Valor Z= 787.56 nm.

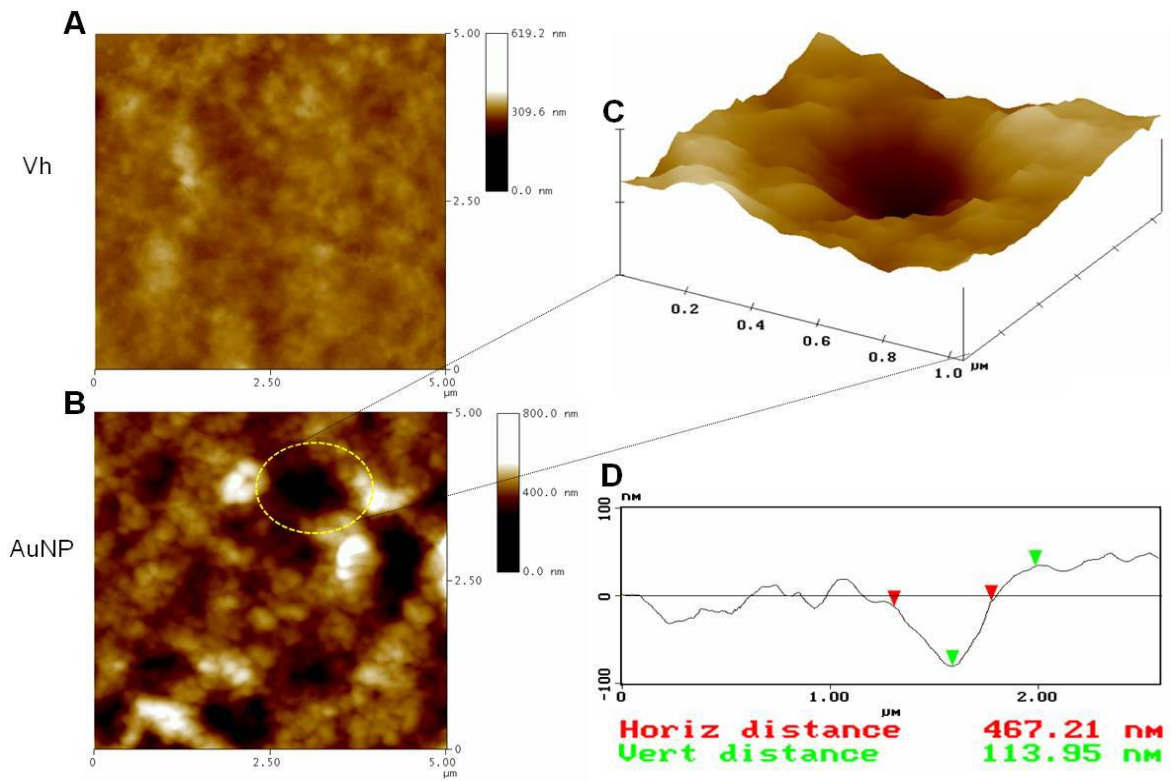


Figura 23. Las AuNP inducen la formación de poros en las membranas de células MCF-7. Las AuNP (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a las 12 h de incubación) inducen mayor rugosidad en las membranas de células MCF-7 (B) en comparación con las tratadas con Vh (A). Se observó la formación de poros en la superficie de las membranas en células incubadas con AuNP (C). Las imágenes se fueron obtenidas en AFM, en modo tapping/altura. Las dimensiones de los nanoporos rondaban los 467.21 nm de diámetro mientras la profundidad se encontraba en 113.95 nm. El valor en los datos de profundidad es representativo ya que la sonda del AFM pudo haber topado con la superficie del hoyo sin resolver más allá de lo que le permitió el cantiléver (al chocar con la periferia del nanohoyo). Valor Z= 867.59 nm.

8. DISCUSIÓN

Las AuNP juegan un papel importante en el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer de mama ya que resultan útiles en el tratamiento y diagnóstico temprano de este padecimiento, debido a sus características únicas que incluye una alta permeabilidad y retención en el tejido tumoral, una alta absorción de luz y la resonancia del plasmón superficial cercana al infrarrojo, así como la generación de electrones secundarios al ser expuestas por un campo de radiación provocando un efecto fototérmico y por su capacidad de conjugarse con fármacos u otros agentes de importancia medica [22]. Tomando las ventajas de sus propiedades fisicoquímicas, las AuNP han llamado fuertemente la atención de diferentes grupos de investigación al ser empleadas en el estudio del efecto fototérmico para la destrucción de células cancerosas o tejido tumoral que puede ser potencialmente útil en el entorno clínico [56]. Sin embargo, es necesario comprender los mecanismos asociados a la correcta interacción de estas nanopartículas con la superficie de células cancerosas para determinar con precisión la selección correcta entre células malignas y cancerosas. En el presente trabajo se analizaron los cambios que ocurren en la superficie membranal de células de carcinoma mamario MCF-7 al entrar en contacto con AuNP de 20 nm de diámetro. Se estudiaron 3 diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular (20, 50 y 80 $\mu\text{g/mL}$) debido a que se buscaba encontrar un efecto sobre la morfología de las células sin llegar a provocar un efecto citotóxico. Reportes anteriores muestran que el uso de AuNP en concentraciones por arriba de 100 $\mu\text{g/mL}$ provoca muerte celular asociado a apoptosis en la línea celular MCF-7 [57], así como la administración de AuNPs de 13 nm de diámetro en concentraciones por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$ durante la incubación superior a 24 h, causa daños irreparables tanto a la arquitectura de la membrana plasmática de los fibroblastos dérmicos humanos (HDFa) [58] y la mitocondria y el núcleo de las células de leucemia mielógena crónica (K562) [59]. Estos resultados fueron reproducidos en células de cáncer de próstata [60], de pulmón [61] y en células de cáncer nasofaríngeo [62], lo que sugiere que bajo estas condiciones las AuNP provocan la muerte celular mediada por procesos relacionados con apoptosis o necrosis. Nuestros resultados mostraron que la viabilidad celular disminuye solo cuando las células son expuestas a la concentración más alta empleada en el estudio (80 $\mu\text{g/mL}$) y cuando fueron incubadas por más de 24 h observándose un mayor efecto de muerte celular hacia las 72 h. Los datos del análisis de morfología mostraron que las células MCF-7 que empleamos en los estudios presentan un deterioro en su estructura morfológica conforme avanza el tiempo de exposición a las AuNP, esto se debe al fenómeno de agregación en la

superficie membranal. Estudios previos han demostrado que las AuNP de 20 nm de diámetro mostraron una mayor cantidad de captación comparada con nanopartículas de tamaños variados (5, 10, 30, 40 y 50 nm), fenómeno asociado a la estabilidad que presentan las AuNP de 20 nm de diámetro al proceso de agregación que es fundamental para los mecanismos de incorporación y que generan efecto en la membrana plasmática de las células cancerosas pancreáticas (PK-1, PK-45 y Pan-1) [63]. Los datos obtenidos en proceso de viabilidad nos llevó a reducir los tiempos de exposición de AuNP a las células para realizar los análisis de los cambios en las propiedades de la membrana plasmática por efecto de la captación de las AuNP. A partir de esto, los siguientes experimentos se realizaron a las 6, 12, 16 y 24 h de incubación utilizando la concentración más alta debido a que el daño celular se observó después de las 48 h de incubación.

Las AuNP son inmediatamente absorbidas en la superficie de las células y tejidos para posteriormente ser internalizadas dependiendo de sus características como el tamaño, la forma, así como su carga superficial y superficie química [64]. Comprender la interacción de las AuNP con la superficie de la membrana es de vital importancia para explorar el uso potencial y la eficiencia de las nanopartículas en la liberación intracelular de agentes terapéuticos. Vazir y Labhasetwar emplearon la AFM para analizar la interacción de nanopartículas poliméricas con la membrana plasmática de células de cáncer de mama MDA-MB-231. Estos autores observaron que la superficie membranal muestra cambios en las propiedades biomecánicas que rigen la estructura de la misma, estos cambios consisten en la modificación de las fuerzas de interacción entre la sonda de la AFM y la superficie membranal, así como el aumento en la rugosidad por efecto de la interacción de dichas nanopartículas. De esta forma, demostraron que la AFM es una excelente herramienta para estudiar los efectos ocasionados por la interacción y captación de nanopartículas sobre las células cancerosas [39].

En este contexto, la AFM se ha usado para la caracterización, con resolución especial a nivel nanométrico, de superficies celulares y su interacción con nanomateriales. Las imágenes son generadas por el monitoreo de la interacción de fuerzas entre la sonda y la superficie de una muestra [65]. Para el análisis de la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 tratadas con AuNP y con vehículo, se empleó AMF debido a que ha demostrado ser una poderosa herramienta para el análisis superficial de una amplia variedad de muestras biológicas [66, 67, 68] (especialmente células) in vitro e in vivo y actualmente se emplea para el monitoreo de la interacción de AuNP con la membrana plasmática de las células cancerosas con una resolución espacial de

escala nanométrica [35]. El análisis de la captación de AuNP en las células se realizó por AFM en el modo Altura-Tapping y modo contacto. Para la obtención del cálculo de la rugosidad de la membrana de plasmática se tomaron en consideración los parámetros de $RMS_{[Rq]}$. En primer lugar se caracterizaron las zonas donde se realizaron los barridos que comenzaron en imágenes de células completas y posteriormente se fueron obteniendo barridos de dimensiones de 20, 10, 5, 2.5 y 1 μm^2 (Figura 7) en diferentes zonas de las células como regiones citoplasmáticas y nucleares (datos no mostrados). El área de barrido para todos los análisis de rugosidad fue de 5 μm^2 en diferentes células individuales. Los resultados mostraron que las zonas alejadas del núcleo (Figura 5A) fueron las que presentaron mayor uniformidad en la superficie, condiciones adecuadas para el resto de los análisis ya que regiones cercanas y sobre el núcleo eran completamente irregulares provocando mayor flexibilidad de la sonda generando aberraciones en la obtención de las imágenes y valores incorrectos en el análisis morfotopográfico. La importancia de caracterizar las regiones específicas que mostraran mejores características en la superficie de la membrana plasmática de las células MCF-7 empleadas en este estudio para el análisis de rugosidad se debe al hecho de que en trabajos anteriores se han registrado los cambios en la rugosidad de la superficie membranal de un conjunto de células a la vez [69] lo que genera datos de rugosidad de no solo una región específica de la célula sino de dos o más superficies membranales propiciando una comprensión errónea del efecto de los nanomateriales sobre las células cancerosas. Estos resultados aportan información relevante en cuestión de modificaciones en las propiedades mecánicas de la membrana plasmática de las células cancerosas debido a que la interacción de las AuNP con su superficie y su posterior incorporación desencadena una serie de eventos moleculares asociados al fenómeno de captación por endocitosis, así como a la generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno al entrar en contacto con organelos vulnerables al daño ocasionado por las AuNP y la subsecuente muerte celular [70, 71].

Las técnicas microscópicas como SEM, TEM y microscopio óptico siguen siendo comunes en el estudio de la morfología celular y puede proporcionar una gran cantidad de información con respecto a las características estructurales de las células. Sin embargo, la invención de la AFM ha generado el desarrollo de estudios en sistemas biológicos a través de información en imágenes topográficas en 2D y 3D de súper alta resolución convirtiéndolo en un nuevo método poderoso para la visualización de ultraestructuras celulares, hasta el nivel de estructuras tales como un poro nuclear [65]. Estas ventajas han logrado hacer que el AFM pueda analizar los fenómenos asociados con la

interacción de AuNP y la superficie celular, mecanismos que no pueden ser revelados por las microscopias convencionales antes mencionadas [72]. En este contexto, empleamos la AFM para determinar la localización de las AuNP sobre la superficie de la membrana plasmática de las células MCF-7 estudiadas. Nuestros resultados mostraron la localización de aglomerados de AuNP mediante AFM y se detectaron como estructuras que presentaron un rango de tamaño entre los 80 y 400 nm sobre la superficie de la membrana plasmática de las células MCF-7. Estas estructuras localizadas en la superficie membranal presentaron las mismas dimensiones que los aglomerados de AuNP detectados sobre la superficie de la película de oro en la placa utilizada como sustrato para el crecimiento celular (Figura 8C). Nuestras observaciones coinciden con lo reportado por otros autores con respecto a las AuNP detectadas en la superficie membranal, así como la distribución intracelular de células osteoblasto de la bóveda craneal de ratón (MC3T3-E1) [73], en células de cáncer pancreático PK-1, PK-45 y Panc-1 [74] y en células de cáncer de hígado Hep-G2 [75], obtenidas mediante TEM, SEM Y CLSM.

