

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe Yessenia Martínez Ortiz, alumna del posgrado en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: ***“Efecto de los andrógenos sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de cáncer de mama triple-negativas”***.

Declaro que:

1. La idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, ¡sin otorgamiento del crédito autorál! y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de esta, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la ciudad de México el 11 de noviembre de 2022.

Atentamente



Yessenia Martínez Ortiz



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD MAESTRÍA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

*“Efecto de los andrógenos sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana
plasmática de células de cáncer de mama triple-
negativas”*

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

BIOL. EXP. YESSENIA MARTÍNEZ ORTIZ

MATRÍCULA: 2202800639

CODIRECTORES

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dr. Nikola Batina Skeledzija

ASESORA

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA

Dra. María del Rosario Tarrago Castellanos

SECRETARIA

**Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez
Gómez**

VOCAL 1

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar

VOCAL 2

Dra. Marcela Arteaga Silva

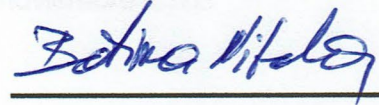
Ciudad de México, 11 de noviembre de 2022

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR

Dr. Nikola Batina Skeledzija

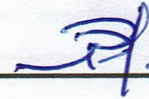
Departamento de Química
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
bani@xanum.uam.mx



CODIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

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. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Laboratorio 6 de Epigenética y Cáncer
Subdirección de Investigación Clínica
Instituto Nacional de Cancerología (INCan)
dguadalupeisabel@yahoo.com.mx



MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto de los andrógenos sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de cáncer de mama triple-negativas" el día 11 de noviembre 2022.

PRESIDENTA

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos
Departamento de Biología de la Reproducción



SECRETARIA

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez
Subdirección de Investigación Clínica
Instituto Nacional de Cancerología (INCan)



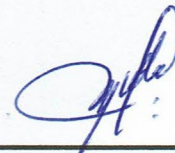
VOCAL

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar
Escuela Militar de Graduados en Sanidad
Secretaría de la Defensa Nacional (SEDENA)



VOCAL

Dra. Marcela Arteaga Silva
Departamento de Biología de la Reproducción



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería y en el Laboratorio de Endocrinología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la codirección del Dr. Nikola Batina Skeledzija y el Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa está evaluada como Consolidado en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (003797).

La alumna Yessenia Martínez Ortiz fue apoyada con la beca otorgada por parte de CONACyT con CVU: 1080576.

Parte de este trabajo fue realizado en el Laboratorio 6 de Epigenética y Cáncer perteneciente a la Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado especialmente y con mucho amor a mi madre María Guadalupe Ortiz Ramírez, a quien le debo ser la persona que ahora soy, por no dejarme sola en ningún momento, por ser mi apoyo y la persona que día a día me motiva e inspira a seguir adelante, ERES MI MAYOR EJEMPLO A SEGUIR, ERES MI HEROÍNA, siempre te daré gracias por todo el amor que me das, eres la mejor mamá que me pudo haber tocado, has sido siempre mi inspiración y ejemplo a seguir, por tu tenacidad, fortaleza y gran humildad, TE AMO CON TODO MI CORAZÓN Y MI SER.

A mi abuelito Juan Ortiz Hernández siempre serás el hombre que más he amado, quien me enseñó a luchar, a ser agradecida y a dejar el corazón en todo lo que me apasiona, donde quiera que estés sé que me cuidas y que estas orgullosa de mí, en todo momento te llevo en mi corazón y en mis pensamientos, TE AMO mi viejito.

A mi abuelita María Elena Castro y a su esposo Amado Placencia porque desde niña me han apoyado y confiado en mí, por formar parte de mi educación, han sido unos excelentes maestros, gracias por darme a las mejores madrinas que pude tener, sus hijas María Eugenia Placencia Castro y Mitzi Placencia Castro, que sin duda son unas increíbles mujeres y madres, que en todo momento me han enseñaron a seguir mis sueños y a luchar por lograrlos, MUCHAS GRACIAS a los cuatro.

A mis tíos Luis Ernesto Martínez Palafox y Matilde Juárez Romero por ser parte de mi vida desde el primer día, gracias por el GRAN AMOR, apoyo, por estar conmigo en mis mejores y peores momento, y sobre todo por estar orgullosos de mí. Tío gracias por ser uno de mis mayores apoyos, TE AMO, te admiro mucho por ser la persona que eres y especialmente por ese inmenso amor que me das desde que nací.

A mi segundo padre José Melecio Gómez Ríos gracias por la plática en aquella tarde que me llevaron a decirme por estudiar lo que tanto amo, gracias por cada una de sus palabras y por todo el apoyo que me da donde quiera que este.

A la Médico Marta Viridiana Rivera Vega, eres una increíble personita, te quiero 3 millones más hermosa, gracias por apoyarme siempre y por creer tanto en mí, te admiro tanto, gracias por ayudarme a crecer y a creer en mí.

A mis familiares y amigos por su ayuda, apoyo y cariño, por creer en mí y por formar parte de una de las mejores etapas de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a:

La Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por la oportunidad que me brindo para crecer profesionalmente, como persona y en conocimiento sobre las enfermedades neoplásicas, mismos que me permitieron obtener el grado de Maestra.

Al Dr. Nikola Batina Skeledzija, por su confianza, por la paciencia en enseñarme sus conocimientos teóricos y prácticos del AFM, y apoyo.

A una maravillosa persona y excelente profesor el Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura por su gran apoyo, paciencia, constancia y sobre todo por su amistad durante estos casi cinco años (deseo que sean muchos más). Por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica desde la Licenciatura en un marco de confianza fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez, por su confianza, paciencia, apoyo y sobre todo por aquellas palabras que siempre le agradeceré. Por su generosidad al donar las células con las cuales se pudieron realizar los experimentos del presente trabajo.

A una increíble persona el Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar, gracias por toda la ayuda y el apoyo que me ha brindado desde el día en que lo conocí, lo admiro por todo lo que ha logrado y sobre todo por ser como es, sin duda alguna es uno de mis ejemplos a seguir, de grande quiero ser como usted.

A la M. en C. Paulina Hernández Garcés por su invaluable apoyo, por saber ser una guía y por su gran compromiso.

A la Dra. Elizabeth Langley McCarron por su generosidad al proporcionar la DHT con la cual se pudieron realizar los experimentos del presente trabajo.

Al Dr. Alexandro Téllez Plancarte por su generosidad al permitirme hacer uso de sus imágenes, como punto de partida del presente trabajo.

Contenido

Introducción.....	18
Epidemiología del cáncer de mama (CaM).....	18
Clasificación del cáncer de mama.....	18
Subtipos moleculares de cáncer de mama triple negativo (CMTN)	19
Andrógenos.....	20
Estructura y función de los andrógenos	20
Papel del receptor de andrógenos (AR) en el CMTN	23
Vía de señalización genómica de los andrógenos en el CaM	24
Vías de señalización no genómica de los andrógenos en el CaM	25
Membrana plasmática	27
Características de las membranas plasmáticas de células cancerosas.....	27
Técnicas para el análisis de las propiedades de las membranas celulares.....	30
Fundamento de la Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	31
Rugosidad de membrana	33
Análisis de la rugosidad de membrana mediante AFM	33
Concepto de altura y rugosidad de membrana, a nivel nanométrico	33
Altura.....	34
Rugosidad.....	36
Factores de rugosidad	38
Procesamiento de imágenes celulares	40
Imagen aplanada	41
Nivelación de la imagen	41
Detección de bordes.....	43
Antecedentes.....	44
Propiedades de las membranas plasmáticas (rugosidad) de células cancerosas y no cancerosas... 44	
Factores que afectan la rugosidad de membrana plasmática en células de CaM..... 46	
Efecto de las hormonas esteroides sobre la rugosidad de la membrana..... 47	
Efecto del estradiol (E ₂) sobre la rugosidad de la membrana plasmática en la línea celular MCF-7 48	
Efecto de los andrógenos en células diferentes a CaM (CMTN); cáncer de próstata (CaP)	50
Justificación	54
Planteamiento del problema	55
Pregunta de investigación.....	55
Hipótesis.....	55
Objetivo general	55

Objetivos particulares	56
Diseño experimental	56
Material y Métodos	57
Cultivo celular	57
Ensayo de cierre de la herida (Wound healing assay)	57
Obtención y análisis de imágenes previamente obtenidas	59
Análisis de la rugosidad mediante AFM	60
Análisis estadístico	60
Características de las líneas celulares estudiadas.....	60
Resultados.....	61
Estandarización del análisis de la rugosidad de membrana.....	61
Determinación mediante AFM para calcular la altura.....	68
Análisis de la altura por AFM de las 4 líneas celulares de CaM.....	70
Determinación de la rugosidad de las membranas de las 4 líneas celulares de CaM	70
Efecto de DHT sobre la rugosidad de las membranas de células MDA-MB-231	74
Análisis de la altura por AFM en células MDA-MB-231 tratadas con el Vh o DHT 1 nM	78
Análisis de la rugosidad por AFM en células MDA-MB-231 tratadas con Vh, DHT 1 nM.....	78
Efecto de DHT sobre la migración de la línea celular MDA-MB-231	81
Discusión	82
Conclusiones.....	88
Perspectivas.....	89
Bibliografía.....	90

ABREVIATURAS.

17 β -HSD: 17beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

3 β -HSD: 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFM: Microscopía de fuerza atómica

AKT: Proteína cinasa en serina/treonina

AR: Receptor de andrógenos (por sus siglas en idioma inglés)

ARE: Elementos de respuesta de andrógenos (por sus siglas en idioma inglés)

ARN pol II: ARN polimerasa II

AuNP: Nanopartículas de oro (por sus siglas en idioma inglés)

B-RAF: Protooncogén de cinasas serina/treonina

BRCA1: Cáncer de mama de inicio temprano 1 (por sus siglas en idioma inglés)

Ca_i²⁺: Calcio intracelular

CaM: Cáncer de mama

CaP: Cáncer de próstata

Cav-1: Caveolina-1

CCD: Dispositivo de carga acoplada (por sus siglas en idioma inglés)

CD24: Antígeno codificado por el gen *CD24*

CD44: Antígeno codificado por el gen *CD44* en el cromosoma 11

Chol: Colesterol

Cl⁻: Ion cloro

CMTN: Cáncer de mama triple negativo, por sus siglas en idioma inglés de *Triple Negative Brest Cancer*

CoA: Coactivadores

C-RAF: Protooncogén de cinasas serina/treonina

CRPCa: Tumor resistente a la castración (por sus siglas en idioma inglés)

DBD: Dominio de unión al ADN (por sus siglas en idioma inglés)

DE: Desviación estándar

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHEA-S: Sulfato de dehidroepiandrosterona

DHT: Dihidrotestosterona

DMEM: Medio de cultivo propuesto por Eagle y modificado por Dubelcco (por sus siglas en idioma inglés)

E₂: Estradiol

ECM: Matriz Extracelular (por sus siglas en idioma inglés)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo I, también HER1

EMT: Transición epitelio mesénquima (por sus siglas en idioma inglés)

ER: Receptor de estrógenos (por sus siglas en idioma inglés)

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares (por sus siglas en idioma inglés)

FBS: Suero de bovino fetal (por sus siglas en idioma inglés)

FBS-C: Suero de bovino fetal tratado con carbón activado y dextran T-70 (por sus siglas en idioma inglés)

GPCR: Receptores acoplados a proteína G (por sus siglas en idioma inglés)

GTF: Factores de transcripción generales (por sus siglas en idioma inglés)

HAT: Enzimas histona acetiltransferasas (por sus siglas en idioma inglés)

HER-2: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (por sus siglas en idioma inglés)

HSP: Proteínas de choque térmico (por sus siglas en idioma inglés)

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (por sus siglas en idioma inglés)

IHC: Inmunohistoquímica (por sus siglas en idioma inglés)

IM: Inmunomodulador

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

K⁺: Ion potasio

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos (por sus siglas en idioma inglés)

LAR: Receptor de Andrógenos Luminal (por sus siglas en idioma inglés)

LBD: Dominio de unión al ligando (por sus siglas en idioma inglés)

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos (por sus siglas en idioma inglés)

MCF-10A: Línea celular de epitelio de mama humana no cancerosas

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama humano, subtipo Luminal A

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama humano, triple negativo

MDA-MB-453: Línea celular de cáncer de mama humano, negativo al ER

MEK 1/2: Proteína cinasa activada por mitógeno 1/2 (por sus siglas en idioma inglés)

mTOR: Blanco de la rapamicina en mamíferos (por sus siglas en idioma inglés)

Na⁺: Ion sodio

NIWOP: Perfilometría óptica de campo amplio no interferométrico (por sus siglas en idioma inglés)

NR: Receptores nucleares (por sus siglas en idioma inglés)