Si bien los resultados obtenidos de la presencia de las AuNP sobre la superficie membranal adquirida mediante AFM son datos indirectos, se buscó la forma de localizar a las nanopartículas en las células. Esta información es fundamental ya que con esto se demuestra la interacción e incorporación de las AuNP en las células y por ende las modificaciones que ocasionan al entrar en contacto con la membrana plasmática. Una de las formas correctas de monitorear la incorporación de AuNP en las células cancerosas es explotar su propiedad física de emisión fluorescente.

Los resultados son congruentes con reportes previos en donde se ha demostrado que las AuNP de diferentes tamaños (10, 15, 20, 30 y 50 nm) y formas (nanrods, nanocages, nanostars, nanosphericals, nanoshells) tienen la capacidad de emitir señal fluorescente debido a sus propiedades ópticas y han sido detectadas en las longitudes de onda de 458 a 683 nm, esto a través de LSCM [10, 75] y espectroscopia Raman [76, 77, 78]. Cabe mencionar que la mayoría de los experimentos reportados con CLSM requieren de la funcionalización de las AuNP con marcadores fluorescentes para ser detectadas en el interior celular [79, 80], mientras que la espectroscopia Raman genera imágenes de baja calidad en cuanto a la señal fluorescente de las AuNP desnudas en modelos *in vitro* [37]. Estos resultados obtenidos por la CLSM apoyan los análisis de superficie de membrana realizados por el AFM, donde se propone que las AuNP se conglomeran en la membrana plasmática de las células de cáncer de mama MCF-7 y, además, se confirma la incorporación de AuNP al interior celular.

Nuestros resultados de análisis espectral realizado mediante MCBL (Figura 10 y 11) mostraron la emisión de una señal fluorescente de las AuNP desnudas de 20 nm de diámetro en el rango de longitud de onda cercano al infrarrojo (626 nm) por lo que esta información apoya a los datos obtenidos por AFM con el propósito de demostrar la presencia de aglomerados de AuNP sobre la membrana plasmática de las células de carcinoma mamario MCF-7 y, además confirma la incorporación intracelular de dichas nanopartículas. Esta información también pudo ser corroborada a través de imágenes de campo claro de la microscopia confocal donde se localizaron aglomerados de AuNP distribuidos en las células como puntos negros (Figura 12).

Los datos obtenidos muestran que después de 6 h de incubación, las AuNPs, se distribuyen de forma heterogénea y no todas las células incorporaron en la misma proporción de nanopartículas. Sin embargo, a las 12 h de exposición, se observa que las AuNPs se incorporan en mayor medida en el núcleo (Figura 13). Esto puede observarse con mayor seguridad debido al hecho de que la emisión de fluorescencia detectada en una coloración rosa, es el resultado de la superposición de los espectros de fluorescencia emitida por las AuNP y por DAPI. Este efecto fue demostrado por análisis de "Z-stack" (Figura 14). Los resultados obtenidos a las 24 h de incubación con AuNPs muestran la emisión de fluorescencia menor en comparación con la obtenida a las 12 h (Figura 13), que podría ser debido a la expulsión celular de AuNPs o al daño ocasionando la muerte de las células y que permite observar agregados de AuNP dispersos en el medio de cultivo. Se ha reportado que después de las 24 h, la interacción de AuNP con el núcleo en células MCF-7 [57] y de pulmón [81] genera desestabilización de la envoltura nuclear, alterando la función de este orgánulo, provocando que la célula se colapse y muera [49, 82]. Estos fenómenos se encuentran estrechamente relacionados con los procesos de captación y transporte vesicular de las AuNP por las células. Después de la penetración de las nanopartículas en la membrana plasmática, el tráfico intracelular de las AuNP es desarrollada a través de mecanismos moleculares que involucran la presencia de endosomas, lisosomas o fagosomas [83]. Estudios previos han demostrado que las AuNP pueden ser internalizadas en lisosomas y que estos organelos pueden moverse hacia el núcleo con una distribución perinuclear dependiente del tiempo de exposición [37]. Nuestros resultados concuerdan con estas investigaciones al observar que existe un transporte vesicular de las AuNP cuando incluimos un marcador para lisosomas (LysoTrackerGreen®) como se muestra en la figura 15. Este fenómeno es de vital importancia ya que la comprensión del transporte vesicular de las AuNP puede derivar en una mejor selectividad de organelos, como las mitocondrias y núcleos,

de células cancerosas e inducir apoptosis aumentando la tasa de mortalidad de las células tumorales y disminuyendo el efecto mortífero en células no cancerosas [83].

Desde la parte externa, el fenómeno de interacción de nanopartículas con la superficie celular genera modificaciones en la estructura y propiedades de la membrana plasmática de las células [84]. La penetración de AuNP en las células puede estar ajustada al tipo de carga en su superficie. Las modificaciones convencionales que sufre la membrana plasmática de las células se encuentra asociado a mecanismos de captación como la endocitosis [85]. En nuestro estudio, se observó que la interacción de las AuNP con la superficie membranal de las células MCF-7 altera la rugosidad conforme avanzaba el tiempo de incubación de dichas AuNP. A partir del tiempo 0, la rugosidad fue aumentando gradualmente hasta las 6 h de incubación. Sin embargo, la rugosidad aumento significativamente cuando las células fueron incubadas por 12 h con las AuNP en comparación con las células no tratadas (Figura 17). Los valores de RMS[Rq] fueron disminuyendo pasadas las 12 h de incubación. La rugosidad se estabilizo a las 24 h de incubación casi a la par que la rugosidad de la membrana plasmática de las células control. Las imágenes de alta resolución del AFM mostraron las formaciones de subestructuras y poros (flechas) en la membrana asociadas a la captación y endocitosis [85, 86] de las AuNP (Figura 22). La mayor formación de dichas estructuras se detectó en las células MCF-7 que fueron incubadas con las AuNP por 12 y 16 h. Reportes anteriores han descrito que la formación de los nanoporos responde a la disrupción que existe en la membrana plasmática ocasionada por la interacción y captación de nanopartículas poliméricas y su posterior incorporación vía endocíticas [36]. Las Figuras 22B y 23C muestran imágenes tridimensionales del AFM donde se observa la formación orificios en la superficie membranal, con dimensiones de 467 nm de diámetro en uno de ellos como se muestra el análisis topográfico (Figura 23D). La profundidad del nanoporo no se determinó con exactitud debido a que la sonda no logro interactuar con la superficie de la membrana en la base del hoyo indicando que dicha profundidad sobrepasaba la capacidad de barrido por parte de la sonda ya que la base del cantiléver tocaba la región donde comenzaba a formarse el poro. Las dimensiones presentadas por el nanohoyo proponen que se trata de un poro endosítico por el cual se han incorporado las AuNP en clúster debido al tamaño del poro. Este fenómeno, además de estar implicado en la captación de las AuNP, puede estar asociado a daños ocasionados por disrupción de la membrana plasmática dependiente del tiempo de exposición a las AuNP por lo que este estudio ayuda a comprender el efecto directo de las

nanopartículas sobre las células cancerosas y sus implicaciones clínicas para la correcta aplicación en el diagnóstico temprano y tratamiento efectivo.

9. CONCLUSIONES

El estudio del efecto de la interacción e incorporación de las AuNP sobre la membrana plasmática de las células de carcinoma mamario que se realizó a través de la AFM, arrojó información importante para comprender parte del proceso de captación de las nanopartículas asociado a modificaciones en las propiedades biomecánicas de la membrana celular.

Los resultados demuestran que las AuNP de 20 nm de diámetro provocan cambios en la rugosidad de la membrana plasmática asociada a un posible mecanismo de endocitosis debido a la formación de orificios o nanoporos con respecto al tiempo de exposición de las nanopartículas en la superficie celular.

Del mismo modo, se logró reforzar el hecho de que las AuNP generan señal fluorescente *per se*, lo que conlleva a un elevado costo de producción, y de este modo monitorear la incorporación y distribución intracelular de las AuNP mediante CMLS, así como observar su progresivo avance hacia el núcleo, que es dependiente del tiempo.

Finalmente, se demostró que el uso coordinado de las técnicas microscópicas de alta resolución (AFM y CMLS) pueden ser empleadas para monitorear los cambios dinámicos en la superficie de la membrana celular y su distribución intracelular cuando las células son expuestas a varios tipos de nanopartículas proporcionando así información importante para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos ancladas a nanopartículas de oro para el diagnóstico temprano del cáncer de mama al servir como nanosensor y unirse a receptores específicos, así como en el tratamiento específico considerando una dosis y tiempo de exposición adecuados que son fundamentales para la práctica clínica a corto plazo.

10. PROSPECTIVAS

Obtener de datos que asocien los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 con la localización puntual de las AuNP sobre la superficie membranal de las células cancerosas mediante análisis superficial y elemental por SEM y TEM, así como el estudio de los mecanismos de incorporación mediados por endocitosis empleando marcadores específicos para caveolinas y clatrininas correlacionando la información de los datos obtenidos por AFM en la formación de nanoporos. Así mismo, es ponderante estudiar la asociación de estos fenómenos con el efecto citotóxico de las AuNP sobre las células cancerosas y compararlos con otras líneas celulares cancerosas y no cancerosas con la finalidad de determinar la selectividad asociado a las propiedades biomecánicas de sus membranas plasmáticas mediante análisis de fuerzas por AFM y métodos de biología molecular para evaluar posibles vías de señalización implicadas en los daños ocasionados por la captación de las AuNP, para posteriormente continuar con su evaluación en modelos *in vivo* como el embrión de pollo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Tanaka T, Decuzzi P, Cristofanilli M, Sakamoto JH, Tasciotti E, Robertson FM and Ferrari M. ***Nanotechnology for breast cancer therapy***. Biomed Microdevices. 2009;11:49-63.
2. Malam Y, Loizidou M and Seifalian M. ***Liposomes and nanoparticles nanosized vehicles for drug delivery in cancer***. Trends in Pharmacological Science. 2009;30(11):592-599.
3. Finlay J, Roberts CM, Lowe G, Loeza J, Rossi JJ and Glackin CA. ***RNA-Based TWIST1 inhibition via dendrimer complex to reduce breast cancer cells metastasis***. BioMed Research International. 2015;ID382745:12 pages.
4. Neves LF, Kraiss JJ, Van Rite BD, Ramesh R, Resasco DE and Harrison RG. ***Targeting single-walled carbon nanotubes for the treatment of breast cancer using photothermal therapy***. Nanotechnology. 2013;24:375104 (12pp).
5. Zhang W, Ji Y, Wu X and Xu H. ***Trafficking of gold nanorods in breast cancer cells. Uptake, lysosome maturation and elimination***. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2013;5(19): 9856–9865.
6. Malik MT, O'Toole MG, Casson LK, Thomas SD2, Bardi GT, Reyes-Reyes EM, Ng CK, Kang KA and Bates PJ. ***AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy***. Oncotarget. 2015;6(26): 22270-2228.
7. Zharov V, Kim J, Curiel D and Everts M. ***Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy***. Nanomedicine. 2005;1:326-345.
8. Silva G. ***Introduction to nanotechnology and its applications to medicine***. Surg Neurol. 2004;61:216-220.
9. Shibu ES, Hamada M, Murase N and Biju V. ***Nanomaterials formulation for photothermal and photodynamic therapy of cancer***. J. Photochem. Photobiol. C. 2013;(15):53-72.
10. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert A. ***Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments***. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2014;10:19-34.
11. Wang X, Yang L, Chen Z and Shin DM. ***Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging***. CA Cancer J Clin. 2008;58:97-110.