NTD: Dominio de regulación transcripcional N-terminal (por sus siglas en idioma inglés)

p21: Proteína de 21 KDa

P₄: Progesterona

PARP1: Poli(ADP-ribosa)-polimerasa 1

PC: Fosfatidil colina (por sus siglas en idioma inglés)

PE: Fosfatidil etanolamina (por sus siglas en idioma inglés)

pHe: pH extracelular

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa (por sus siglas en idioma inglés)

PI3KCA: Isoforma alfa de la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa

PKC: Proteína cinasa C (por sus siglas en idioma inglés)

PR: Receptor de progesterona (por sus siglas en idioma inglés)

PS: Fosfatidil serina (por sus siglas en idioma inglés)

PSA: Antígeno prostático específico (por sus siglas en idioma inglés)

Px² : Número de pixeles al cuadrado

Ra: Rugosidad media aritmética

Raf: Proteína cinasa

Ras: Proteína G oncogénica

RBA: Afinidad relativa de unión (por sus siglas en idioma inglés)

Rmax: Rugosidad máxima

RMS_[Rq]: Rugosidad media de la raíz cuadrada

Rp: Altura máxima del pico del perfil

Rq: Rugosidad cuadrática media

R_T: Altura máxima del perfil

RTK: Receptor con actividad de tirosina cinasa (por sus siglas en idioma inglés)

Rv: Profundidad máxima del valle del perfil

Rz: Rugosidad media

SEM: Microscopio electrónico de barrido (por sus siglas en idioma inglés)

SHBG: Globulina transportadora de hormonas sexuales (por sus siglas en idioma inglés)

SKBR3: Línea celular de cáncer de mama humano, positivo a HER-2

SM: Esfingomielina (por sus siglas en idioma inglés)

SMAR1: Proteína de unión a la región asociada a andamio/matriz 1 (por sus siglas en idioma inglés)

Src: Proteína cinasa de tirosinas (forma corta de sarcoma) (por sus siglas en idioma inglés)

T: Testosterona

T47D: Línea celular de cáncer de mama humano, del subtipo Luminal A

TBP: Proteína de unión a la caja TATA (por sus siglas en idioma inglés)

TF: Factores de transcripción (por sus siglas en idioma inglés)

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS.

Figura 1.

Clasificación molecular del cáncer de mama.

Figura 2.

Representación gráfica de la estructura de la testosterona (4-androsten-17 β -ol-3-ona) y la dihidrotestosterona (5 α -androstan-17 β -ol-3-ona).

Figura 3.

Proteína del AR.

Figura 4.

Vía de señalización genómica de los andrógenos.

Figura 5.

Vía de señalización no genómica de los andrógenos.

Figura 6.

Representación esquemática de las alteraciones en la composición de las membranas de células cancerosas y no cancerosa y la capacidad para captar fármacos.

Figura 7.

Modificaciones en la rugosidad de la superficie de la célula.

Figura 8.

Ilustración de la altura máxima del perfil (R_T), Profundidad máxima del valle del perfil (R_v) y la altura máxima del pico del perfil (R_p) para el perfil de una superficie.

Figura 9.

Imagen representativa de la altura media aritmética para el perfil de una superficie.

Figura 10.

Representación esquemática del análisis de la rugosidad superficial por AFM.

Figura 11.

Secciones de tejido mamario normal y tejido canceroso.

Figura 12.

Cambios observados en la morfología a nanoescala.

Figura 13.

Rugosidad de la superficie de las células MCF-7.

Figura 14.

Imágenes de AFM en modo de contacto.

Figura 15.

A) Imagen de una célula MCF-7 obtenida mediante AFM y B) representación esquemática del análisis mediante AFM en modo *"tapping"* y oscilante.

Figura 16.

Ensayos de cierre de la herida.

Figura 17.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 18.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 19.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 20.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 21.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 22.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 23.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 24.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

Figura 25.

Análisis topográfico y por AFM de un área de escaneo de 40 x 40 μm de una célula T47D (A, B), MCF-7 (C, D), SKBR3 (E, F), MDA-MB-231 (G, H) adheridas sobre un sustrato Au(111).

Figura 26.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo testigo (vehículo).

Morfología bidimensional (C) y tridimensional (D) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo experimental (1 nM de DHT).

Figura 27.

Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo testigo (vehículo).

Morfología bidimensional (C) y tridimensional (D) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo experimental (1 nM de DHT).

Figura 28.

Efecto de la dihidrotestosterona (DHT; 1 nM o 100 nM) sobre la migración de células MDA-MB-231.

Gráfica 1.

Análisis de la altura por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111).

Gráfica 2.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor R_a) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111).

Gráfica 3.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor R_{max}) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111).

Gráfica 4.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor $RMS_{[Rq]}$) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111).

Gráfica 5.

Análisis de la altura por AFM a lo largo del citoplasma en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o DHT 1nM, cuya área de escaneo es de 0.7 μm^2 y 1 μm^2 , respectivamente.

Gráfica 6.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor R_a) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Gráfica 7.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor R_{max}) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Gráfica 8.

Análisis de la rugosidad (mediante el factor $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Gráfica 9.

Efecto de DHT; 1 nM o 100 nM sobre la migración de células MDA-MB-231 (área cubierta en porcentaje).

Tabla 1.

Características relevantes de las cuatro líneas celulares de CaM analizadas en el presente proyecto.

Tabla 2.

Mediciones de la rugosidad superficial por AFM a lo largo del citoplasma de células de carcinoma de mama.

Tabla 3.

Rugosidad vs características de las líneas celulares.

Tabla 4.

Valores de la rugosidad superficial por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT.

Introducción

Epidemiología del cáncer de mama (CaM)

A nivel mundial, el cáncer de mama (CaM) ocupa el segundo lugar de cáncer más diagnosticado, en las mujeres, es la principal causa de muerte por cáncer, ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad. En el 2018, hubo alrededor de 2.1 millones de casos diagnosticados, es decir, 1 de cada 4 mujeres fue diagnosticada con CaM. Se estima que en el año 2025 habrá casi 2.5 millones de nuevos casos y 769 mil decesos por esta neoplasia (Bray et al., 2018).

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de México reporta que este tipo de cáncer ocupa el primer lugar tanto en incidencia como en mortalidad en las mujeres mexicanas. En incidencia, el CaM representa el 23% de todos los tipos de cáncer, seguido por el tumor del cuello de útero (13%) y el tumor maligno de ovario (9%). De 2010 a 2019 se reportó un incremento en la tasa de incidencia de esta enfermedad, pasando de 27.7 a 35.24 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años o más. Mientras que la tasa de mortalidad, a nivel nacional, fue de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más (INEGI, 2020).

El hecho de que en México el CaM es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres es debido, en parte, a los antecedentes personales de afecciones mamarias, antecedentes familiares de CaM, genes hereditarios que incrementan el riesgo de contraer cáncer, obesidad, menarca temprana, ser nulípara, entre otros; aunque existen diferentes opciones de tratamiento para el CaM, como la cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, estas opciones no son completamente efectivas debido a su falta de especificidad (Peairs et al., 2017).

Clasificación del cáncer de mama

El CaM es una enfermedad heterogénea, con un comportamiento clínico muy variable, ya que desde hace tiempo se ha reconocido que existe una gran diversidad morfológica, resultando en diversos tipos histológicos, asociados con diferentes resultados clínicos. Por tal motivo, se han presentado diversas formas de caracterización: de acuerdo con el tamaño del tumor, la penetración a los ganglios linfáticos, la morfología con técnicas de histología, la presencia de marcadores como receptores de hormonas, de factores de crecimiento u otras proteínas de membrana y marcadores de proliferación celular, tanto oncogenes como supresores de tumores (Exman y Tolaney, 2021; Odle, 2017; Weigelt et al., 2010; Wishart et al., 2014). A

estas formas de clasificación se asocian las particularidades de cada paciente, incluyendo la edad, el peso, la etnia, edad de la menarquia y de la última menstruación, en su caso, antecedentes familiares, uso de anticonceptivos, número de embarazos a término, abortos, entre otros.

En la Figura 1 se observa una forma de clasificación tomando algunos de los aspectos señalados arriba, con base en información publicada recientemente por los grupos de Karangadan, Lee y Provenzano (Karangadan et al., 2016; Lee et al., 2020; Provenzano et al., 2018).

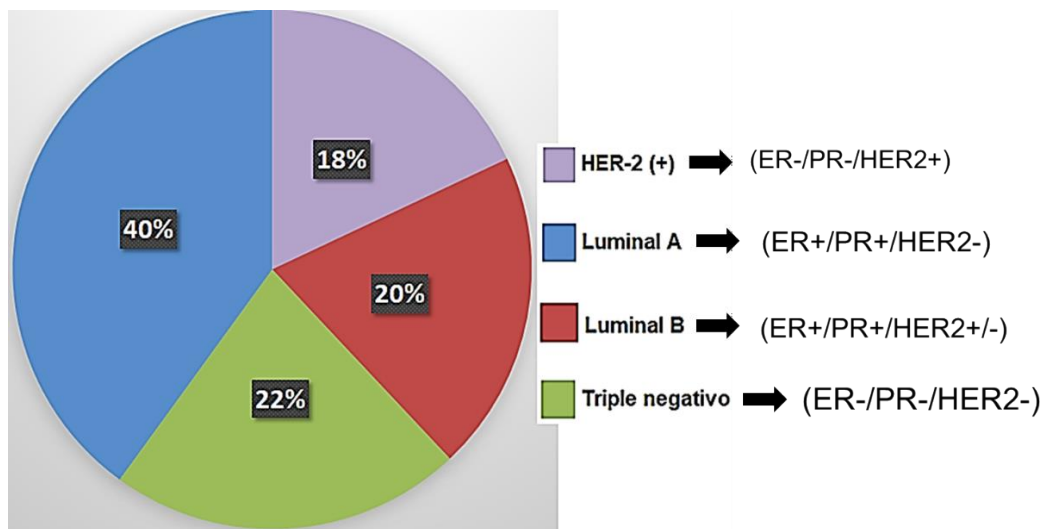


Figura 1. Clasificación molecular del cáncer de mama. Abreviaturas: Positivo al Receptor de Estrógenos (ER+), Negativo al Receptor de Estrógenos (ER-), Positivo al Receptor de Progesterona (PR+), Negativo al Receptor de Progesterona (PR-), Positivo al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (HER2+), Negativo al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (HER2-) (Tomado y modificado de Karangadan et al., 2016; Lee et al., 2020; Provenzano et al., 2018).

El presente estudio está dirigido al CaM que no expresa los receptores de estrógenos (ER), de progesterona (PR) y del factor de crecimiento epidérmico, tipo 2 (HER-2), también llamado cáncer de mama triple negativo (CMTN) y, especialmente, el que expresa el receptor de andrógenos (AR) del subtipo luminal.

Subtipos moleculares de cáncer de mama triple negativo (CMTN)

El CMTN representa del 10 al 20% del total de casos de CaM, se presenta en mujeres jóvenes, principalmente en mujeres de ascendencia hispánica y africana, es altamente metastásico, por lo que se presenta alta mortalidad (Dietze et al., 2015; Maffuz-Aziz et al., 2017; Uscanga-

Perales et al., 2019). El tratamiento del CMTN es un gran reto ya que, por lo general, su respuesta es impredecible a la quimioterapia, además de que existe una gran falta de agentes específicos que sean eficaces. La ausencia o baja expresión de los ER, PR y HER-2 significa que su proliferación y crecimiento no depende de estas hormonas esteroideas o de este factor de crecimiento, por lo que no responde a la terapia antihormonal o contra HER-2 que es frecuentemente utilizada en otros subtipos de CaM de manera exitosa (Bergin y Loi, 2019; Brown et al., 2021; Yin et al., 2020).

El CMTN es un grupo heterogéneo de cánceres que han sido clasificados en cuatro subtipos moleculares, de acuerdo con su patrón de expresión génica: Receptor de Andrógenos Luminal (LAR), mesenquimatoso (MES), tipo tallo mesenquimal (MSL), inmunomodulador (IM) y basal (Barton et al., 2015; Lee et al., 2020; Zhao et al., 2020). Estos se clasifican de acuerdo con la alteración genética que presenten, la agresividad del tumor y los resultados clínicos observados en los pacientes (Lee et al., 2020).

Andrógenos

Estructura y función de los andrógenos

En las mujeres los andrógenos juegan un papel clave en la cascada hormonal que inicia la pubertad, estimulando el crecimiento de las mamas y del vello en las áreas púbicas y axilares. Esto se lleva a cabo a través de la activación del AR, un receptor nuclear que después de su activación actúa como factor de transcripción (Davison y Davis, 2003; McEwan y Brinkmann, 2000). Por lo tanto, la disminución de los niveles de testosterona puede desencadenar un crecimiento mamario temprano (telarquia prematura). A su vez, en el epitelio mamario normal la expresión del AR es abundante, de tal manera que, el factor crítico que regula la proliferación de células mamarias tanto en tejidos normales como cancerosos es regulado mediante los efectos inhibidores de los andrógenos (Dimitrakakis y Bondy, 2009).

Las estructuras químicas de la testosterona (T; 4-androsten-17 β -ol-3-ona) y de la 5 α -dihidrotestosterona (DHT; 5 α -androstan-17 β -ol-3-ona) se muestran en la Figura 2. La primera es el andrógeno primario en los hombres, mientras que la DHT es el andrógeno natural más potente (Azzouni y Mohler, 2012). En las mujeres, los andrógenos se producen en los ovarios y en las glándulas suprarrenales (Davison y Davis, 2003). En la glándula mamaria, el metabolismo de andrógenos es posible a partir de la (dehidroepiandrosterona) DHEA y el (sulfato de dehidroepiandrosterona) DHEA-S, mediante el efecto de las enzimas esteroideas

sulfatas (ST), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) 17 β -HSD y 5 α -reductasa. Las hormonas T y la DHT están presentes en tejidos normales y en tejidos tumorales de la glándula mamaria; sin embargo, se ha observado que al disminuir los niveles de DHT intratumoral ocasiona un aumento de la malignidad o la pérdida de la diferenciación celular (Schiffer et al., 2018).

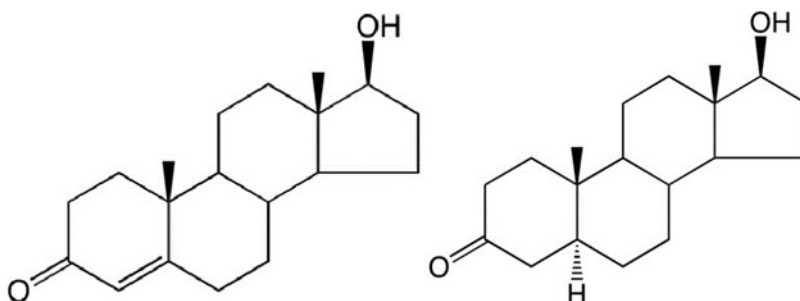


Figura 2. Representación gráfica de la estructura de la testosterona (4-androsten-17 β -ol-3-ona) y la dihidrotestosterona (5 α -androstan-17 β -ol-3-ona) (Tomado de www.steraloids.com).

Es importante mencionar que la DHT es 2.4 veces más potente que la T, con lo que se amplía la señal androgénica (Wright et al., 1996). La T y la DHT tienen efectos biológicos semejantes, ya que ambos se unen al AR, pero la DHT tiene una afinidad relativa de unión de 2 a 5 veces mayor por el AR (Azzouni y Mohler, 2012; Grino et al., 1990). Cuando se compara la afinidad relativa de unión (RBA) en comparación con el superagonista R1881 (100% RBA), la T presenta 25% y la DHT 88% utilizando AR obtenidos de próstata humana (Gao et al., 2005).

Se debe tener en cuenta que las acciones de los andrógenos como la T y la DHT están mediadas por el AR, miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroides (Davey y Grossmann, 2016). El gen del AR se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12). Está codificado por 8 exones (1-8) interrumpidos por intrones de longitudes diferentes (de 0.7 a 26 Kb), consta de 919 aminoácidos, compuesto por distintas regiones funcionales, el cual codifica un polipéptido citoplasmático de 110 kDa que tiene tres dominios funcionales principales, como se observa en la Figura 3: el dominio de regulación transcripcional N-terminal (NTD), el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD), siendo el dominio N-terminal del AR el más variable, mientras que el DBD es la región más conservada. La región DBD de toda la familia de receptores nucleares de hormonas esteroides están conformados por dos dedos de zinc cuya función es reconocer las secuencias de consenso específicas del ADN. Estos a su vez favorecen la unión directa al ADN del AR a las regiones promotoras y potenciadoras de genes regulados por el AR, permitiendo que las funciones de activación de los dominios de unión al ligando y los dominios

N-terminal puedan estimular o reprimir la transcripción de dichos genes. Entre el DBD y el LBD existe una pequeña región de bisagra, que contiene una señal de localización nuclear. También, se han identificado dos funciones de activación transcripcional: la AF-1 independiente de ligando, localizada en el dominio N-terminal necesaria para que el AR alcance su máxima actividad, y la AF-2 dependiente de ligando, localizada en el LBD siendo esencial para formar el sitio de unión del corregulador, así como para facilitar las interacciones directas entre los dominios NTD y LBD (Davey y Grossmann, 2016; Gao et al., 2005).

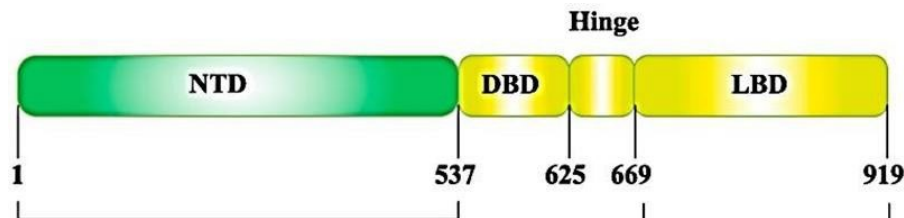


Figura 3. Proteína del AR. El gen está codificado por 8 exones (1-8) interrumpidos por intrones de longitudes diferentes (de 0.7 a 26 Kb), consta de 919 aminoácidos, compuesta por distintas regiones funcionales. El exón 1 codifica la región N-terminal (NTD, residuos 1-537), los exones 2 y 3 codifican el dominio de unión al ADN (DBD, residuos 537-625). Mientras que el exón 4 codifica una región bisagra (Hinge, residuos 625-669), por otro lado, los exones 4 al 8 codifican el dominio de unión al ligando C-terminal (LBD, residuos 669-919) (Tomado de Gerratana et al., 2018; Tan et al., 2015).

El término “andrógeno” se aplica tanto para la T como para la DHT; sin embargo, sólo DHT se considera un andrógeno “puro”, ya que no se puede aromatizar a estrógenos, mientras que la T es precursora del estradiol (E_2). Por este motivo, en experimentos *in vitro* se prefiere el uso de DHT por su alta especificidad al AR y mayor potencia biológica debido a su alta afinidad (Glaser y Dimitrakakis, 2015; Tiefenbacher y Daxenbichler, 2008). Muchos tipos de CaM tienen la capacidad de sintetizar E_2 a partir de T, ya que expresan la enzima aromatasa (Bulun et al., 2009), incluyendo el CMTN (Armasu et al., 2020).

Los andrógenos se identifican por ser compuestos orgánicos liposolubles, por lo tanto, se transportan en el plasma sanguíneo unidas a una proteína de unión al suero, como la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). Dichas proteínas protegen a los andrógenos para que no sean degradados, ya que, de no existir esta protección se acortaría su vida media (Armasu et al., 2020; Glaser y Dimitrakakis, 2015). Aproximadamente entre el 60% al 75% de la T sérica se une a la SHBG, mientras que alrededor del 20% al 40% se une a la albúmina y solamente del 1% al 2% está libre. Por lo tanto, la afinidad por SHBG en orden decreciente es: DHT, T, androstenediol, E_2 y estrona (Holst et al., 2004).

Cuando los andrógenos generan una respuesta en un tejido diana, se liberan de la proteína de unión y, a causa de su naturaleza lipofílica, fácilmente pueden ingresar a la célula al difundirse a través de la membrana plasmática. Dentro de la célula, los andrógenos se unen con el AR (Holschbach y Handa, 2017).

Papel del receptor de andrógenos (AR) en el CMTN

El AR se expresa aproximadamente entre el 70 y 90% en los casos de CaM reportados, su expresión varía del 10% al 50% en el CMTN, dependiendo el estudio (Gucalp y Traina, 2016). En México, el CMTN representa el 23% del resto de los cánceres, que es mayor a países desarrollados como EUA y Canadá, en donde se presenta el 11% (Villarreal-Garza et al., 2015).

Los tumores de CMTN son muy heterogéneos a nivel molecular, lo que involucra desigualdad en las características genéticas, alteraciones en la línea germinal, deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN, alteraciones epigenéticas, patrones de expresión génica y características morfológicas. Estas se asocian con el pronóstico y respuesta al tratamiento en pacientes con CMTN (Aine et al., 2021). Debido a que el AR participa en la regulación del ciclo celular y en la transición epitelio mesénquima (EMT), ha surgido como un novedoso biomarcador y como una potencial diana terapéutica en el CMTN (Won y Spruck, 2020).

El estudio de la expresión del AR, ha tomado una gran importancia, ya que en varios estudios realizados mediante inmunohistoquímica (IHC) se ha demostrado que su expresión en el CMTN es un indicador de mejor pronóstico (Wang et al., 2016a), aunque en otros estudios (utilizando también IHC) demuestran una correlación inversa con el pronóstico (Dieci et al., 2019). Estos resultados aparentemente contradictorios impiden que el AR se emplee para el pronóstico en CMTN; sin embargo, se podría emplear como posible diana terapéutica (Govindan et al., 2020).

Cada vez hay más datos que indican que la vía de señalización de AR tiene un papel importante en el origen y progresión de CMTN. Las líneas celulares de CMTN positivas al AR a menudo expresan mutaciones de PI3KCA, volviéndolos más sensibles a los inhibidores de PI3K/mTOR. Es importante destacar que los AR en el CMTN interactúan con la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) y BRCA1, reguladores del ciclo celular BRCA1 y PARP1 activan la transcripción de genes AR estimulando el crecimiento tumoral (Leung y Sadar, 2017; Lyalkin et al., 2020).

Se ha reportado que el AR tiene una estrecha relación con la aparición, el desarrollo, la recurrencia, la metástasis y el pronóstico del CMTN, demostrando que la vía de señalización del AR juega un papel crítico en la aparición y el desarrollo de CMTN, por lo tanto, al inhibir la vía de señalización del AR podría ser eficaz para su tratamiento (Bleach y McIlroy, 2018; Kong et al., 2020).

A las pacientes con CMTN casi nunca los beneficia la terapia dirigida a HER-2, los cuales suelen recibir quimioterapia citotóxica no selectiva, razón por la que las pacientes presentan más efectos colaterales, pudiendo abandonar la terapia y, en consecuencia, los pronósticos son desfavorables en comparación con otros tipos de CaM donde se utilizan terapias dirigidas (Denkert et al., 2017). El AR tiene una gran similitud estructural y multifunción con el ER y PR, y comúnmente se expresa en el CaM, también se ha demostrado que el AR participa en la proliferación, invasión y metástasis tumoral (Xu et al., 2020).

Vía de señalización genómica de los andrógenos en el CaM

Como se observa en la Figura 4; la vía de señalización clásica del AR comúnmente conocida como “canónica”, comienza cuando el ligando se une al dominio LBD del AR, es decir, los andrógenos atraviesan la membrana plasmática, ingresan al citoplasma y se unen al AR. Como consecuencia de esta interacción ocurre un cambio conformacional en el AR, que favorece la disociación de proteínas que mantienen al receptor inactivo dentro del citoplasma, como es el caso de la proteína chaperona 90 (HS90), permitiendo que se acumule en el núcleo de la célula. Posteriormente, el complejo dentro del núcleo forma un dímero que se une a elementos de respuesta de andrógenos (ARE), de tal manera que, modulan la transcripción de genes y, posteriormente, la síntesis de proteínas. La unión del AR con sus específicos ARE propician el reclutamiento de las enzimas histona acetiltransferasas (HAT) y proteínas correguladoras esenciales. Posibilitando la unión de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) seguida de factores de transcripción (GTF y RNA pol II) que inducen la transcripción y controlan la expresión de genes regulados por andrógenos (Lucas-Herald et al., 2017; Ortega-Domínguez et al., 2015). El AR juega un papel esencial en el desarrollo de la metástasis, ya que promueve la migración y la invasión, al inducir la degradación de la matriz extracelular (Gerratana et al., 2018). Se ha demostrado que el AR promueve la expresión de metaloproteinasas (MMP), particularmente MMP-2 y MMP-9, en pacientes con CaM esto se ha relacionado con tumores más agresivos (Christenson et al. 2017).