12. Wang X, Wang Y, Chen Zhuo, Shin DM. **Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology.** *Cancer. Res Treat.* 2009;41(1):1-11.
13. Jing-Liang L, Min G. **Gold-nanoparticle-enhanced cancer photothermal therapy.** *IEEE;* 2010;16:989-996.
14. Raciot J. **Gold Nanoparticles: The Future of Cancer Diagnosis and Treatment.** da Vinci's Notebook. 2010;2:1-2.
15. Jain S; Hirst DG and O'Sullivan J M. **Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy.** *Br. J. Radiol.* 2012;85:101–13.
16. Coulter JA, Jain S, Butterworth K T, Taggart L E, Dickson GR, McMahon SJ and Prise KM. **Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles.** *International journal of nanomedicina.* 2012;7,2673.
17. Xing J, Zeng J, Yang J, Kong T, Xu T, Roa W, Wang X, Chen J. **Gold-Based Nanoparticles for Breast Cancer Diagnosis and Treatment.** *IEEE International Symposium on Circuits and Systems: ISCAS.* 2007:2882–2885.
18. Jain PK, Eustis S, El-Sayed MA. **Plasmon Coupling in Nanorods Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation simulation, and exciton-coupling model.** *J Phys Chem B.* 2006;110:08243-18253.
19. Tsai SW, Chen YY and Liaw JW. **Compound cellular imaging of laser scanning confocal microscopy by using gold nanoparticles and dyes.** *Sensor.* 2008;8:2306-2316.
20. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH and El-Sayed M. **Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles.** *Laser Med Sci.* 2008;23:217-2128.
21. Huang X and El-Sayed M. **Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy.** *Journal of Advanced Research.* 2010;1:13–28.
22. Lee J, Chatterjee DV, Lee MH and Krishnan. **Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls.** *Cancer Lett.* 2014;347(1):46-53.
23. Kodiha M, Wang YM, Huteter E, Maysinger D and Stochja U. **Off on the organells-Killing cancer cells with targeted gold nanoparticles.** *Teranostic.* 2015;5(4): 357-370.
24. Yezhelyev MV., Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S and O'Regan RM. **Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer.** *The lancet oncology.* 2006;7(8):657-667.

25. Carpin LB, Bickford LR, Agollah G, Yu TK, Schiff R, Li Y and Drezek RA. ***Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells***. Breast Cancer Res Treat. 2011;125:27–34.
26. Bausch AR and Kroy K. ***A bottom-up approach to cell mechanics***. Nat Phys. 2006;2:231–238.
27. Olson MF and Sahai E. ***The actin cytoskeleton in cancer cell motility***. Clin Exp Metastasis. 2009;26(4):273-87.
28. Dokukin ME, Guz NV and Sokolov I. ***Quantitative study of the elastic modulus of loosely attached cells in AFM indentation experiments***. Biophys J. 2013;104(10):2123-31.
29. Wang Y, Xu C, Jiang N, Zheng L, Zeng J, Qiu C, Yang H and Xie S. ***Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy***. Scanning. 2016;9999:1-6.
30. Müller DJ, Dufrêne YF. ***Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface***. Trends Cell Biol. 2011;21:461-469.
31. Tapia M, Batina N, Maldonado E, Tanori J, Ramón E. ***Nanosopic characterization of the membrane surface of the HeLa cancer cells in the presence of the gold nanoparticles: an AFM study***. Revista Mexicana de Física. 2009;55(1):64-67.
32. Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF. ***Force probing surfaces of living cells to molecular resolution***. Nature Chemical Biology. 2009;5:383-390.
33. Mierke CT. ***Cancer Cells Regulate Biomechanical Properties of Human Microvascular Endothelial Cells***. The Journal of Biological Chemistry. 2011;286(46):40025-40037.
34. Kaul-Ghanekar R1, 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. 2009;9(350):1-12.
35. Riveros A, Dadlani K, Salas E, Caballero L, Melo F and Kogan MJ. ***Gold nanoparticle-membrane interactions: Implications in biomedicine***. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. 2013;3(1):4-21.
36. Ding B, Tian Y, Pan Y, Shan Y, Cai M, Xu H, Sun Y and Wang H. ***Recording the dynamic endocytosis of single gold nanoparticles by AFM-based force tracing***. Nanoscale. 2015;7:7545-7549.

37. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu Bhonde AR, Sastry M. **Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview.** *Langmuir.* 2005;21:10644-10654.
38. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR, Banaszak MM. **Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayer and cells: hole formation and the relation to transport.** *Bioconjugated chemistry.* 2004;15:774-782.
39. Vasir JK, Labhsetwar V. **Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles.** *Biomaterials.* 2008;29:4244-4252.
40. Zhang W, Ji Y, Wu X and Xu H. **Trafficking of gold nanorods in breast cancer cells. Uptake, lysosome maturation and elimination.** *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2013;5(19):9856–9865.
41. Kang B, Mackey MA, and El-Sayed MA. **Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis.** *Am. Chem. Soc.* 2010;132(5):1517–1519.
42. Garcia C P, Sumbayev V, Gilliland D, Yasinska IM, Gibbs BF, Mehn D, Calzolari L and Rossi F. **Microscopic analysis of the interaction of gold nanoparticles with cells of the innate immune system.** *Scientific Reports.* 2013;3.
43. Taylor U, K Sabine, Petersen S, Kues W, Barcikowski S. **Nonendosomal Cellular Uptake of Ligand-Free, Positively Charged Gold Nanoparticles.** *Cytometry Part A.* 2010;77:439-446.
44. Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA and Aberg C. **Nanoparticles adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticles uptake efficiency.** *J. Am. Chem. Soc.* 2013;125:1438-1444.
45. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS and Hoekstra. **Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis.** *Biochem J.* 2004;377:159-169
46. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, Pabelick CM, Bhattachaya R, Robertson JD, Rotello VM, Prakash YS and Mukherjee P. **Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond.** *Nanoletters.* 2010;10:2543-2548.

47. Fröhlich E. **The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles.** *International Journal Nanomedicine.* 2012;7:5577-5591
48. Nativo P, Prior IA and Brust M. **Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles.** *AcsNano.* 2008;2(8):1639-1644.
49. Kodiha M, Hutter E, Boridy S, Juhas M, Maysinger D, Stochaj U. **Gold nanoparticles induce nuclear damage in breast cancer cells, which is further amplified by hyperthermia.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:4259-4273.
50. Soenen S, Manshian B, Montenegro JM, Amin F, Meermann B, Thiron, Cornelissen M, Vanhaecke F, Doak S, Parak WP, De Smedt D, Braeckmans K. **Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles: A Multiparametric Study.** *Acs Nano.* 2012;6:5767-5783.
51. Dam DH, Lee JH, Sisco PN, Co DT, Zhang M, Wasielewski M and Odom TW. **Direct observation of nanoparticles cancer cells nucleus interaction.** *Acts Nano.* 2012;6(4):3318–3326.
52. Panariti A, Miserocchi G and Rivolta I. **The effect of nanoparticles uptake on cell behavior: disruption or enabling functions?** *Nanotechnology, Science and Applications.* 2012;5:87-100.
53. Taggart LE, McMahon SJ, Currell FJ, Prise KM and Butterworth KT. **The role of mitochondrial function in gold nanoparticle mediated radiosensitisation.** *Cancer Nanotechnology.* 2014;5(5):1-12.
54. Ziegler U and Groscurth P. **Morphological Features of Cell Death.** *News Physiol Sci.* 2014;19:124128.
55. Uzunbajakava N, Lenferink A, Kraan Y, Volokhina E, Vrensen G, Greve J and Otto, C. **Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells.** *Biophysical journal.* 2003;84(6):3968-3981.
56. Cai W, Gao T, Hong H and Sun J. **Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology.** *Nanotechnology Science and Applications.* 2008(1).
57. Selim ME, Hendi AA. **Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(4):1617-1620.
58. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A and Rafailovich M. **Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblast.** *Small.* 2006;2(6):766–773.

59. Huang YC, Yang YC, Yang KC, Shieh HR, Wang TY, Hwu Y, Chen YJ. ***Pegylated gold nanoparticles induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells.*** BioMed Research International. 2014; ID 182353:9 pages.
60. Malugina A and Ghandeharia H. ***Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres.*** J. Appl. Toxicol. 2009;30(3):212–217.
61. Liu M, Gu X, Zhang K, Ding Y. ***Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione.*** J Nanopart Res. 2013;15(8):1745-1748.
62. Lan MY, Hsu YB, Hsu CH, Ho CY, Lin JC, Lee SW. ***Induction of apoptosis by high.dose gold nanoparticles in nasopharyngeal carcinoma cells.*** Auris Nasus Larynx. 2013;40(6):563-568.
63. Trono JD, Mizuno K, Yusa N, Matsukawa T, Yokoyama K and Uesaka M.. ***Size, Concentration And Incubation Time Dependence Of Gold Nanoparticle Uptake Into Pancreas Cancer Cells And Its Future Application To X-Ray Drug Delivery System.*** Journal of radiation research, 2011;52(1):103-109.
64. Huang K, Ma H, Liu J, Huo S, Kumar A, Wei T, Zhang X, Jin S, Gan Y, Wang PC, He S, Zhang X and Liang XJ. ***Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo.*** ACS Nano. 2012;6(5):4483–4493.
65. Morris V, Andrew RK and Gunning AP. ***Atomic force microscopy for biologists.*** Vol. 57. London: Imperial College Press, 1999.
66. Ohnesorge FM, Hörber JK, Häberle W, Czerny CP, Smith DP and Binnig G. ***AFM Review study on pox virises and living cells.*** Biophysical Journal. 1997;73(4):2183-2194.
67. Domke J, Parak WJ, George M, Gaub HE and Radmacher M. ***Mapping the mechanicals pulse on single cardiomyocytes with the atomic forze microscope.*** European Biophysic Journal. 1999;28(3):179-186.
68. Kirby A, Gunning J et al. ***Visualization of plants walls by atomic force microscopy.*** Biophysial Journal. 1996;70(3):1138-1143.
69. Wang J, Wan Z, Liu W, Li L, Ren L, Wang X, Sun P, Ren L, Zhao H, Tu Q, Zhang Z, Song N and Zhang L. ***Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs.*** Biosens Bioelectron. 2009;25(4):721-7.

70. Khaing OMK, Yang Y, Hu Y, Gomez M, Du H, and Wang H. **Gold nanoparticle-enhanced and size-dependent generation of reactive oxygen species from protoporphyrin IX.** ACS nano, 2012;6(3):1939-1947.
71. Chithrani BD and Chan W. C. **Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes.** Nano letters. 2007;7(6); 1542-1550; 76.
72. Pyrgiotakis G, Blattmann CO and Demokritou P. Real-Time **Nanoparticle–Cell Interactions in Physiological Media by Atomic Force Microscopy.** ACS Sustain Chem Eng. 2014;2(7): 1681–1690.
73. Mustafa T, Watanabe F, Monroe W, Mahmood M, Xu Y, Saeed LM, Karmakar A, Casciano D, Ali S, Biris AS. **Impact of gold nanoparticle concentration on their cellular uptake by MC3t3-e1 mouse osteoblastic cells as analyzed by transmission electron microscopy.** J Nanomedic Nanotechnol. 2011;2(6):1000118.
74. Trono J, Mizuno K, Yusa N, Matsukawa T, Uesaka M. **Cellular Uptake of Gold Nanoparticles into Normal and Cancer Cells.** WC. IFMBE Proceedings. 2009;25:202–205.
75. Rago G, Bauer B, Svedberg F, Gunnarsson Linda, Ericson MB, Bonn M, and Enejder A., **Uptake of Gold Nanoparticles in Healthy and Tumor Cells Visualized by Nonlinear Optical Microscopy.** J. Phys. Chem. B. 2011;115:5008–5016.
76. Shah NB, Dong J, Bischof JC. **Cellular uptake and nanoscale localization of gold nanoparticles in cancer using label-free confocal Raman microscopy.** Molecular Pharmaceutics. 2010;8(1):176-184.
77. Zhen W. **Plasmon-resonance gold nanoparticles for cancer optical imaging.** Sci China-Phys Mech Astron. 2013;56(3):506-513.
78. Huefner A, Setiadi D, Wilts BD, Patel II, Kuan WL, Fragniere A, Baker RA, Mahajan S. **Gold nanoparticles explore cells: Cellular uptake and their use as intracellular probes.** Methods. 2014;68:354–363.
79. Gonciar A. **Detection of intracellular gold nanoparticles.** Biotechnology, molecular biology and nanomedicine. 2014; 2:21-25.
80. Klein S Petersen S, Taylor U, Rath D, Barcikowski S. **Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy.** Journal of Biomedical Optics. 2010;15(3):036015-036015-11.