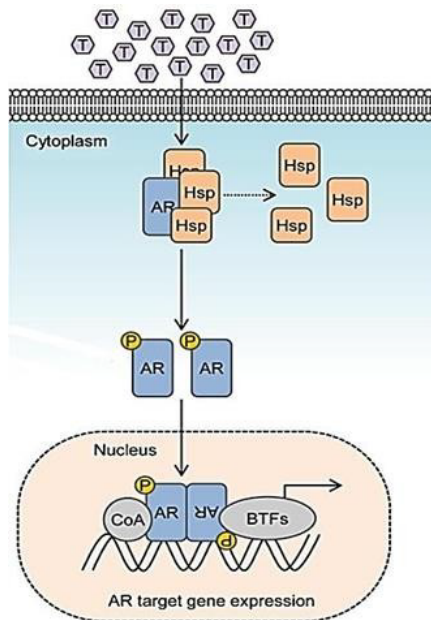


Figura 4. Vía de señalización genómica de los andrógenos. La T atraviesa la membrana plasmática, en el citoplasma se une con el AR, la unión del ligando con el AR induce un cambio conformacional en el AR a través del cual se disocian proteínas de choque térmico (HSP), promoviendo la translocación nuclear del AR lo que conduce a su dimerización. Dentro del núcleo el AR se une con sus ARE e interactúan con correguladores (CoA, coactivadores) para modular la expresión de sus genes blanco (Tomado de Leung y Sadar, 2017).

Vías de señalización no genómica de los andrógenos en el CaM

En la Figura 5 se muestra la señalización no genómica del AR se distingue por la velocidad, ya que, sus tiempos de respuesta van de segundos a minutos, manifestando una falta de transcripción y traducción de genes que responden a los andrógenos. El AR activado es capaz de interactuar con diversas moléculas de señalización en la membrana plasmática. Cuando el AR interactúa con la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y estimula esta vía. Por otro lado, el AR tiene la capacidad de interactuar con caveolas, particularmente con la caveolina-1 (Cav-1), que interactúa con tirosinas-quinasas de la familia Src (es fosforilado por Src en la tirosina 14), con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), PI3K/Akt y Stat. Así mismo, estimula factores de crecimiento como son el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el EGF, y los receptores de tirosina quinasas (RTK) como HER-2 que puede estimular al AR independientemente de los andrógenos mediante proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las diferentes rutas que involucran a Akt (Bennett et al., 2010). La ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) abarca diferentes cascadas de señalización de las cuales la quinasa regulada por

señales extracelulares Ras-Raf-Mek 1 y 2 (ERK1/2) es una de las más desreguladas en el cáncer. Esta vía regula múltiples funciones celulares críticas, incluida la proliferación, el crecimiento y la senescencia (McCubrey et al., 2007).

De tal manera que, los RTK y los receptores acoplados a proteína G (GPCR) igualmente se hallan concentrados en caveolas, en donde el AR podría estar involucrado en la activación de dichos receptores. Mientras que, los GPCR de igual manera pueden fosforilar al AR independientemente del andrógeno mediante MEK1/2 y ERK1/2. Además, la fosforilación del ligando del AR previene su degradación, facilitando la translocación y la activación nuclear del AR. Hay que tomar en cuenta que, la mayor parte del tiempo la actividad no genómica del AR enciende cascadas de señalización que regulan otros receptores nucleares (NR), factores de transcripción (TF) y eventos de señalización citoplasmática como el calcio intracelular (Ca^{2+}) (Bennett et al., 2010).

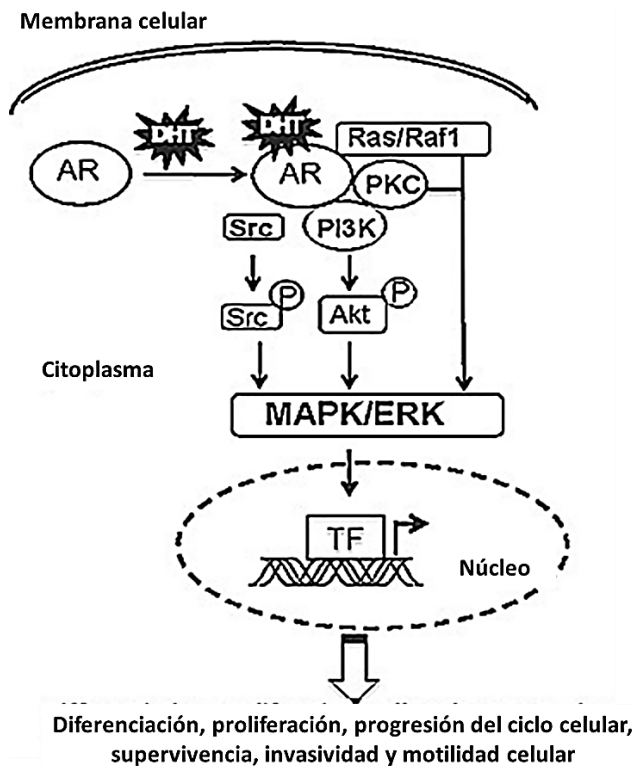


Figura 5. Vía de señalización no genómica de los andrógenos. Esta vía no requiere ni la translocación nuclear del AR ni la unión de AR-ADN, es una señalización rápida y reversible que ocurre en minutos., El AR activado ubicado en el citoplasma tiene la capacidad de interactuar con varias moléculas de señalización como; PI3K/Akt, Src, Ras-Raf-1 y la proteína quinasa C (PKC), que a su vez convergen en la ruta MAPK/ERK, que conduce a la proliferación celular (Tomado y modificado de Liao et al., 2013).

Membrana plasmática

Características de las membranas plasmáticas de células cancerosas

Las membranas plasmáticas establecen barreras entre las células y el medio externo, comportándose como un interfaz de intercambio entre el interior y el exterior de la célula (Puech et al., 2006). Son importantes reguladores de la función celular, juegan papeles de gran importancia en los procesos fisiológicos de las células como el ingreso de nutrientes y la salida de productos de desecho, la transducción de energía, el reconocimiento de moléculas externas, la conversión de energía, la activación de señales de apoptosis y supervivencia, así como de la diferenciación celular (Alarmo et al., 2009). Por consiguiente, cuando se presentan cambios en la estructura de la membrana plasmática, logra influir directamente en las funciones normales de las células (Sato et al., 2007).

Las células cancerosas se originan en respuesta a mutaciones de ciertos genes, se sugiere que los cambios en el genotipo de las células de cáncer generan alteraciones críticas en la fisiología de la célula, ocasionando de manera colectiva el crecimiento maligno. Dichas alteraciones se clasifican en autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a los factores que inhiben el crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis y evasión de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2000).

En las células no cancerosas la membrana celular o membrana plasmática forma una barrera física y química estable capaz de separar el interior y el exterior de la célula, está formada tanto por lípidos como por proteínas (ambos a distancias pequeñas son relativamente móviles), los lípidos (compuestos por una cabeza polar y una cola hidrófoba relativamente larga) son un componente de la pared celular cuya función es mantener el citoplasma acuoso separado del medio extracelular. La estructura de la membrana celular consta de una bicapa lipídica en la que están incrustadas algunas proteínas las cuales llevan a cabo funciones específicas como el transporte selectivo de moléculas y el reconocimiento célula-célula. La bicapa lipídica es una matriz de fosfolípidos, las cuales son moléculas anfipáticas, es decir, un extremo es hidrófilo y el otro extremo es hidrófobo. Esto último es importante debido a que, la presencia de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos permite la interacción no covalente con otros lípidos y proteínas. Mientras que, los fosfolípidos constan de una "cabeza" rica en fosfato orientada hacia el exterior y una "cola" formada por lípidos hidrófobos orientada hacia el interior, de tal manera que se agrupan en una bicapa, esta característica le permite ser

impermeable a moléculas solubles en agua al mismo tiempo puede ser suave y flexible (Cooper, 2000; Zalba y ten Hagen, 2017).

El 50% de la membrana está compuesta por lípidos, la membrana externa consiste principalmente por fosfatidilcolina y esfingomiélin, mientras que, la membrana interna está conformada por fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (importante en la señalización celular), estos últimos están cargados negativamente. Además de los fosfolípidos, la membrana contiene cantidades variables de glucolípidos y colesterol (componente principal de la membrana). El otro 50% de la membrana consta de proteínas, se han distinguido dos clases asociadas a la membrana, las proteínas integrales están conformadas por proteínas transmembranales que se extienden por ambos lados de la membrana y proteínas ancladas a lípidos que están confinadas a un solo lado de la membrana, mientras que, las proteínas periféricas están unidas a la membrana externa y por lo tanto, no interactúan con el núcleo hidrofóbico de la membrana (Raicu y Popescu, 2008; Zalba y Ten Hagen, 2017).

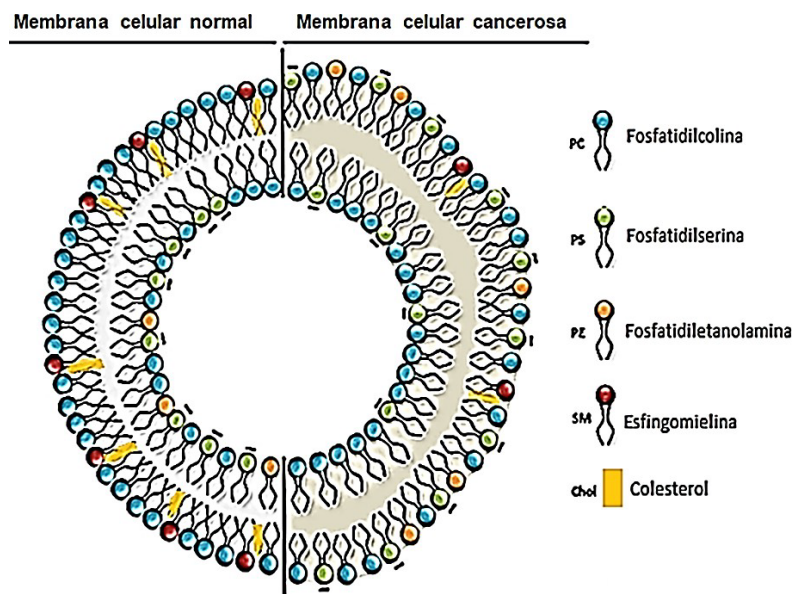
Existe una diferencia en la concentración de iones a ambos lados de la membrana, el ion potasio (K^+) está más concentrado al interior y menor concentrado al exterior, mientras que, los iones sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) están más concentrados al exterior y menos concentrado al interior. De tal manera que, a pH fisiológico los componentes de la membrana generan principalmente cambios negativos, por lo tanto, cuando ocurre un cambio en el pH se ve alterada la carga superficial de la membrana, es decir, a un pH más bajo se vuelve más positiva y a un pH más alto se vuelve más negativa. Como consecuencia, debido a la adsorción de iones los cambios en la densidad de carga de la membrana repercuten en la migración de iones a través de los canales de la membrana. Al generarse una diferencia en el potencial de la membrana, esta actúa como un separador entre dos soluciones de electrolitos y al mismo tiempo permite que se acumulen iones cargados en la superficie de la membrana (Tamagawa y Morita, 2014).

Uno de los cambios más estudiados en las membranas plasmáticas de células cancerosas comprende modificaciones en la composición de moléculas que integran su bicapa lipídica, incluyendo la alteración de las balsas lipídicas, que pueden permitir mejor capacidad de respuesta a las terapias contra el cáncer, especialmente las alteraciones en los dominios que estén asociados con la tumorigénesis, la cantidad de fosfatidil etanolamina y de fosfatidil colina se incrementan de manera significativa y las concentraciones de esfingomiélin disminuyen en las células cancerosas, en comparación con las células normales, también se caracteriza

por mostrar una baja expresión de moléculas de adhesión celular como las integrinas de β -catenina y E-cadherina, la sobreexpresión de algunos receptores de factores de crecimiento como HER-2 y de los ER (Erazo-Oliveras et al., 2018).

Estos cambios se favorecen debido a que el pH extracelular (pHe) se vuelve más ácido, en comparación con el que presentan las células no cancerosas (Figura 6), cambiando la composición de fosfolípidos y proteínas, por ende, la topología de la membrana plasmática a nivel nanométrico, ocasionando que cambie su respuesta a los estímulos extracelulares (Alves et al., 2016). De manera similar, en condiciones de cultivo normales, después de la exposición a fármacos se observan cambios en la ultraestructura de la membrana plasmática; la morfología de la superficie mostró cambios en la rugosidad de la membrana, dependiente de la concentración del fármaco (Wang et al., 2009b).

Se ha propuesto que las alteraciones en la fluidez de la membrana de las células cancerosas pueden estar relacionadas con su potencial maligno y su capacidad metastásica (Baritaki et al., 2007), es decir, la rugosidad de la membrana plasmática aumenta en las células cancerosas cuya alteración podría explicar la sensibilidad o resistencia de las células cancerosas a varios medicamentos contra el cáncer. En consecuencia, puede favorecer o perjudicar las terapias antineoplásicas, dependiendo del tipo de agente terapéutico y de las modificaciones que se presenten en la topología de las membranas (Hendrich y Michalak, 2003; Lucio et al., 2010). Además, las propiedades de la membrana a su vez regulan la entrada, conformación y localización de los fármacos dentro de la membrana, modulando así sus efectos sobre dianas terapéuticas (Alves et al., 2016).



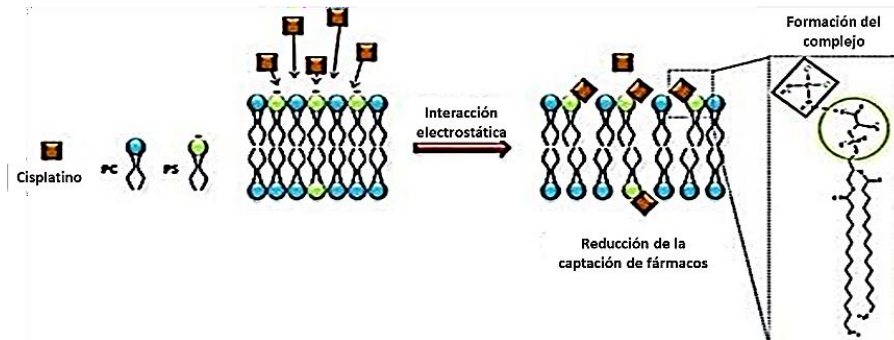


Figura 6. Representación esquemática de las alteraciones en la composición de las membranas de células cancerosas y no cancerosas y la capacidad para captar fármacos. En el esquema de la derecha se observan las alteraciones en la composición y distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática como consecuencia de la transformación neoplásica de la célula. El entorno que rodea a la célula cancerosa se altera, ocasionando un aporte sanguíneo heterogéneo y desequilibrado, dando como resultado un microambiente ácido (pH 6.2 a 6.9), conocido como pH extracelular (pHe), a diferencia del pH que presentan las células no cancerosas (pH 7.3 a 7.4). Ésta es una particularidad intrínseca del cáncer y facilita la invasión celular. Es relevante tomarlo en cuenta, debido a que, la interacción de los medicamentos con la membrana plasmática depende considerablemente del pH que tenga el entorno, ya que también cambia su rugosidad. PC=fosfatidil colina; PS=fosfatidil serina; PE=fosfatidil etanolamina; SM=esfingomiolina; Chol=colesterol. En el esquema derecho se representan los cambios resultantes en la interacción de los agentes quimioterapéuticos (cisplatino) con los fosfolípidos de membrana (Tomado y modificado de Alves et al., 2016).

Técnicas para el análisis de las propiedades de las membranas celulares

La perfilometría óptica de campo amplio no interferométrico (NIWOP), se utiliza para medir la topografía de la membrana de una célula viva. A través de esta técnica se pueden observar variaciones de altura partiendo de imágenes procesadas que son capturadas por una cámara CCD (por sus siglas en inglés Charge-Coupled Device), eliminando el mecanismo de escaneo para obtener una imagen. La sonda es un objetivo de inmersión en agua, por lo cual debe trabajarse a milímetros de distancia. Por esta razón, durante la medición no se alteran las actividades de la membrana y el movimiento celular. La principal ventaja de NIWOP es que en una superficie de muestra proporciona una medición de altura nanométrica. Además, dicho sistema es capaz de obtener imágenes rápidas de la topografía de la membrana tridimensional con una resolución nanométrica (Wang et al., 2005).

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es otra técnica que permite ampliar una muestra con una resolución de alta calidad y detalles muy precisos, también es capaz de precisar la composición elemental de una muestra, por lo cual, puede generar una mejor comprensión de

los detalles de la superficie a nivel nanométrico. Por lo tanto, se puede utilizar para obtener imágenes de la topografía de la muestra o para determinar la composición local, la estructura cristalina, la orientación, las propiedades eléctricas y ópticas de la muestra (Kaul-Ghanekar et al., 2009; Nguyen y Harbison, 2017). Un SEM necesita un vacío para que, al utilizar la fuente de electrones, estos se enfoquen y dirijan hacia los electroimanes para golpear la muestra, escaneando la superficie para producir una imagen topográfica. El entorno de vacío impide que los electrones entren en contacto con moléculas de gas y partículas de aire que evitan que interaccionen con la muestra, como consecuencia se tendría una imagen de mala calidad. Como resultado del bombardeo de electrones, en la muestra rebotan los electrones secundarios y retrodispersados que detectados por dos detectores de imágenes con carga positiva permitiendo la traducción de la información capturada en una pantalla de computadora arrojando una imagen en blanco y negro (Nguyen y Harbison, 2017; Takahashi, 2018).

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es otra técnica eficaz para realizar un análisis unicelular de las propiedades de las células adherentes cultivadas, es decir, es adecuado para estudiar células y tejidos adherentes. Esta técnica emplea un tipo de microscopio de sonda de barrido, basado en un voladizo o *cantilever* capaz de entrar en contacto con la muestra y escanearla directamente. Mediante AFM y los modelos teóricos pueden medirse las propiedades mecánicas como la rigidez o la viscoelasticidad, así como las propiedades eléctricas, particularmente el módulo de Young representa la medida de rigidez y resistencia a la deformación elástica. La viscoelasticidad se mide por medio de hendiduras y oscilaciones de retención sucesivas a frecuencia normalizada, seguidas de una retracción final del penetrador (Li et al., 2017; Runel et al., 2021).

Fundamento de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El principio de la AFM se fundamenta en que la fuerza entre la punta y la muestra cambia con la distancia desde la superficie. A distancias cortas entre la punta y la muestra, predominan las fuerzas de atracción como las fuerzas de Van der Waal y las fuerzas capilares (en el aire). A medida que la punta se aproxima aún más a la superficie, las fuerzas repulsivas que se originan en la superposición orbital irán tomando el control. La imagen obtenida se construye conforme la superficie se escanea a través de una punta de tamaño nanométrico montada en un voladizo suave que reacciona a las pequeñas fuerzas presentes entre la punta y la muestra. El voladizo se desvía cuando la punta interacciona con la superficie, y esto se registra al reflejar la luz láser de la parte posterior del voladizo y se detecta por medio de un detector de fotodiodo

sensible a la posición. En el voladizo o *cantilever* un circuito de retroalimentación trabaja para mantener una deflexión constante desplazando hacia arriba y hacia abajo la muestra o platina. La señal se traduce en información topográfica de la superficie (An et al., 2020).

El límite de resolución de las imágenes obtenidas por AFM depende de la geometría de la punta de la sonda, de un tamaño nanométrico la cual está fijada en el extremo libre de un voladizo, permitiéndole desplazarse en direcciones XYZ para escanear la muestra. Para reconocer la posición de la punta o voladizo, se enfoca un rayo láser en el extremo libre del voladizo, sobre la punta de la sonda. El haz reflejado se dirige hacia un fotodiodo de cuatro cuartos. Dependiendo de la fuerza aplicada, las propiedades mecánicas del voladizo y la posición del rayo láser sobre el fotodiodo, se obtienen las características topográficas y mecánicas de la muestra. Existe una gran variedad de voladizos, con una constante de resorte desde 0.06 N/m hasta 200 N/m para medir células y tejidos utilizando puntas cónicas o esféricas (Runel et al., 2021).

En la AFM existen diferentes modos de funcionamiento, principalmente el modo de contacto y el de golpeteo (*"tapping"*). En el modo de contacto, la punta de la sonda está en constante contacto físico con la superficie de la muestra y a lo largo de la superficie el motor piezoeléctrico Z se mueve, manteniendo una continua fuerza aplicada por el voladizo. Para cada píxel la AFM da la posición XYZ reconstruye la topografía de la muestra. Mientras que, en el modo de *"tapping"*, el voladizo se mueve de hacia arriba y hacia abajo cerca de la superficie de la muestra. Por consiguiente, la punta en voladizo parcialmente está en contacto con la muestra. Cada píxel corresponde a una curva de indentación de fuerza, que establece la topografía, obteniendo las características mecánicas de la muestra y el punto de contacto en la curva de indentación (An et al., 2020; Muller, 2008).

La AFM proporcionar información muy específica sobre la altura de los objetos (resolución vertical $<0,5 \text{ \AA}$), por el contrario, la resolución lateral está condicionada por el tamaño de la punta. Debido al efecto de ampliación de la punta los objetos que tienen un tamaño similar a la de la punta parecen más grandes de lo que son. Se debe tener cuidado de no comprimir las características de la superficie con la punta si se extraen imágenes de superficies blandas (Allison et al., 2010; An et al., 2020).

Rugosidad de membrana

Análisis de la rugosidad de membrana mediante AFM

La rugosidad de la membrana plasmática se define como “la desviación de la topografía de la superficie de la membrana de una superficie ideal atómicamente lisa”. También se ha propuesto que la rugosidad de la membrana plasmática podría reflejar diferentes condiciones celulares, tanto fisiológicas como patológicas (Chang et al., 2017).

La rugosidad de la membrana plasmática, a nivel nanométrico, se considera como un importante parámetro debido a que participa en diversos mecanismos celulares como la adherencia con los sustratos, la motilidad, el contacto intracelular, entre otros, por lo cual se considera como un indicador de las funciones fisiológicas de la célula. Su estudio ha sido ligado en los últimos años con la cualidad de conseguir una topología de alta resolución de la superficie celular, esto puede ser estudiado a través de la AFM, mediante la cual se obtienen imágenes de la superficie celular con una resolución lateral de unos pocos nanómetros sin deteriorar la estructura celular (Keren et al., 2008; Muller, 2008). Recientemente, se han reportado imágenes de AFM de la membrana plasmática de células de CaM (MCF-7), con resoluciones nanométrica y tamaño de 250 nm^2 (Lara-Cruz et al., 2019).

El cálculo de los parámetros de rugosidad obtenidos mediante la técnica AFM incluye información con respecto a la forma nominal, la ondulación y la rugosidad. Un punto clave para valorar los parámetros de rugosidad es la selección correcta de los parámetros de exploración, como la longitud de exploración y el paso de muestreo (Antonio et al., 2012). La AFM puede proporcionar imágenes de células vivas con una resolución nanométrica, a través de las imágenes (se pueden representar en tres dimensiones o “3D”) se obtiene una nueva perspectiva de los procesos dinámicos; como los cambios nanoestructurales que son ocasionados por el crecimiento o las interacciones farmacológicas, debido a que se mide la fuerza con la que interactúan la punta modificada y la muestra (Müller y Dufrêne, 2011).

Concepto de altura y rugosidad de membrana, a nivel nanométrico

La medición de la rugosidad de la superficie a nivel de “nanoescala” es de suma importancia para las aplicaciones científicas, debido a sus características críticas en los fenómenos físicos y químicos. La rugosidad de la superficie de los materiales puede modificarse considerablemente como consecuencia de la forma en que interactúan con la luz, fotones,

moléculas, etc. (Figura 7), razón por la cual establece en última instancia la funcionalidad y propiedad de los materiales (Gong et al., 2018).

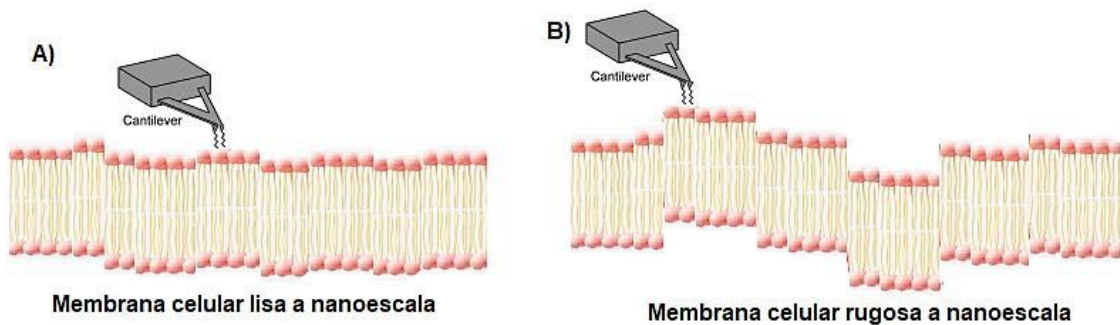


Figura 7. Modificaciones en la rugosidad de la superficie de la célula. (A) Se observa una superficie con una baja rugosidad, con baja densidad de picos y una altura pequeña de picos. (B) Se muestra una superficie con alta rugosidad, alta densidad y gran altura de picos (Tomado y modificado de Wu et al., 2018).

De manera que, para comprender mejor la morfología de una superficie se debe realizar una descripción cuantitativa de la topografía de la superficie; por lo tanto, los datos topográficos deben tratarse en cada línea del perfil bidimensional (2D) o sobre todos los perfiles que existen en la superficie tridimensional (3D), la cual contiene tres ejes (x; ancho, y; largo, z; alto), por lo que, cada píxel contiene información contenida en los tres ejes (Raposo et al., 2007).

Altura

La altura de la membrana plasmática se define como “la distancia vertical de las irregularidades de la superficie de la membrana de una superficie ideal atómicamente lisa” (Gong et al., 2018). Por lo tanto, al medir los puntos que caen dentro de un área se observa un contorno 2D (Gadelmawla et al., 2002).