- 81.Liu Z, Wu Y, Guo Z, Liu Y, Shen Y, Zhou P, Lu X. **Effects of internalized gold nanoparticles with respect to cytotoxicity and invasion activity in lung cancer cells.** PLoS ONE. 2014;9(6):e99175.
- 82.Kodiha M, Wang YM, Huteter E, Maysinger D and Stochja U. **Off on the organells-Killing cancer cells with targeted gold nanoparticles.** Teranostic. 2015;5(4):357-370.
- 83.Jiang XM, Wang LM and Chen CH. **Cellular uptake, intracellular trafficking and biological responses of gold nanoparticles.** Journal of the Chinese Chemical Society. 2011;58:273-281.
- 84.Wang L, Liu Y, Li W, Jiang X, Ji Y, Wu X, Xu L, Qiu Y, Zhao K, Wei T, Li Y, Zhao Y and Chen C. **Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy.** Nano Lett. 2011;11(2):772-80.
- 85.Mecke A, Uppuluri S, Sassanella TM, Lee DK, Ramamoorthy A, Baker JR Jr, Orr BG and Banaszak Holl MM. **Direct observati3n of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers.** Chemistry and physic of lipinds. 2004;132(1):3-14.
- 86.Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra. **Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis.** Biochemical Journal. 2004;377(1):159-169.

12. ANEXO 1: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN ACEPTADO POR ESTE TRABAJO

Dear Dr Lara Cruz,

I am pleased to inform you that your manuscript "Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles" has been accepted for publication in "International Journal of Nanomedicine".

If you have any questions about your paper please contact me at any time jeanette@dovepress.com

Yours sincerely.

Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles

Lara-Cruz C^{1,‡}, Jiménez-Salazar JE¹, Ramón-Gallegos E², Damian-Matsumura P¹ and Batina N^{3,*}

¹Department of Biology of Reproduction, Metropolitan Autonomous University (UAM), Mexico City, Mexico.

²Departament of Morphology. National School of Biological Sciences. National Polytechnic Institute (IPN). Mexico City, Mexico. ³Nanotechnology and Molecular Engineering Laboratory, Chemistry Department. Metropolitan Autonomous University (UAM), Mexico City, Mexico. ‡ Experimental Biology Graduate Program (212870) Metropolitan Autonomous University (UAM), Mexico City, Mexico.

*Correspondence: Nikola Batina. Nanotechnology and Molecular Engineering Laboratory, Chemistry Department. Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5804-4939, Fax: +52 55 5804-4666; E-mail address: bani@xanum.uam.mx

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) have been proposed for use in the treatment of different types of cancer, including breast cancer. At present, neither the mechanisms of AuNPs interaction with the plasma membrane surface and their delivery and intracellular distribution in cancer cells, nor their effect on the plasma membrane so as to allow cell incorporation of larger amounts of AuNPs are known.

The objective of this work was to study the interaction of bare 20nm-diameter AuNPs with the plasma membrane of human MCF-7 breast cancer cells, as well as their uptake, intracellular distribution and induction of changes on the cell surface roughness. The dynamics of intracellular incorporation and the distribution of AuNPs were observed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Changes in roughness were monitored in synchronized MCF-7 cells by Atomic Force Microscopy (AFM) high-resolution imaging at 6-hour intervals for 24 hours during a single cell cycle. The results show that bare AuNPs are capable of emitting fluorescence at 626 nm, with no need for using a fluorescent biomarker, which allows monitoring their uptake and intracellular distribution until they reach the nucleus. These results are correlated with changes in cell roughness, which significantly increases at 12 hours of incubation with AuNPs, as compared to control cells. The obtained data provide bases to

understand molecular processes of the use of AuNPs in the treatment against different diseases, mainly breast cancer.

Keywords: Gold nanoparticles, AuNPs, membrane roughness, Atomic Force Microscopy, Confocal Laser Scanning Microscopy, breast cancer.

INTROUDUCTION

The application of nanotechnology in medicine has grown rapidly in recent years. The use of several types of nanoparticles against cancer has awoken great interest in the development of methodologies that improve *in vivo* images for early diagnosis, punctual drug delivery to specific sites of target cells, drug-carriers, photothermal agents, contrast agents and radiosensitizers.¹⁻³ The research of new therapeutic and early diagnosis alternatives involves the use of gold nanoparticles (AuNPs) in the effective therapy of this disease.⁴ The AuNPs have placed themselves at the forefront of breast cancer research in recent years due to their significant physical properties, such as shape, size, easy surface modification, excellent biocompatibility suitable for clinical environments and, especially, due to their unique optical properties provided by Surface Plasmon Resonance (SPR) that mainly depends on the size and shape of nanoparticles.^{5,6} The AuNPs produce maximum light scattering that can be achieved by exciting AuNPs at 543 nm wavelength and illuminating them so intensely that they become visible for high resolution optical microscopy detection systems.^{7,8} This peculiar photo-dynamic behavior of AuNPs is very much influenced by their geometry making them an excellent biomarker for early diagnosis.⁹ The success of AuNPs in the treatment and diagnosis of breast cancer depends on their appropriate interaction with cancer cells, for which reason their intercellular uptake and distribution must be better understood in order to efficiently exert their cytotoxic effect.

Previous studies have shown that cellular uptake of nanoparticles is a two-stage process. First, nanoparticles adhere onto the plasma membrane surface and are subsequently internalized by the cell through energy-dependent mechanisms. Afterwards, they are incorporated into the cells and transported towards different subcellular compartments, normally ending in lysosomal accumulation.¹⁰ The AuNP uptake has also been shown to modulate cell membrane of different, both malignant and normal, cell types as well as subsequent downward intracellular events.¹¹ Some mechanisms of action that cause this effect may be associated with ionic interaction between AuNPs and the membrane surface, a phenomenon related to the negative membrane potential of some cells interacting with AuNPs, which have different positive charge densities, as well as with the focal

dissolution of the cell membrane that forms pits and causes perturbation of its internal structure and hence modulates its surface roughness.¹²⁻¹⁴

Atomic force microscopy (AFM) represents a powerful tool for the study of AuNP interaction with surface membranes of cancer cells.^{15,16} Previous studies have shown that AFM can perform the analysis of cell membrane surfaces allowing for dynamic evaluation of AuNPs interaction and incorporation into live cells, which is not possible by Scanning electron microscopy (SEM) or Transmission electron microscopy (TEM).¹⁷ The AFM images can be represented three-dimensionally (3D) and this technique is helpful in the measurement of height variations due to the interaction of nanoparticles with the cell surface. The interaction of polymer nanoparticles with plasma membrane of the cells has been shown to generate changes in mechanical properties of cell membrane (roughness) forming pores and allowing for greater permeability of nanoparticles on the membrane.¹⁸⁻²¹ It is known that intracellular distribution of AuNPs relates the toxicity of these nanoparticles to the damage they induce at the subcellular and molecular level, because their intracellular effects cause modulation of several molecular processes involved in cell survival or death.^{22,23} In this work, we have studied the effect of uncoated (bare), spherical 20-nm-diameter AuNPs on cell viability in MCF-7 breast cancer cells and the modifications they exert on the plasma membrane through interaction with its surface and the cellular uptake. Also, intracellular incorporation and distribution of nanoparticles was monitored using Confocal Laser Scanning Microscopy (LCSM).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Human MCF-7 breast cancer cells were purchased from ATCC (Manassas, VA). Culture medium was Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) purchased from Life Technologies (Gaithersburg, MD). Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) or Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Trypan blue exclusion reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Calbiochem. The antifungal antibiotic was purchased from Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, MD). All chemicals were research grade.

Spherical colloidal gold nanoparticles (AuNP), 20 nm in diameter, were acquired from BBI International (UK) for use in research. According to previous literature, these 20 nm AuNPs, often used in studies similar to ours, have already been well characterized by different techniques: DSL, SEM and TEM in different culture media [24-30].

Cell culture

MCF7 human breast cancer cells were obtained from ATCC (Manassas, VA) and maintained at 37 °C, 5% CO₂ as monolayer cultures (50% confluence) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose and phenol red-free; Life Technologies Gaithersburg, MD) and supplemented

with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), gentamicin (50 µg/mL), 100 U penicillin/ 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). In order to synchronize cell cultures and prior to AuNP treatment, MCF-7 cells were cultured in phenol red-free DMEM containing 2.5 % FBS that was previously treated with charcoal-dextran (FBS-C). Control cells were treated with vehicle (Ultrapure milliQ water).

Cell viability assay

Viability assay by trypan blue exclusion was used to determine the percentage viability of MCF-7 cells incubated with AuNPs. Cells were seeded in 24-well plates (10,000 cells per well) for 24 h. Subsequently, they were incubated with AuNPs at different concentrations (20, 50, 80 µg/mL) to finally measure the percentage of cell viability at different incubation times (24, 48, 72 h). AuNPs incubated with cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm and the supernatant was discarded. A cell suspension was made at a suitable dilution (1×10^5 cells/mL) in PBS. Ninety µl of the cell suspension was taken and mixed with 10 µL of 4% Trypan blue. The solution was mixed thoroughly and allowed to stand for 3 min at room temperature. Subsequently, 20 µl of the mixture were transferred to a hemocytometer (Neubauer chamber) and viable cells were counted as clear cells and dead cells as blue ones. The number of live cells per ml was calculated using the following formula:

$$\text{Viable cell (\%)} = \frac{\text{Total number of viable cells per mL of te aliquot}}{\text{Total number of cells per mL of te aliquot}} \times 100$$

Cell morphology was analyzed using an inverted microscope Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss (GmbH, Jena, Germany), equipped with a Cannon PowerShot A640 camera, using the 10X lens.

Atomic Force Microscopy

AFM images and surface analysis of plasma membrane on MCF-7 cells were acquired in tapping mode AFM, NanoScope IIIa (Veeco Inc., Plainview, EE.UU), using standard clean probes of silicon nitride (Si_3N_4) with an average resonance frequency of 256 and 365 kHz and spring constant of 20-80 pN/nm. Image acquisition is constantly manually adjusted in order to maintain optimum signal and appropriate resolution. The amplitude values of the cantilever remained at approximately 1500 mV and a 1.3 V set point. The scan rate was maintained between 0.3 and 0.9 Hz, all obtained in air. Cell culture was grown on a single crystal film with Au (111) surface. It is a rectangular glass substrate (area of 1 cm²) 2 mm thick, with 200 nm chrome film, overlying the glass and 2000 nm upper layer of Au (111) film. To properly position the plate for AFM analysis, regular morphology cells (elongated) were selected by optical microscopy coupled to AFM (Nikon, Japan). The analysis was first performed on a large area (100 µm²) with a single cell, later heading the cantilever to the cell surface where images of 50, 20, 10, 5, 2.5 and 1 µm² were obtained sequentially. The same procedure was repeated on at least three different areas of the same cell and in three different cells, with three different AFM acquisition modes: height, phase and amplitude. Acquisition time for each image varied

from 20 min to 40 min. The image analysis was performed using the AFM-NanoScope III software (Veeco Inc). Scanning area for all surface roughness analyses was 5 and 1 μm^2 .

The gold plates were placed in a 24-well plate and added an aliquot of 20 μL of cellular suspension (10,000 cells) by direct dripping on the gold surface and led to a final volume of 400 μL with DMEM + FBS 5%. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, to achieve not more than 70% confluence and the medium with low (2.5%) concentration of FBS, in order to synchronize cells (decrease sequential synchronization). After reaching the optimal time for synchronization, the corresponding treatment consisted of incubating the cells with a mixture of DMEM + 5% FBS / AuNP $\mu\text{g}/\text{mL}$ at different times (0, 6, 12, 16, 24 h). Lastly, the cells were fixed in ethanol dehydration train 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 96% for 2 minutes at each concentration.

Cellular uptake and internal distribution of AuNP

Cells were cultured in 8-well-chamber slides (Lab-Tek II Chamber Slides) for 24 h and subsequently incubated with AuNPs 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2, 6, 12, 16, 24 h. Control cells, vehicle, were incubated with MilliQ ultrapure water (Vh). Cells were washed with a phosphate-buffer saline (PBS) solution. Treated MCF-7 cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS. Subsequently, all cells were incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) to contrast the nuclei and were mounted with mounting medium for fluorescence (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark). Images were obtained using a multi-photon confocal microscope (Carl Zeiss LSM-780 NLO). Fifteen slides of 16.16 μm each were used for the acquisition of Z-stacks.