De acuerdo con Oliveira y colaboradores (2012), para caracterizar la topografía de la superficie se requieren parámetros como la altura, a continuación, se describirán algunos conceptos necesarios para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la altura (Oliveira et al., 2012).

La altura máxima del pico del perfil (R_p) es “la medida del pico más alto alrededor del perfil de la superficie desde la línea de base” (Oliveira et al., 2012). Asimismo, la profundidad máxima del valle del perfil (R_v) es “la medida del valle más profundo a través del perfil de superficie analizado desde la línea de base” (Oliveira et al., 2012).

$$R_p = |maxZ(x)|_{por\ 0 - X - L}$$

$$R_v = |minZ(x)|_{por\ 0 - X - L}$$

En estas ecuaciones, $maxZ(x)$ hace referencia a la altura máxima del pico dentro del área, $minZ(x)$ se define como el punto de datos más bajo de la región a examinar, "X" comprende los promedios a lo largo del perfil y la longitud de evaluación (L) (Oliveira et al., 2012).

Por lo tanto, la altura máxima del perfil (R_T) se puede definir como "la distancia vertical entre el valle más profundo y el pico más alto" (Oliveira et al., 2012); dichos parámetros se encuentran definidos en la Figura 8.

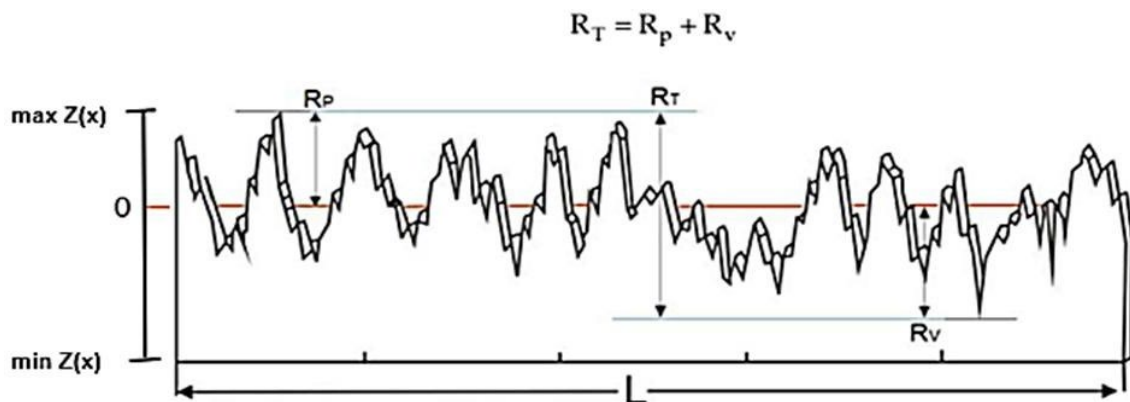


Figura 8. Ilustración de la altura máxima del perfil (R_T), Profundidad máxima del valle del perfil (R_v) y la altura máxima del pico del perfil (R_p) para el perfil de una superficie (Tomado de Oliveira et al., 2012).

Otro parámetro que se puede identificar es la altura media aritmética, también conocida como media de la línea central (CLA), actualmente es el parámetro de rugosidad más utilizado universalmente, definido como "la desviación absoluta promedio de las irregularidades de rugosidad de la línea media sobre una longitud de muestreo" (Oliveira et al., 2012) como se muestra en la Figura 9. Este parámetro proporciona una descripción general de las variaciones de altura, aunque no da información sobre la longitud de onda y no es sensible a pequeños cambios de perfil (Gadelmawla et al., 2002).

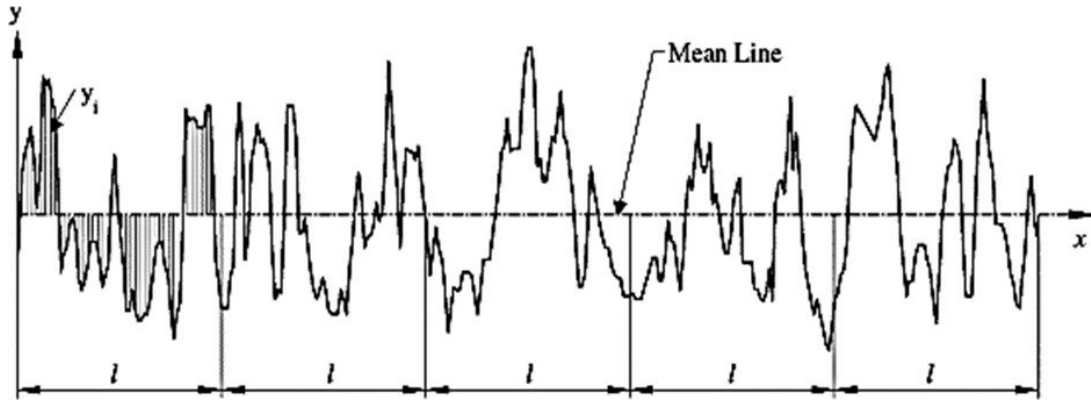


Figura 9. Imagen representativa de la altura media aritmética para el perfil de una superficie (Tomado de Gadelmawla et al., 2002).

Para realizar un análisis más detallado y preciso de la rugosidad se puede hacer un corte transversal a una parte de la superficie (sección), obteniendo una imagen de la vista superior. Usualmente, esta técnica se utiliza para conocer más a fondo los perfiles superiores, es decir, conocer más detalles del perfil de la superficie (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

Al realizar el análisis de la sección se logran mediciones mucho más directas de las características de la superficie; la distancia vertical (profundidad), la distancia horizontal, el ángulo entre dos o más puntos y los parámetros de rugosidad (R_a ; rugosidad media aritmética, R_q ; rugosidad cuadrática media, R_{max} ; rugosidad máxima y R_z ; rugosidad media que se enfatizan en la siguiente sección). Lo cual, permite definir la visualización de la imagen para un análisis específico de la superficie de la muestra, dado que, se ajusta la escala de datos para mostrar el aspecto verdadero de x ; ancho, y ; largo, z ; alto y sus proporciones. Siendo sumamente útil, debido a que, en aquellas muestras muy planas, los perfiles pueden ser imperceptibles (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

Rugosidad

La rugosidad de membrana, por lo general, se determina midiendo la altura, la anchura y la frecuencia de los patrones o irregularidades de la superficie (Gong et al., 2018). Mediante un análisis geométrico se realiza una evaluación visual y subjetiva de la rugosidad (evaluación cualitativa), mientras que, al calcular los parámetros de rugosidad se establece una evaluación cuantitativa permitiendo llevar a cabo un análisis estandarizado de las superficies (Tonietto et al., 2019). A partir de la altura (z , distancia vertical entre los puntos máximo y mínimo) se miden

los puntos que caen dentro de un área y se observa un contorno 2D o un mapa 3D de la superficie de membrana. Generalmente, los valores de la rugosidad se expresan en micrómetros (μm) o en micropulgadas (μin) (sistema métrico o en pulgadas respectivamente), sin embargo, es importante tener en cuenta que la medición de la rugosidad de la superficie se detecta mejor a nivel de nanoescala (\leq a 100 nm) (Gong et al., 2018).

El análisis de la rugosidad de membrana posibilita localizar las variaciones topográficas que expresan las muestras al ser “barridas” por una sonda. Dicha técnica ayuda a estimar la rugosidad superficial de membrana a partir de lo siguiente: supongamos que, en una zona con escasa textura superficial, los vectores perpendiculares a la superficie de este serán más o menos paralelos, por lo que, presentarán una altura (z) baja. Por otra parte, si tuviéramos una zona con gran textura superficial, las modificaciones vectoriales de pendiente y orientación harán que estos tengan una altura mayor (Matthews et al., 2010). En la Figura 10 se representa de manera esquemática el análisis superficial realizado a través de AFM.

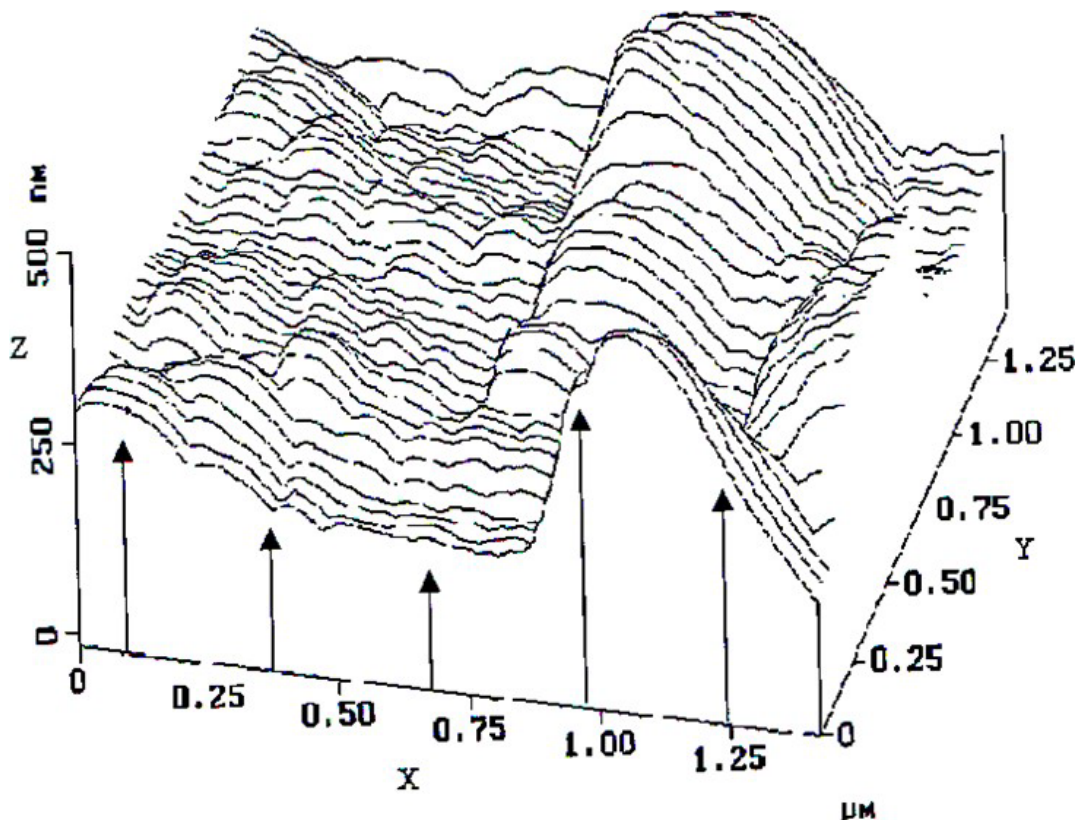


Figura 10. Representación esquemática del análisis de la rugosidad superficial por AFM (Tomado de Band, 1989).

Una imagen de AFM posee tres ejes (x, y, z) que es cubierta por 512 puntos que forman la imagen tridimensional de manera que una imagen bidimensional (512 puntos x 512 puntos) da

como resultado a una resolución espacial de 262,144 píxeles. Es decir, al escanear una pequeña área se consigue una mejor resolución. El número de píxeles es siempre el mismo para distintas áreas de escaneo. Por esta razón, para comparar los factores de rugosidad se requiere siempre escanear una misma área (Band, 1989).

Para obtener una mayor resolución se debe escanear un área pequeña. Por ejemplo, si el tamaño de una imagen es de 10 μm (10,000 nm), se tendría una resolución de 19.53 nm/píxel, es decir, 19.53 nm sería la representación de la distancia entre dos píxeles adyacentes, por lo tanto, aquellos objetos que se encuentren por debajo de los 19.53 nm no se consiguen resolver (resolución baja). Aunque, si nuestra área de muestreo mide un 1 μm , la distancia entre dos píxeles sería de 1.953 nm, es decir, que la resolución para este caso específico se mejoró 10 veces. En cada píxel existe información en las dimensiones x, y, z (Band, 1989).

Factores de rugosidad

El factor de rugosidad se utiliza para la interpretación y evaluación de la textura o rugosidad superficial de membrana de las muestras analizadas (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001). A continuación, se mencionarán las principales opciones para realizar un análisis cuantitativo de la topografía de la superficie:

La **rugosidad media aritmética (Ra)** es la más utilizada, dado que es un parámetro sencillo de obtener en comparación con otros. Está definido como “la media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones de la altura de la superficie medida con respecto al plano” (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n |Z_j|$$

En la fórmula de la Ecuación 1, “ Z_j ” es la ordenada, y n es el número de ordenadas consideradas. El valor de “ n ” es prefijado de acuerdo con el tipo de aparato (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

Ra es el parámetro más utilizado en todo el mundo, posee la facilidad para obtener la misma rugosidad media en instrumentos menos sofisticados, casi la totalidad de los equipos presentan este parámetro. Este parámetro, no hace distinción entre picos y valles, por lo cual, se vuelve una desventaja caracterizar una rugosidad superficial media sin estos datos, ya que, son sumamente relevantes. Por ejemplo; el valor de Ra puede ser el mismo para aquellas superficies que tengan un perfil de rugosidad completamente diferente pues depende

exclusivamente del perfil medio de las alturas. Por lo tanto, no es posible diferenciar las superficies que poseen diferentes ondulaciones, es decir, podríamos tener una superficie uniforme y otra que tenga picos (o valles) que al momento de calcular Ra tengan el mismo valor (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002).