Statistical Analysis

We presented data as mean \pm SD for at least three independent experiments carried out in triplicate. The GraphPad Prism Software (San Diego, CA) was used for the analysis of variance (ANOVA). Comparisons between groups were carried out using the Tukey-Kramer multiple comparison tests. Differences were considered significant when P values were less than 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of AuNPs on cell viability and MCF-7 cell morphology

In order to determine sublethal conditions of AuNPs used in incorporation studies, MCF-7 cells were incubated with different concentrations (20, 50 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of AuNPs and for different times (24, 48 or 72 h) before determining the cell viability. The obtained results show that AuNPs do not induce loss of viability when incubated for 24 h. The significant effects ($p < 0.05$ vs Vh) on MCF-7 cell viability were observed at 48 h of incubation only with the highest AuNPs concentration, i. e., at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and at 72 h with the three concentrations studied (Figure 1A).

These results were contrasted with cell morphology studies carried out using optical microscopy, which also show more obvious structural changes in cells incubated with 80 µg/mL AuNPs than during 48 and 72 h, as compared to the cells incubated with vehicle (H₂O-MilliQ). When the cells were incubated with 20 and 50 µg/mL concentrations of AuNPs, the effects on cell morphology were seen after 48 h of incubation (Figure 1B). The observed changes include reduction of cell size, formation of spheroidal structures instead of their normal elongated shape and subsequent detachment of the substrate, which is characteristic of cell death.

Our results agree with those reported previously, which show that the administration of 13 nm-diameter AuNPs at concentrations above 100 µg/mL during incubation superior to 24 h, cause unrepairable damages to both the plasma membrane architecture of human dermal fibroblasts (HDFa)³¹ and the mitochondria and nuclei of chronic myelogenous leukemia cells (K562)³². These results were reproduced on prostate³³, lung³⁴ and nasopharyngeal³⁵ cancer cells, which suggest that cell death could be mediated by processes associated with apoptosis or necrosis.

Furthermore, these results allowed us to establish the most appropriate conditions for studying 20-nm spheroidal AuNPs incorporation processes at the plasma membrane level, such as: 80 µg/mL for the AuNPs concentration and incubation times up to 24 h.

Detection of AuNPs in MCF-7 cells by AFM

In order to determine the AuNP location on the plasma membrane of MCF-7 cells and on the substrate, tapping mode-height scans were performed using an AFM-Nanoscope III (Veeco, Inc.). The MCF-7 cells were incubated with 80 µg/mL of 20-nm-diameter AuNPs at 12 h of exposure; they were fixed by dehydration process with different concentrations of ethanol to perform the topographic analysis (Figure 2). The AFM revealed features whose sizes ranged between 80 and 400 nm in diameter, which suggests the presence of AuNP aggregates (cluster) on the cell surface (Figures: 2A and 2B) rather than individual 20 nm - NPs. Indeed, the AuNP aggregates located on the surface of MCF-7 cells have the same dimensions as AuNP agglomerates observed on the surface of the gold-coated plate used for the growth of these cells (Figure 2C).

Our observations agree with those reported by other authors regarding the cell lines of mouse calvarial osteoblasts (MC3T3 E1)³⁶, pancreatic cancer PK-1, PK-45 and Panc-1³⁷ and liver cancer Hep-G2³⁸, located on the plasma membrane, obtained by TEM, SEM and LSCM.

AuNP Detection by fluorescent emission spectrum

With the aim of corroborating the presence of AuNP agglomerates observed by AFM scans, we have carried out studies using LSCM Carl Zeiss LSM-780 NLO. The determination was performed on samples of MCF-7 cells that were incubated with 80 µg/mL of bare AuNPs for 6 h. The spectral

analysis was carried out subsequently in the range from 416 to 687 nm, by LSCM. In order to eliminate background autofluorescence generated by the cells, the emission spectrum was normalized to that emitted by control cells whose nuclei were stained with the nuclear dye DAPI. The whole process can be followed in Figures: 3 (A-D).

Figure 3A shows emission spectrum images of AuNPs in MCF-7 cells, at different wavelengths, with a fluorescence signal emitted at 626 nm wavelength, seen as bright white dots (Figure 3B).

The cells incubated with vehicle emit low amount of fluorescence in the red spectrum (Figure 3C), without bright dots., Therefore, this low amount was established as basal value of the background fluorescence for all further measurements. The last inset of spectral analyses of both experiments shows the sum of all analyzed channels and final image reconstruction, where fluorescence emission results from the use of DAPI as reference in LSCM Figures: 3 (A and C).

These results indicate that the greatest incorporation of AuNPs into MCF-7 cells takes place at 6 h of incubation and their distribution in the cytoplasm is more evident than in the nucleus. The AuNP aggregates are visualized as differently-sized bright dots heterogeneously distributed in the cell (Figure 3B). The 626 nm wavelength signal was not detected in vehicle-treated cells (Figure 3D).

Our results are consistent with previous reports showing that AuNPs of different sizes (10, 15, 20, 30 and 50 nm) and shapes (nanorods, nanocages, nanostars, nanosphericals, nanoshells) are capable of emitting fluorescent signal due to their optical properties at wavelengths ranging between 458 and 683 nm, using LSCM^{9,39} and Raman spectroscopy⁴⁰⁻⁴². It is worth mentioning that most experiments reported with LSCM require AuNP fictionalization with fluorescent dyes to be detected intracellularly^{43,44}, whereas Raman spectroscopy generates low-quality images of the fluorescent signal for bare AuNPs in *in-vitro* models⁴⁵. The obtained LSCM results support AFM findings that AuNPs agglomerate on the plasma membrane of MCF-7 breast cancer cells and confirm the process of intracellular incorporation of AuNPs. In order to prove the intracellular presence of AuNPs and their penetration up to the nuclei of MCF-7 cells, "Z-stack" analysis was performed at 6 h of incubation using LSCM.

Cellular uptake and intracellular distribution of AuNPs

To determine intracellular incorporation and distribution of AuNPs, fluorescence analysis was carried out using LSCM at 626 nm, where MCF-7 cells were incubated with either vehicle (Figure 4A) or with 80 µg/mL of AuNPs (Figure 4B) for 6, 12 or 24h. In each case cell nucleus was stained with DAPI and therefore appears blue in images in Figures: .4 (A-D).

The obtained data show that after 6 h of incubation with AuNPs, their intracellular distribution is heterogeneous and also that they are not incorporated in the same proportion by all cells. However, at 12 h, AuNPs were incorporated into the cell nuclei to a greater extent. Due to overlapping of the fluorescence spectra emitted by AuNPs (red) and by DAPI (blue), the part of nuclei with incorporated

AuNPs becomes pink. This effect was proved by “Z-stack” analysis presented in the supporting material: S-1 and S-2. The video presented in S-2 is assembled from 15 slides (16 μm of thickness for each cat).

Interestingly, results obtained for 24 h of AuNPs incubation show lower fluorescence emission (red and pink color) in comparison to that obtained at 12 h (Figure 4D), which could be due to the cellular expulsion of AuNPs or cell damaging and redistribution of AuNP aggregates. It has been previously reported that after 24 h, the interaction of AuNPs with the nucleus in MCF-7⁴⁶ and lung⁴⁷ cells can generate destabilization of the nucleus wrapping, thus altering the function of this organelle and causing cell collapse and death.^{22, 48}

Effect of AuNPs on plasma membrane surface roughness of MCF-7 cells

The effect of AuNPs on membrane roughness of MCF-7 cells was determined using AFM and taking into consideration the $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$ value as a quantitative parameter. Few possible problems of this method is heterogeneous character/structure of the cell plasma membrane surface and dependence on the cell cycle phase in which the cells are in a particular moment of growth. We take both problems into consideration. First, on each cell, the AFM scanning was performed in three different zones (Figure 5A and Figure 5B, schema): N region, above the nuclei of MCF-7 cells; E region, at the border between the cell membrane and the gold substrate upon which the cell adheres; and I region, the intermediate (cytoplasmic) region between the N and E regions. In these particular regions, the analyses were performed in scan areas ranging from 20 to 0.5 μm^2 , in order to see $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$ variation with the scan size.

Secondly, the membrane surface roughness analyses were performed with MCF-7 cells synchronized by serum deprivation, which provided more homogenous results. It was achieved in each series with at least three different experiments.

The collected data indicates that $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$ roughness values differ significantly ($p < 0.05$) for each region, the highest being observed for the N region and the lowest for the B region (Figure 5C). However, the N region occupies rather small area of the cell surface, which does not allow multiple measurements.

Therefore, we decided to analyze the surface roughness on synchronized MCF-7 cells in the absence and presence of AuNPs (20 nm, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by performing scans of 5 μm^2 areas in 3 different places of the I region. Analysis was performed on at least 9 individual cells in 3 to 5 independent experiments.

Figure 5D shows the topographic analysis of AFM, in height (“tapping” or oscillating) mode, obtained at above mentioned conditions. The high-resolution AFM images of each incubation time in the absence and presence of AuNPs, are presented in 3D mode, where brighter regions correspond to higher cell areas. Note that detailed inspection of the obtained set of images for different time of

exposure to AuNPs allows following qualitatively the tendency of the cell surface roughness to change. The $RMS_{[Rq]}$ values derived from those images show that the roughness of MCF-7 cell plasma membranes increases proportionally over time of incubation up to 12 h, after which it decreases without reaching the exact initially observed values (Figure 5E).

The effects of AuNPs on the plasma membrane roughness can be easily associated with the MCF-7 cell cycle phases. At 6 h of incubation, corresponding to G1 phase, the $RMS_{[Rq]}$ values increase by 20% with respect to the initial time, without presenting significant differences between the cells incubated with AuNPs or vehicle. Between 12 and 16 h, where the S to G2 transition phase is expected, the maximum increase in $RMS_{[Rq]}$ values is observed, being 60% greater with respect to the initial time when incubated with AuNPs and 30% greater with Vh ($p < 0.05$). The effect of incubation with AuNPs on the membrane roughness is seen to decrease at 24 h, without significant differences between the vehicle and experimental groups ($p < 0.05$).

AuNPs induce pore formation in MCF-7 cell membranes

AFM images also showed numerous plasma membrane depressions with depths close to 90 nm, which were observed only on the membranes of cells incubated with AuNPs (mostly at 12 and 16 h), but not on Vh. Figures 6A and 6B show images of the Vh cell and another one treated with AuNPs for 12h, respectively. The surface of the treated cell is populated with several depressions, holes (dark color). The high resolution image with scan area of 1 μm , presented in 3D mode, reveals the circular shape and exact dimension (467.21nm diameter) of the biggest depression (pore) observed at the cell surface (Figure 6C and cross-section analysis in Figure 6D).

This suggests possible “nanopore” formation associated with various mechanisms of cell endocytosis, a phenomenon attributed to the interaction of AuNPs with the surface of plasma membranes. This phenomenon is consistent with previous reports which demonstrate that nanoparticle interaction with cell surface causes structural plasma membrane modifications^{21,49} and favors pore formation on plasma membranes for their subsequent uptake by endocytosis⁵⁰. Interestingly it is occurring after 12 h of treatments when we observed that AuNPs incorporate into cell nuclei.

CONCLUSION

In summary, our work proves that the exposure of 20-nm diameter spherical AuNPs to MCF-7 breast cancer cells generates changes in cell morphology at concentrations below 100 $\mu\text{g/mL}$ (20, 50 and 80 $\mu\text{g/mL}$) without having a lethal effect according to the results obtained in viability analyses. These data were of huge importance because they allowed us to establish correct parameters for monitoring the interaction and incorporation of AuNPs in MCF-7 cells. It was determined that out of the three concentrations employed, the 80 $\mu\text{g/mL}$ concentration was the most appropriate to perform the subsequent studies on AuNP uptake in incubation periods below 24 h.

It was clearly demonstrated that AuNPs produce changes in plasma membrane of MCF-7 cells by increasing their roughness on entering into contact with membrane surface as shown by AFM analysis, and upon being incorporated intracellularly; this phenomenon was demonstrated by fluorescent signal emitted by AuNPs used herein and was detected at 626 nm wavelength by LSCM. Surprisingly, it was determined that with the passing of time, AuNPs distribute heterogeneously in cell cytoplasm until they reach the periphery of the nucleus and finally get incorporated into it.

Lastly, it was demonstrated that there is a narrow relationship between the increase in roughness and the pore formation on the plasma membrane of cancer cells associated with the interaction and uptake of AuNPs, suggesting that this phenomenon is related to the mechanisms of endocytosis of AuNP agglomerates; however, said phenomenon needs to be further investigated since such behavior of plasma membrane of the cells can also be related to a possible process of exocytosis.

Additionally, and as importantly, it was demonstrated that using the methodology and technique developed here, such as AFM and LSCM, one could successfully trace the process of nanoparticle incorporation into the cell at the nanometric level. Since AFM and LSCM are not limited to determination of metal particles, as is the case with SEM and TEM, we believe that the methodology here presented has a great potential in studies of interactions and uptake of non-metallic NPs into cell material, and can contribute to a better understanding of the mechanism of action and the use of nanoparticles in medicine, in general.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CONACYT, through a PhD grant to Carlos Lara Cruz (233333), the CB-2006-1-61242 project to Experimental Biology Graduate Program, UAMI, MEXICO and Multidisciplinary Nanotechnology Project ICYT-DF-UAM (No.12112055). We are grateful for the technical support from the Confocal Microscopy and the Molecular Biology Laboratories of the Division of Biological and Health Sciences of the Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Carlos Lara Cruz is enrolled in the Experimental biology Graduate Program (212870) at UAM (Mexico).

REFERENCES

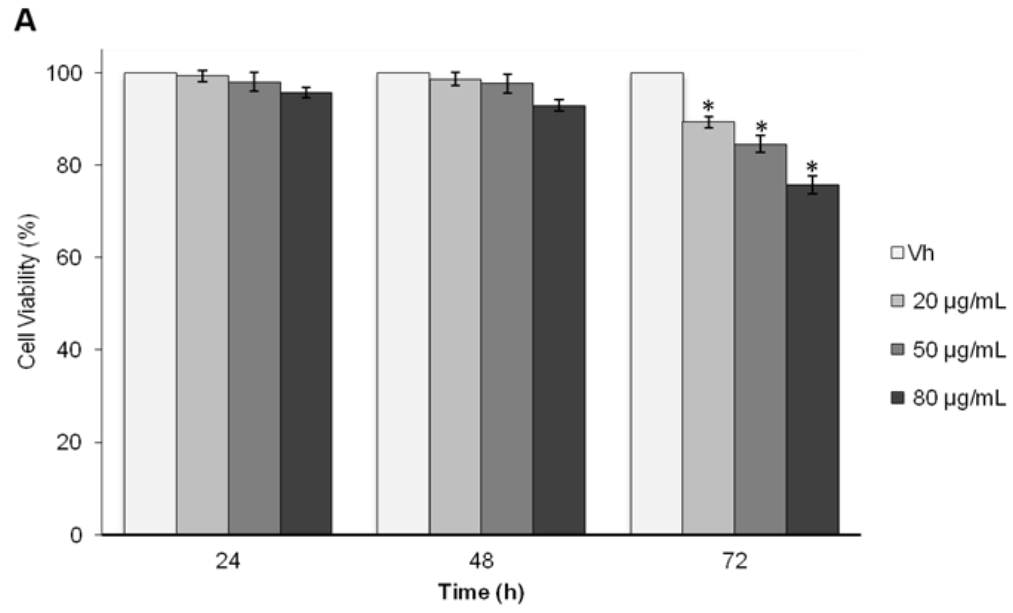
1. Wang X, Yang L, Chen Z, Shin DM. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):97-110.
2. Wang X, Wang Y, Chen Zhuo, Shin DM. Advances of cancer therapy by nanotechnology. *Cancer. Res Treat.* 2009;41(1):1-11.
3. Jing-Liang L, Min G. Gold-nanoparticle-enhanced cancer photothermal therapy. *IEEE. Journal of selected topics in quantum electronics.* 2010;16(4):989-996.
4. Jain S; Hirst DG, O'Sullivan J M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 2012;85:101-113.
5. Coulter JA, Jain S, Butterworth K T, Taggart L E, Dickson GR, McMahon SJ, Prise KM. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicina.* 2012;7(1): 2673.
6. Xing J, Zeng J, Yang J, Kong T, Xu T, Roa W, Wang X, Chen J. Gold-based nanoparticles for breast cancer diagnosis and treatment. *IEEE International Symposium on ISCAS.* 2007:2882-2885.
7. Jain PK, Eustis S, El-Sayed MA. Plasmon coupling in nanorods assemblies: optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J Phys Chem B.* 2006;110(37):18243-18253.
8. Tsai SW, Chen YY, Liaw JW. Compound cellular imaging of laser scanning confocal microscopy by using gold nanoparticles and dyes. *Sensor.* 2008;8(4):2306-2316.
9. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert A. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2014;10(1):19-34.
10. Taylor U, K Sabine, Petersen S, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry Part A.* 2010;77(5):439-446.
11. Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Aberg C. Nanoparticles adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticles uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 2013;135(4):1438-1444.
12. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal.* 2004;377(1):159-169.
13. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, Pabelick CM, Bhattachaya R, Robertson JD, Rotello VM, Prakash YS, Mukherjee P. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nanoletters.* 2010;10(7):2543-2548.
14. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 2012;7:5577-5591.
15. Müller DJ, Dufrêne YF. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends in cell biology.* 2011;21(8):461-469.
16. Tapia M, Batina N, Maldonado E, Tanori J, Ramón E. Nanoscopic characterization of membrane surface HeLa cancer cells in the presence of the gold nanoparticles. *Revista Mexicana de Física.* 2009;55(1):64-67.

17. Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nature Chemical Biology*. 2009;5(6):383-390.
18. Ding B, Tian Y, Pan Y, Shan Y, Cai M, Xu H, Sun Y, Wang H. Recording the dynamic endocytosis of single gold nanoparticles by AFM-based force tracing. *Nanoscale*. 2015;7(17):7545-7549.
19. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu B, Bhonde AR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*. 2005;21(23):10644-10654.
20. Vasir JK, Labhasetwar V. Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials*. 2008;29(31):4244-4252.
21. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR, Banaszak MM. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayer and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjugated Chemistry*. 2004;15(4):774-782.
22. Kodiha M, Hutter E, Boridy S, Juhas M, Maysinger D, Stochaj U. Gold nanoparticles induce nuclear damage in breast cancer cells, which is further amplified by hyperthermia. *Cell. Mol. Life Sci*. 2014;71(21):4259-4273.
23. Soenen S, Manshian B, Montenegro JM, Amin F, Meermann B, Thiron, Cornelissen M, Vanhaecke F, Doak S, Parak WP, De Smedt D, Braeckmans K. Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles: A Multiparametric Study. *Acs Nano*. (2012);6(7):5767-5783.
24. Casal E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ and Puntjes V. Time Evolution of the Nanoparticles Protein Corona. *Acs Nano*. 2010;4(7):3623-3632.
25. Rhieu, Steve Y., and Vytas Reipa. Tuning the Size of Gold Nanoparticles with Repetitive Oxidation-reduction Cycles." *American Journal of Nanomaterials*. 2015;3(1):15-21.
26. Trono JD, Mizuno K, Yusa N, Matsukawa T, Yokoyama K and Uesaka M.. Size, Concentration And Incubation Time Dependence Of Gold Nanoparticle Uptake Into Pancreas Cancer Cells And Its Future Application To X-Ray Drug Delivery System. *Journal of Radiation Research*, 2011;52(1);103-109.
27. Brun E and Sicard – Roselli C. *Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction?*. *Cancer Nanotechnology*, 2014, 5:7.
28. Murthy AK, Stover RJ, Hardin WG, Schramm R, Nie GD, Gourisankar S, Truskett MT, Sokolov KV and Johnston KP. *Charged gold nanoparticles with essentially zero serum protein adsorption in undiluted fetal bovine serum*. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(21);7799-7802
29. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK and Frazer S. Probing BSA Binding to the Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir*. 2005;21;9303-9307.
30. Sabuncu AC, Grubbs J., Qian S, Abdel-Fattah TM, Stacey MW and Beskok A. Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2012;95;96-102.
31. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblast. *Small*. 2006;2(6):766–773.
32. Huang YC, Yang YC, Yang KC, Shieh HR, Wang TY, Hwu Y, Chen YJ. Pegylated gold nanoparticles induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells. *BioMed Research International*. 2014(2014).

33. Malugina A, Ghandeharia H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *J. Appl. Toxicol.* 2009;30(3):212–217.
34. Liu M, Gu X, Zhang K, Ding Y. Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione. *J Nanopart Res.* 2013;15(8):1745-1748.
35. Lan MY, Hsu YB, Hsu CH, Ho CY, Lin JC, Lee SW. Induction of apoptosis by high dose gold nanoparticles in nasopharyngeal carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx.* 2013;40(6):563-568.
36. Mustafa T, Watanabe F, Monroe W, Mahmood M, Xu Y, Saeed LM, Karmakar A, Casciano D, Ali S, Biris AS. Impact of gold nanoparticle concentration on their cellular uptake by MC3t3-e1 mouse osteoblastic cells as analyzed by transmission electron microscopy. *J Nanomedic Nanotechnol.* 2011;2(6):1000118.
37. Trono J, Mizuno K, Yusa N, Matsukawa T, Uesaka M. Cellular uptake of gold nanoparticles into normal and cancer cells. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany. Springer Berlin Heidelberg.* 2009. p. 202-205.
38. Panariti A, Miserocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications.* 2012;5:87–100.
39. Rago G, Bauer B, Svedberg F, Gunnarsson Linda, Ericson MB, Bonn M, Enejder A. Uptake of gold nanoparticles in healthy and tumor cells visualized by nonlinear optical microscopy. *J. Phys. Chem. B.* 2011;115(17):5008–5016.
40. Shah NB, Dong J, Bischof JC. Cellular uptake and nanoscale localization of gold nanoparticles in cancer using label-free confocal Raman microscopy. *Molecular Pharmaceutics.* 2010;8(1):176-184.
41. Zhen W. Plasmon-resonance gold nanoparticles for cancer optical imaging. *Sci China-Phys Mech Astron.* 2013;56(3):506-513.
42. Huefner A, Setiadi D, Wilts BD, Patel II, Kuan WL, Fragniere A, Baker RA, Mahajan S. Gold nanoparticles explore cells: Cellular uptake and their use as intracellular probes. *Methods.* 2014;68(2):354–363.
43. Gonciar A. Detection of intracellular gold nanoparticles. *Biotechnology, Molecular Biology and Nanomedicine.* 2014;2(1):21-25.
44. Klein S Petersen S, Taylor U, Rath D, Barcikowski S. Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *Journal of Biomedical Optics.* 2010;15(3): 036015-036015-11.
45. García CP, Sumbayev V, Gilliland D, Yasinska IM, Gibbs BF, Mehn D, Rossi F. Microscopic analysis of the interaction of gold nanoparticles with cells of the innate immune system. *Scientific Reports.* 2013;3:1326.
46. Selim ME, Hendi AA. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(4):1617-1620.
47. Liu Z, Wu Y, Guo Z, Liu Y, Shen Y, Zhou P, Lu X. Effects of internalized gold nanoparticles with respect to cytotoxicity and invasion activity in lung cancer cells. *PLoS ONE.* 2014;9(6): e99175.
48. Kodiha M, Wang YM, Hutter E, Maysinger D, Stochja U. Off to the organelles-Killing cancer cells with targeted gold nanoparticles. *Theranostic.* 2015;5(4):357-370.

49. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small*. 2009;6(1):12-21.
50. Tong L, Zhao Y, Huff TB, Hansen MN, Wei A, Cheng JX. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Adv. Mater.* 2007;19(20):3136–3141.