La **rugosidad cuadrática media (Rq)** es una función que toma el cuadrado de las medidas, es decir, se define como “la media cuadrática de las desviaciones de altura tomadas de la superficie de datos medios” (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001). Los valores de Rq son parecidos al promedio de la rugosidad de membrana, dado que, se toman los valores absolutos de los cuadrados medios del área analizada.

$$Rq = \sqrt{\sum_{i=1}^n y^2}$$

En esta ecuación, “y” es la ordenada, y n es el número de ordenadas consideradas. El valor de “n” es prefijado de acuerdo con el tipo de aparato (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

Generalmente, este parámetro se utiliza en superficies donde los valores de Ra tienen poca resolución. Comparado con Ra, este parámetro es capaz de detectar los picos o valles logrando una mejor caracterización de la rugosidad de una superficie, por lo tanto, sus valores son cerca del 11% más precisos que los calculados con Ra. Lamentablemente, es un parámetro poco utilizado, en consecuencia, es más complicado obtener sus gráficas a diferencia de Ra, por último, no es capaz de definir la forma de las irregularidades (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002).

La **rugosidad media de la raíz cuadrada (RMS_[Rq])** se define como “la desviación estándar de los valores de Z dentro de la superficie” (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001) y se calcula como en la Ecuación 3:

$$RMS_{[Rq]} = \sqrt{\frac{\sum (Z_i)^2}{n}}$$

donde Z_i es el valor de la altura vertical, y n es el número de puntos dentro de la superficie. Es importante mencionar que, este valor no se puede corregir por la inclinación en el plano de los datos, por ello, al ajustar el plano cambia dicho valor (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

El parámetro $RMS_{[Rq]}$ es que posee la mayor precisión al calcular los valores de la rugosidad de membrana, también tiene la capacidad de obtener una mejor caracterización de la rugosidad en comparación con R_a y R_q . Desafortunadamente, es uno de los parámetros menos utilizados, ya que, solamente se puede calcular con instrumentos de última generación (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002). Sin embargo, en el 2006 Chan y colaboradores estudiaron los puntos clave que se deben tomar en cuenta a la hora de determinar el valor de $RMS_{[Rq]}$ mediante AFM (Chan et al., 2006):

- Delimitar el intervalo apropiado para el análisis superficial
- Minimizar las interacciones entre sonda y la muestra
- Minimizar los artificios debidos a la sonda (vibraciones, velocidad de escaneo)

Cuando el perfil de altura en una superficie presenta desviaciones tanto de la rugosidad promedio como de la rugosidad RMS , entonces, la medición debe repetirse; incluso, un gran número de picos y valles en una imagen afectan significativamente los valores de R_a y R_q ; por lo que es preferible calcular la diferencia promedio de pico a valle (Raposo et al., 2007).

La **rugosidad máxima (R_{max})** es “el valor de rugosidad máxima dentro de una superficie” (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001). Tiene la capacidad de brindar información complementaria sobre la R_a (valores de los picos o valles), por esta razón, es utilizado en la mayoría de los países. Lamentablemente, son pocos los equipos de medición que poseen dicho parámetro, además, puede mostrar una imagen equivocada de la superficie e individualmente no muestra información suficiente de una superficie, es decir, no brinda información respecto a su forma (Gadelmawla et al., 2002).

Procesamiento de imágenes celulares

El procesamiento de imágenes es una parte indispensable para procesar y mostrar datos antes de ver o analizar una imagen. El objetivo principal de todas las operaciones de procesamiento de imágenes es medir y observar las características que se han registrado con alta precisión.

Antes de analizar las imágenes obtenidas con el AFM se requiere optimizar la calidad de la imagen explorando las diferentes opciones que brinda el software. En ocasiones, no son visibles todas las características de la superficie antes de realizar un adecuado tratamiento de la imagen y, en otros casos, cuando no se emplean correctamente los métodos de procesamiento de imágenes estos pueden llegar a ocultar características importantes o inclusive dañar la imagen (Digital Instruments Veeco Metrology Group, 2001).

En los siguientes párrafos se describirán los diferentes métodos empleados para un adecuado procesamiento de imágenes.

Imagen aplanada

A causa de la mecánica del AFM, a simple vista se puede apreciar una distorsión de la curvatura en los escaneos de objetos obtenidos conocida como efecto de arco (Velegol et al., 2003).

Cuando el fondo en el escaneo de muestra del objeto posee una inclinación considerable, al momento de cambiar la altura de la muestra se verá severamente afectada por el cambio en la altura del fondo. Es común encontrar que, en algunos tipos de objetos, aún con una muy leve inclinación de altura, pueden ocasionar efectos notables de arqueamiento. La intensidad o distribución del valor varía conforme a las diferentes imágenes. En ocasiones, las intensidades son un poco más altas en el centro de la imagen y más bajas a ambos lados. Sin embargo, en otros casos, en el medio las intensidades son más bajas que en los dos lados. Por esta razón, borrar la distorsión de la curvatura del fondo se emplea para tratar esta distorsión en los datos obtenidos. Lamentablemente, este procedimiento se lleva a cabo de manera manual y, por lo tanto, requiere mucho tiempo y es impreciso (Velegol et al., 2003).

Nivelación de la imagen

Frecuentemente, las imágenes revelan distorsiones causadas por una mala inclinación o por el comportamiento del escáner no lineal. Usualmente, se procede a eliminar los falsos resultados debidos a la nivelación, es decir, consiste en eliminar la imagen que muestra los niveles de inclinación (Méndez-Vilas, 2007).

Este método de aplanamiento automático de líneas se aplica a cada fila de la imagen. Para esta técnica, se investigó y desarrolló un algoritmo de nivelación plana para descartar los

puntos del objeto en cada fila de la imagen obtenida. Por lo regular, los datos de cada fila se ajustan por medio de un polinomio. En comparación con la detección manual anterior, este método tiene la ventaja de incrementar considerablemente la precisión del etiquetado de los objetos en la imagen. Puesto que, para el etiquetado manual, en las imágenes originales no se distinguen fácilmente los objetos presentes en cada fila (Méndez-Vilas, 2007).

Al emplear este método, la dimensión de la imagen normalizada que obtenemos es de 512 x 512 y la línea i de la imagen normalizada se modela como en la siguiente ecuación, donde $S_i(x)$ representa la información de la señal normalizada sin el efecto de arqueo, $P_i(x)$ es la distorsión de la imagen debido al efecto de arqueo y $Y_i(x)$ representa los datos de la imagen original normalizada; x es la coordenada horizontal e i se basa en el número de línea en la imagen (Méndez-Vilas, 2007).

$$y_i(x) = s_i(x) + p_i(x)$$

El principal objetivo es eliminar el efecto de arqueo que se produce y así recuperar la información del objeto con precisión. El enfoque para obtener la ecuación del efecto de arqueo consiste en calcular un ajuste polinómico convexo sobre el fondo de la imagen. A partir de esto, el valor de cada fila de la imagen se ajusta a una ecuación polinómica. En caso de que se llegara a borrar dicho polinomio de la línea de escaneo grabada, se excluirían por completo los efectos de la convexidad. Cada línea en una imagen es aplanada reiterativamente en la siguiente ecuación, donde $S_i(x)$ representa la información de la señal normalizada sin el efecto de arqueo, $P_i(x)$ es la distorsión de la imagen debido al efecto de arqueo y $Y_i(x)$ representa los datos de la imagen original normalizada; x es la coordenada horizontal e i se basa en el número de línea en la imagen (Méndez-Vilas, 2007).

$$s_i(x) = y_i(x) - p_i(x)$$

En caso de que la imagen presente algunas características aisladas, al restar directamente el polinomio ocasiona que las imágenes muestren sombras alrededor de las características de una superficie plana. Esto se debe a que el ajuste polinomial es capaz de incluir las características. De hecho, donde las características grandes, en donde los valores de intensidad muestran una diferencia aparente con el fondo, se muestran en la imagen, se reduce el sustrato artificialmente, es decir, entre más grandes sean las características, peor será el primer ajuste polinomial (Raposo et al., 2007).

Sin embargo, el procedimiento más utilizado para la nivelación de imágenes AFM es conocido como línea por línea. Consiste en adecuar una línea del perfil de imagen con una ecuación polinomial que posteriormente se resta de esa línea de imagen. Enseguida de esto, la altura promedio de cada línea se determina igual a la línea corregida anterior. Se debe tener cuidado con este método, en especial cuando la imagen expresa algunas características aisladas en una superficie muy plana. Otro método generalmente utilizado consiste en tomar tres puntos seleccionados y restar a la imagen el plano formado por ellos. Este método es apropiado cuando la muestra exhibe una terraza (Méndez-Vilas, 2007).

Detección de bordes

Diferenciar y examinar la caracterización de las partículas es otra tarea fundamental. No obstante, distinguir las partículas en los aglomerados representa un gran inconveniente al momento de realizar una caracterización de las nanopartículas con alta precisión. Por consiguiente, una forma eficaz de abordar este problema es mediante la determinación de los bordes que puede detectar y localizar los límites de los objetos que existen en las imágenes. Un borde puede definirse como un cambio inesperado en la intensidad de una imagen. Particularmente, en las imágenes binarias, el borde consiste en el cambio abrupto que sufre el nivel de intensidad que pasa de 1 a 0 y viceversa (Shwetabh Singh, 2013).

Antecedentes

Propiedades de las membranas plasmáticas (rugosidad) de células cancerosas y no cancerosas

En las células no cancerosas la membrana celular o membrana plasmática forma una barrera física y química estable capaz de separar el interior y el exterior de la célula. Está formada tanto por lípidos como por proteínas (ambos a distancias pequeñas son relativamente móviles), los lípidos (compuestos por una cabeza polar y una cola hidrófoba relativamente larga) son un componente de la pared celular cuya función es mantener el citoplasma acuoso separado del medio extracelular (Cooper, 2000; Zalba y ten Hagen, 2017).

Algunas de las propiedades mecánicas más conocidas de la membrana, a nivel nanométrico, son la viscoelasticidad, la viscosidad y la rugosidad. La viscoelasticidad mide la deformación biológica de la muestra inducida por una fuerza externa o la fuerza resultante de la deformación de la muestra, por lo tanto, las células vivas se comportan como un sólido elástico y como un fluido viscoso, por lo que se consideran viscoelásticas (Bhat et al., 2012). La viscosidad es la relación entre la tensión y la velocidad de deformación, es capaz de afectar la difusión de moléculas pequeñas y, por lo tanto, controla la velocidad de las reacciones intracelulares. Como se mencionó anteriormente, la membrana consta de bicapas de fosfolípidos las cuales son más viscosas que el citoplasma celular creando barreras químicas y de difusión selectivas dentro de una célula, por lo tanto, la viscosidad influye en la difusión rotacional y traslacional de lípidos y proteínas en las membranas (Mika et al., 2016). La rugosidad de la membrana se define como la desviación topográfica real de la superficie de la membrana atómicamente lisa. Recientemente, se ha propuesto que la rugosidad de la membrana es una propiedad capaz de reflejar diferentes condiciones fisiológicas celulares dado que participa en diferentes mecanismos celulares como la motilidad, la adhesión, el contacto intracelular, etc., que reflejan el estado de salud de la célula (Antonio et al., 2012; Chang et al., 2017).

Los procesos antes mencionados están relacionados con cambios en la composición de lípidos en comparación con las células no cancerosas, estas diferencias varían de acuerdo con el tipo de cáncer, el estadio y el estado de sensibilidad (Zalba y ten Hagen, 2017). Asimismo, la composición de lípidos de las células cancerosas puede variar con el tiempo dependiendo de su estado fisiológico. En las células metastásicas disminuye el contenido de colesterol de la membrana incrementando la fluidez y la plasticidad de la membrana (Sok et al., 2002). La desorganización de los lípidos en la membrana puede modificar la señalización

celular, es decir, la pérdida de asimetría de lípidos en las células cancerosas encamina a una disminución de su permeabilidad (Szlasa et al., 2020).

Se ha observado que el incremento en el contenido de colesterol en los tumores es mayor al de los tejidos normales, que podría llegar hasta el 50%, este fenómeno se asocia con el incremento en la presencia de balsas lipídicas, de manera que, estos dominios están involucrados en procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular. En consecuencia, las modificaciones en los dominios de las balsas lipídicas podrían estar relacionadas con las transformaciones malignas, el crecimiento descontrolado, la invasividad y la metástasis. Al incrementar el número de balsas de lípidos en las células cancerosas se favorece la sobreexpresión de los receptores del factor de crecimiento como el EGFR o el IGF-1 (Zalba y ten Hagen, 2017).