FIGURES



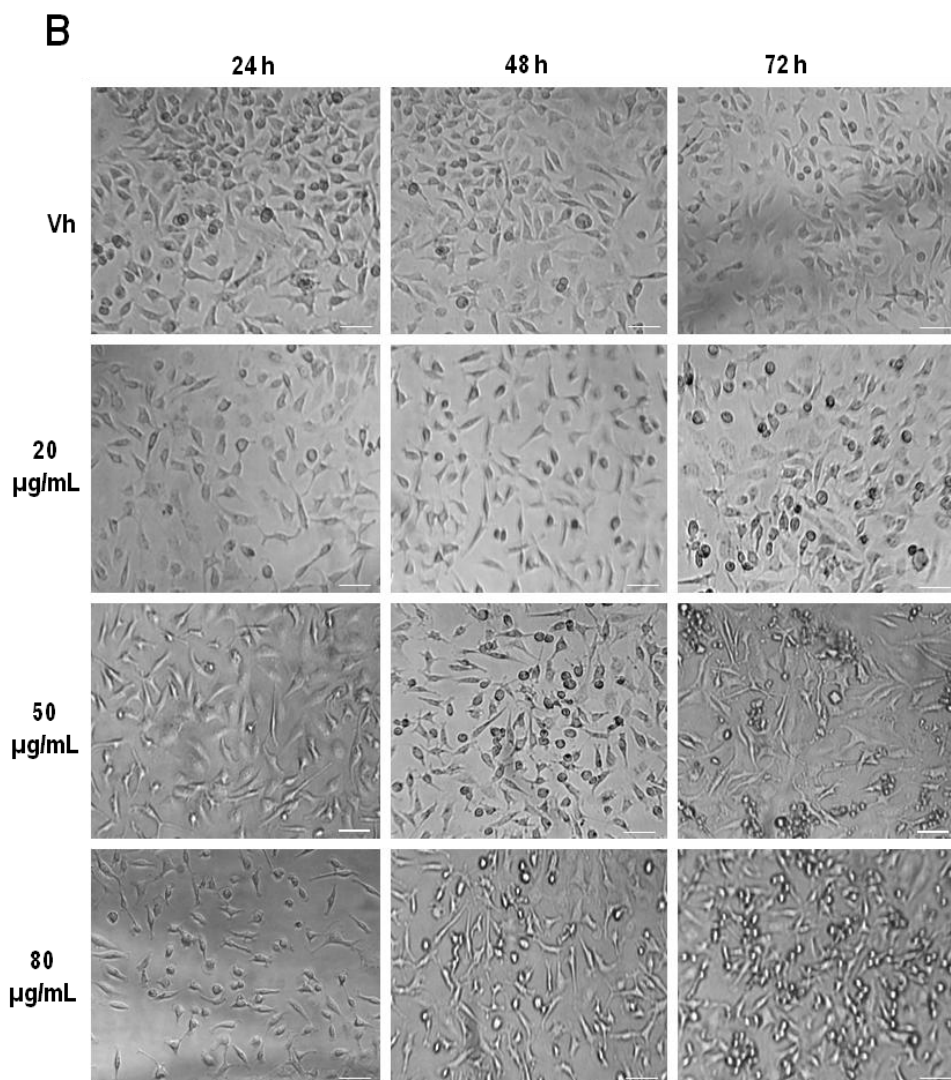


FIGURE 1. Sublethal effects of gold nanoparticles (AuNP) on MCF-7 cell viability.

Notes: A) Human breast cancer cells (MCF-7) were incubated with different concentrations of AuNPs (20, 50, 80 µg/mL) during 24, 48 or 72 hours and cell viability was measured by the trypan blue exclusion assay. Exposure to AuNPs exhibited a dose-and time-dependent effect as compared to control Vh cells. All error bars represent standard deviation from at least n=5 measurements; asterisks indicate statistical significance ($p < 0.05$). B) Sublethal effects of AuNP (80 µg/mL) were obtained at 24 hours of incubation, as observed by cell morphology (40X magnification).

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle.

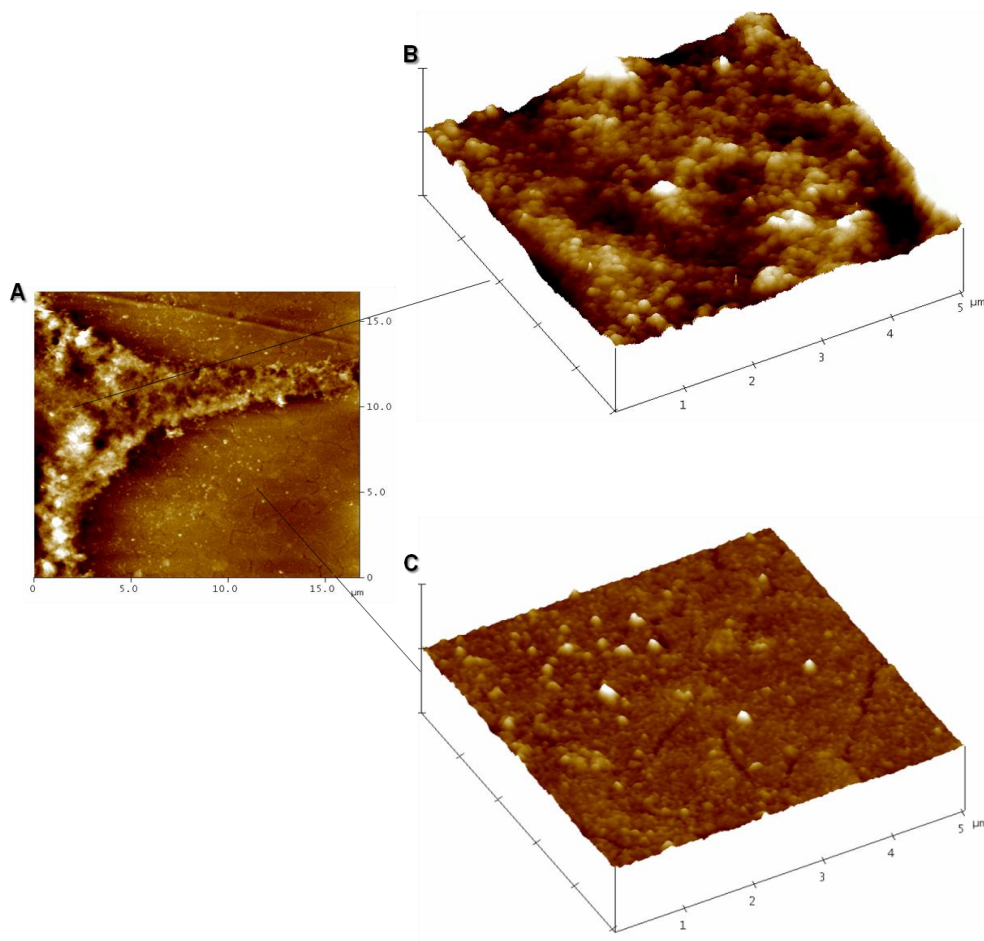
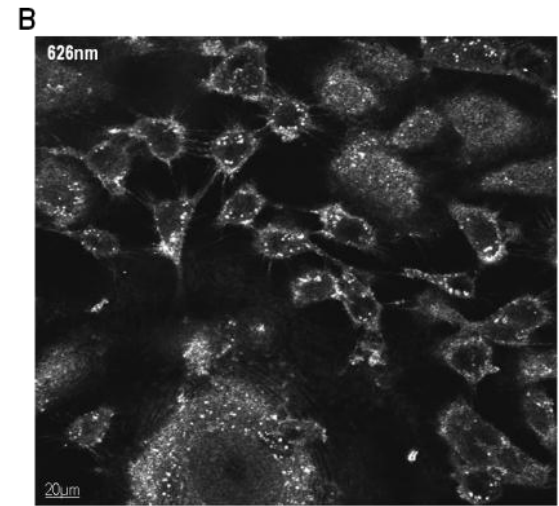
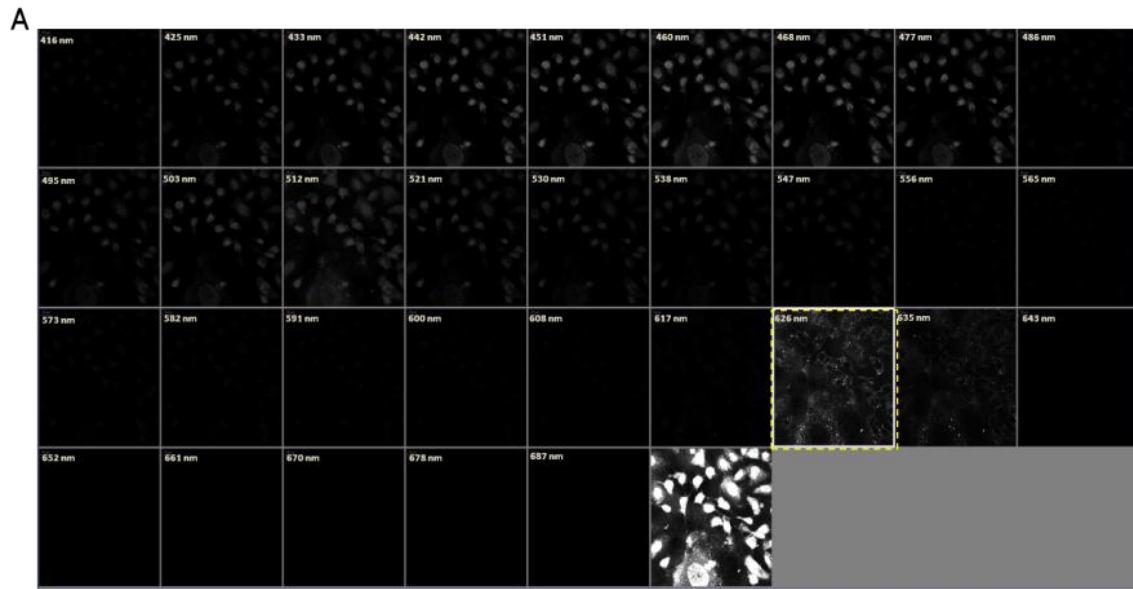


FIGURE 2. Detection of AuNPs on MCF-7 cells by AFM.

Notes: The AFM image shows the surface of MCF-7 cell membrane on the gold substrate (A). The AFM analysis revealed features (white spots) in the sizes ranging between 80 and 400 nm in diameter, which suggests the presence of AuNP aggregates (cluster) on the cell surface (Figure 2A and 2B). AuNP aggregates located on the surface of MCF-7 cells have the same dimensions as AuNP agglomerates observed on the surface of gold-coated plates used for the growth of these cells (Figure 2C). The high resolution AFM image revealed that the gold substrate consisted of differently shaped gold micro-grains as well as of numerous NPs (white spots).

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle; AFM, Atomic Force Microscopy.



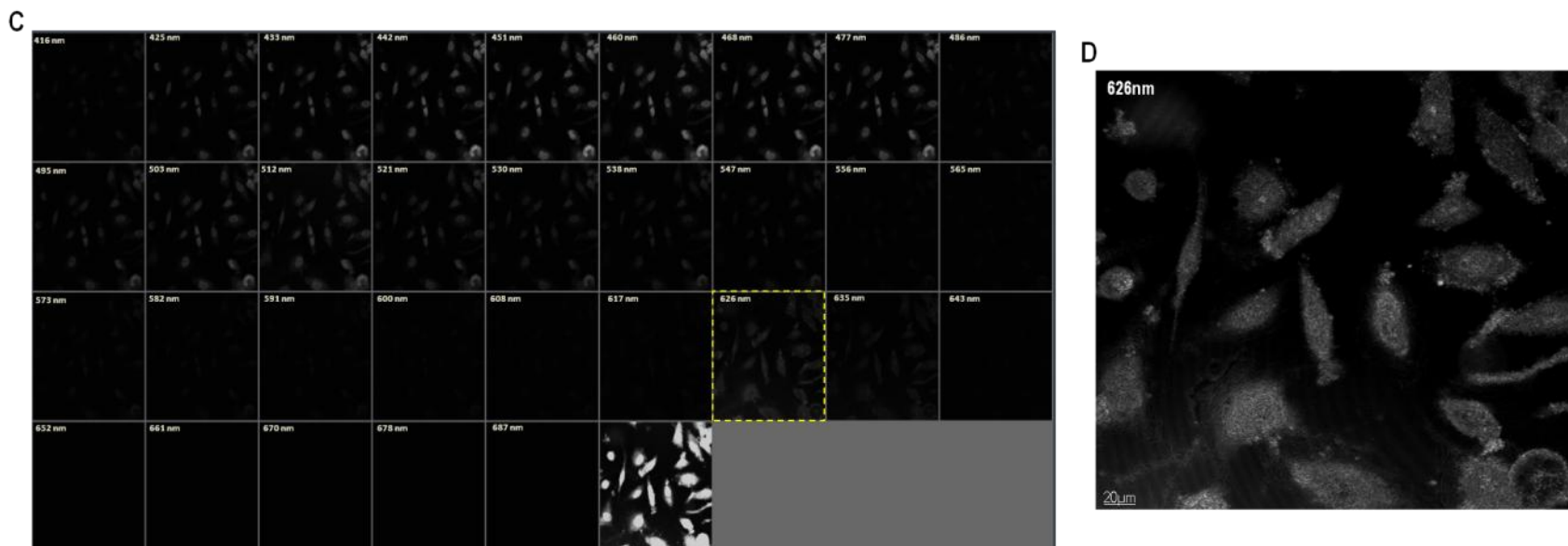


FIGURE 3. Detection of AuNPs in MCF-7 cells by fluorescence emission.

Notes: (A) The emission spectrum analysis detects the presence of AuNPs (white dots), (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ during 6 hours of incubation) around and inside MCF-7 cells at 626 nm wavelength. It is especially visible in Fig.3.B at higher magnification. As compared to the analysis performed on cells incubated with vehicle (C and D), the absence of NPs in the control sample (Vh) is obvious. The scan was performed using LSCM from 416 nm to 687 nm wavelength. The nuclei were stained with DAPI (maximum emission 461 nm). All images have same dimensions, but presented with different magnification.

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle; AFM, Atomic Force Microscopy; LSCM, Laser Scanning Confocal Microscopy.

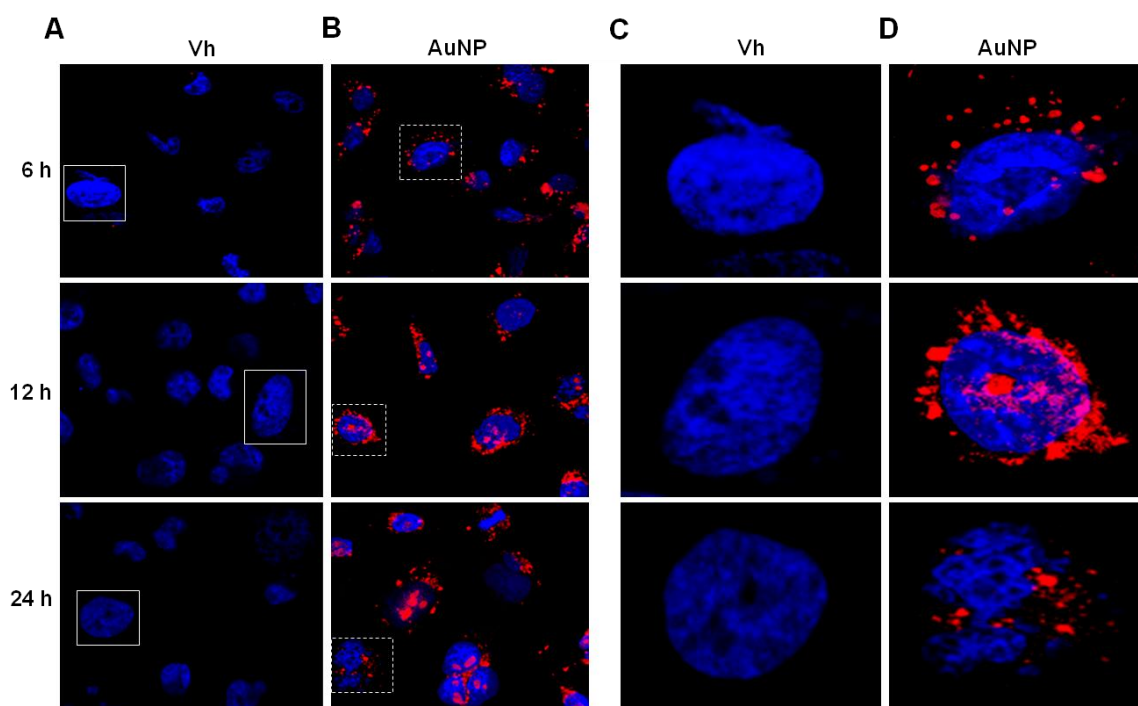


FIGURE 4. Cellular uptake and intracellular spatial distribution of AuNPs.

Notes: The AuNP aggregates were detected inside MCF-7 cells when these were incubated at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations for 6, 12 and 24 h using LSCM, at 626 nm wavelength (red) while the nucleus was stained with DAPI (blue). Figs. A and B have 40X magnification; and C and D have 63X magnification. The maximum uptake of AuNPs in the nucleus (maximum red spots close to nuclei) was observed at 12 h of incubation. When AuNPs entered cell nuclei, they became pink (Fig.4D, 12 h). (Also see Z-stack analysis in supplementary video material,S-1, and NPs/nuclei interaction in supplementary material,S-2).

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle; AFM, Atomic Force Microscopy; LSCM, Laser Scanning Confocal Microscopy; DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole.

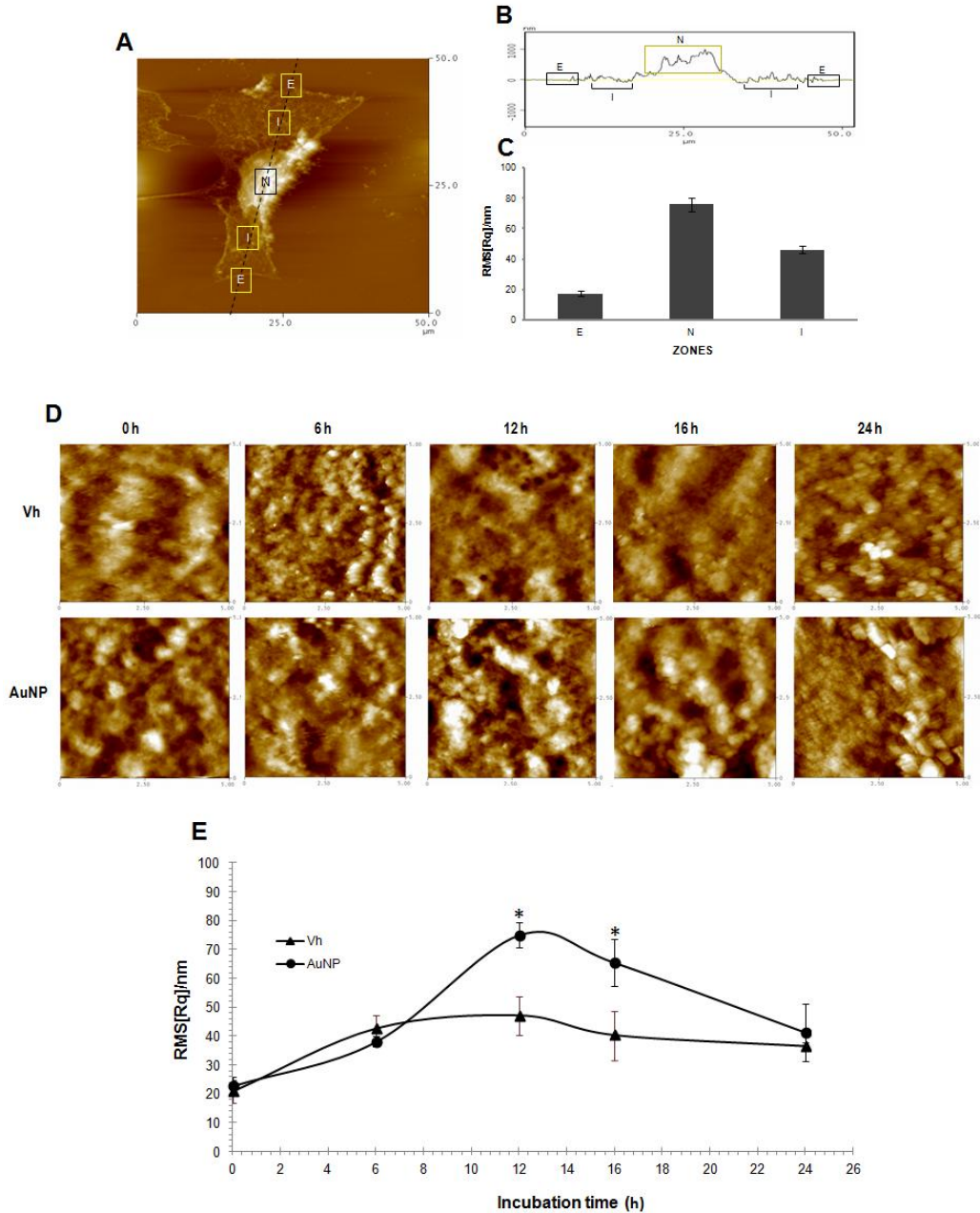


FIGURE 5. Effect of AuNPs on surface roughness of MCF-7 plasma membrane.

Note: Topographic analysis of plasma membrane roughness of MCF-7 cells, analyzed by AFM, in three different regions: (E) edge, (N) nucleus, (I) intermediate. A) Scale Micrograph 50 X 50 μm ($z=0-2,000$ nm) of the complete cell. B) Schema of the sampling points. C) The surface roughness $\text{RMS}_{[Rq]}$ values for each region presented in B. D) Changes in plasma membrane roughness as a function of incubation time (0, 6, 12, 16 and 24 h) with 80 $\mu\text{g/mL}$ AuNP and Vh, observed in the series of high-resolution AFM images, where brighter regions correspond to higher cell areas. E) Plot of changes in plasma membrane roughness of cells as a function of incubation time with AuNPs or Vh. All

experiments were carried out in 3 different regions of a cell and in 9 different cells per treatment. The height was calculated from $RMS_{[Rq]}$ values. Data are presented as mean and standard deviation of three independent experiments. * $P \leq 0.05$ vs Vh. The $z=0-619.2$ nm for all images.

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle; AFM, Atomic Force Microscopy; N, nucleus; B, edge; I, intermediate; $RMS_{[Rq]}$, Measuring Surface Roughness [root mean square].

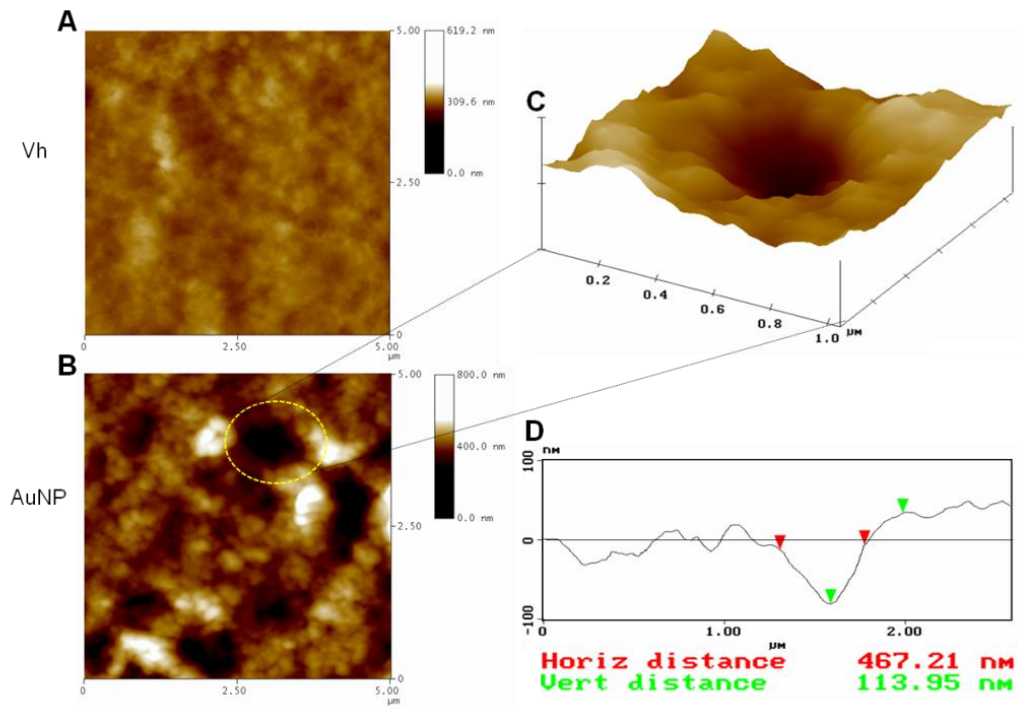


FIGURE 6. The AuNPs induce pore formation in MCF-7 cell membranes.

Note: A) The smooth surface of the Vh control cell (12h) revealed by AFM. B) The AuNPs (80 $\mu\text{g/mL}$; 12h) induce greater roughness on MCF-7 cell membranes in comparison to those treated with Vh. C) Pore formation was observed on the membrane surfaces of cells incubated with AuNPs. D) The dimensions of these pores were obtained by topographic analysis of 1 x 1 μm scan area ($z=0-100$ nm).

Abbreviations: AuNPs, gold nanoparticles; Vh, vehicle; AFM, Atomic Force Microscopy; N, nucleus; B, edge; I, intermediate; $RMS_{[Rq]}$, root mean square.