En las balsas lipídicas también se localizan las integrinas, los receptores CD44 y CD24, proteínas involucradas en la progresión e invasión tumoral. En las células tumorales el exceso de dichas proteínas se relaciona con un mayor potencial invasivo y una menor fluidez de las membranas (Zalba y ten Hagen, 2017).

De igual manera, existe evidencia de que la rigidez, la viscoelasticidad y la deformabilidad de las membranas celulares están fuertemente relacionadas con la transformación celular y la progresión del cáncer. Las células malignas muestran una disminución en la rigidez y viscoelasticidad: es decir, las células malignas eran más suaves y fluidas que las células benignas. En las etapas iniciales de transformación en las células se observa una disminución en la rigidez, mientras que las células metastásicas tienen mayor rigidez (Runel et al., 2021).

Particularmente, se ha observado que las secciones de tejido mamario normal exhiben una topografía mucho más suave, mientras que la rugosidad de la superficie de las células incrementaba con el aumento de las etapas del cáncer (de Grado I a Grado III). Adicionalmente, las células gigantes multinucleadas mostraban una morfología más rugosa en comparación con las secciones tumorales de grado normal. En la Figura 11 se observa como las secciones de tejido mamario normal mostraron un aumento de 4.4 veces en comparación con las secciones de CaM avanzado (grado III) que mostraron un asombroso incremento de 24.7 veces en la rugosidad de la superficie (Kaul-Ghanekar et al., 2009).

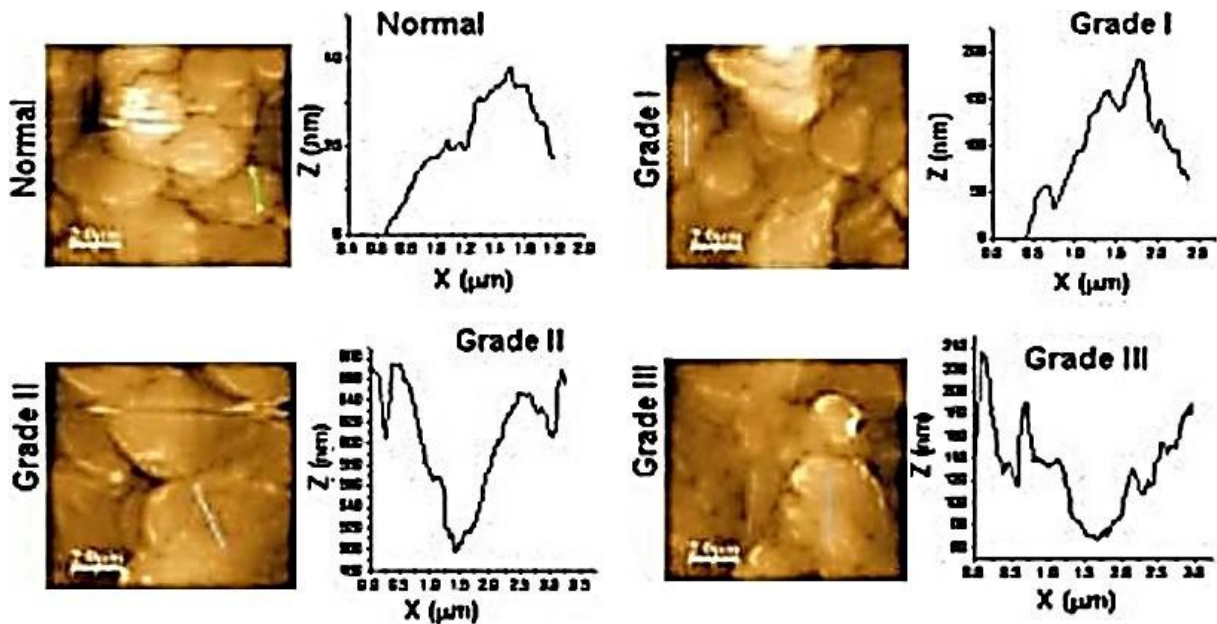


Figura 11. Secciones de tejido mamario normal y tejido canceroso. Las imágenes de AFM de alta resolución muestran una topografía suave en el tejido mamario normal en comparación con las porciones de tejido canceroso (tumores grado I, grado II y grado III) observando que al ser mayor el grado de incidencia del cáncer aumenta la rugosidad de la superficie (Tomado y modificado de Kaul-Ghanekar et al., 2009).

Factores que afectan la rugosidad de membrana plasmática en células de CaM

La rugosidad de la membrana plasmática se incrementa al aumentar la densidad de las proteínas de la ECM o la rigidez del sustrato. Sugiriendo que la rugosidad está regulada por eventos “mecano-sensibles” y podría estar involucrada en la migración celular. La magnitud de dicha rugosidad podría depender de la tensión de la membrana, así como de los filamentos de actina adyacentes y a las conexiones que tienen con la membrana, ya que, la ruptura o la estabilización de los microtúbulos no cambia la rugosidad (Chang et al., 2017).

Se ha observado que la transformación tumoral y la neoplasia están estrechamente asociadas con cambios notables en el citoesqueleto celular (Olson y Sahai, 2009). La desorganización del citoesqueleto puede originar alteraciones en la estructura de la membrana plasmática ocasionando alteraciones en sus propiedades biomecánicas (Wang et al., 2016a).

La rugosidad superficial membranal juega un papel importante en el estudio de la progresión tumoral, proporciona información importante sobre los cambios que ocurren en la superficie membranal de las células cancerosas, por ejemplo, la sobre expresión de receptores asociados a proliferación y migración celular (Kaul-Ghanekar et al., 2009).

Efecto de las hormonas esteroides sobre la rugosidad de la membrana

Desde hace poco más de una década se empezó a utilizar la técnica de AFM de alta resolución en líneas celulares de células epiteliales endometriales (Hec-1-A e Ishikawa) para observar el efecto que ejerce la progesterona (P_4) en la estructura a nivel nanométrico de la superficie celular. En dicho estudio las células Hec-1-B mostraron una morfología de superficie celular aplanada tras el tratamiento con P_4 . En la Figura 12 se muestran los cambios en la altura celular promedio y la convolución de la superficie se relacionaron con un incremento en las mediciones de rugosidad de la superficie, lo que evidencia alteraciones en la estructura molecular de la superficie celular como consecuencia de la estimulación hormonal (Francis et al., 2009).

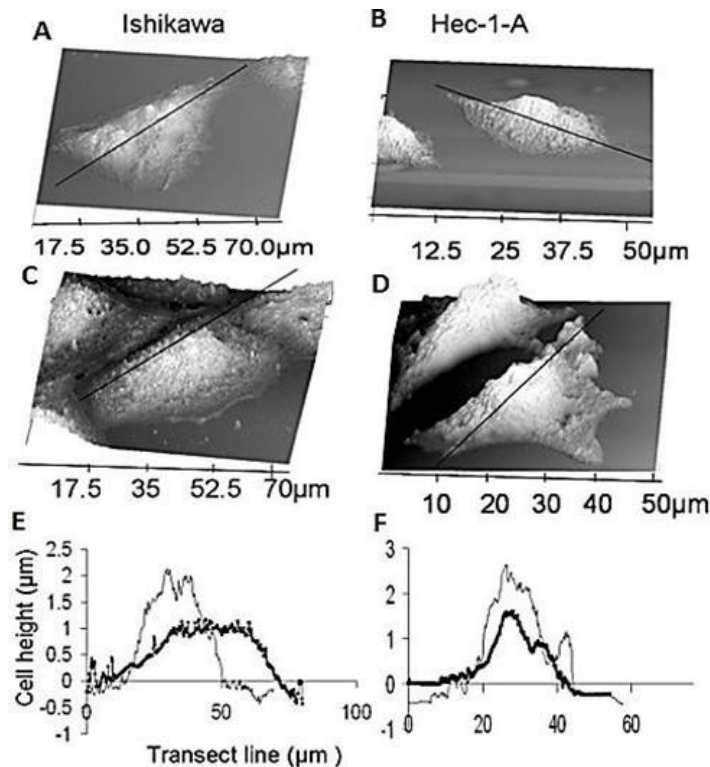


Figura 12. Cambios observados en la morfología a nanoescala. A-D) Las imágenes muestran diferencias en la forma celular y la topografía de la superficie de las células de cáncer de endometrio Ishikawa y Hec-1-A. **E y F)** La altura celular en toda la célula cambia después del tratamiento con P_4 (Tomado y modificado de Francis et al., 2009).

En el 2016 Wang y colaboradores demostraron que la célula mamaria cancerosa mostró una estructura filamentosa menos ordenada y creó una red más reticulada del citoesqueleto asociado con la membrana, en comparación con la célula benigna. En estudios anteriores se ha comprobado que el reordenamiento de la actina es fundamental para la transformación del tumor. Los resultados de Wang y col. demostraron que la rugosidad de la célula cancerosa de

mama es mayor que el de la célula benigna, lo que significa que la rugosidad de la membrana plasmática es un parámetro efectivo y puede ser un indicador perceptible del estado de salud de la célula (Wang et al., 2016a).

Un año después, Chang y colaboradores emplearon las técnicas NIWOP y la AFM para establecer si la rugosidad de la membrana está ligada con las propiedades del sustrato dado que, se ha propuesto que la rugosidad de la membrana celular es una característica susceptible para evidenciar las condiciones fisiológicas celulares. Para lo cual utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón vivo con distintas condiciones del sustrato de cultivo, es decir, aplicaron reactivos que modifican el citoesqueleto de actina o microtúbulos, aportaron evidencia de que la dinámica de los filamentos de actina en lugar de la de los microtúbulos tiene un papel decisivo en la regulación de la rugosidad de la membrana (Chang et al., 2017).

Dutta y colaboradores utilizaron la AFM para estudiar los comportamientos benignos y malignos del tejido mamario a través del sondeo a microescala de múltiples células de CaM humano (MCF-7, MDA-MB-231) y células epiteliales mamarias normales humanas (MCF-10A), bajo diferentes niveles de estrés glucémico. Gracias a las imágenes obtenidas a través de la técnica de AFM se puede observar que las células mamarias mostraban superficies organizadas heterogéneamente, posiblemente como consecuencia de cambios citoesqueléticos ocasionados por el estrés diabético (Dutta et al., 2020).

El grupo de Kaul-Hanekar investigó la relación entre la expresión de SMAR1 y la rugosidad de la superficie celular aplicando la técnica de AFM en diferentes grados de tejidos de CaM. Dicho estudio proporciona evidencias de que es factible observar la ultraestructura de la superficie de la membrana en diferentes tipos de tumores, permitiendo estudiar las características comunes y diferentes (Kaul-Ghanekar et al., 2009).

Efecto del estradiol (E_2) sobre la rugosidad de la membrana plasmática en la línea celular MCF-7

Desde hace casi dos décadas se ha observado que los estrógenos inducen modificaciones en la membrana plasmática de células de carcinoma mamario MCF-7 mediadas por ER que se encuentran anclados a estructuras como las caveolas y microdominios, sugiriendo que la interacción del ER con su ligando modifica la rugosidad de la membrana plasmática al inhibir la síntesis de caveolina, pudiendo estar relacionado con la interacción del ER y las proteínas que modulan la señal intracelular y la remodelación del citoesqueleto (Klinge, 2009; Nichols,

2003). Existe evidencia de que el E_2 regula la expresión de ciertos canales iónicos en la membrana plasmática de células MCF-7, como la activación de canales de K^+ que provocan cambios en la polarización de la membrana y modificación de su rugosidad, regulando la progresión del ciclo celular, particularmente al inicio de G1 (Ouadid-Ahidouch y Ahidouch, 2008).

Recientemente se ha observado que la rugosidad de la superficie celular de la línea celular MCF-7 es mayormente homogénea en las regiones citoplasmáticas (entre el borde y el centro de la célula), debido a que en esas zonas es donde la rugosidad es mayor y heterogénea. Así mismo, se demostró que la exposición de MCF-7 con nanopartículas de oro (AuNP) esféricas de 20 nm no muestran efectos colaterales (Lara-Cruz et al., 2016). En la Figura 13 se observa que la incubación de células MCF-7 con AuNP y E_2 incremento la rugosidad de la membrana celular en comparación las células tratadas solamente con AuNP, también se demostró que ingresa mayor cantidad de AuNP y se localizan alrededor del núcleo de las células MCF-7, efecto que podría estar asociado con la formación de lisosomas endocíticos, inducidos por el E_2 (Lara-Cruz et al., 2019). Todas estas observaciones fueron obtenidas, a nivel nanométrico, por la interpretación de imágenes de AFM.

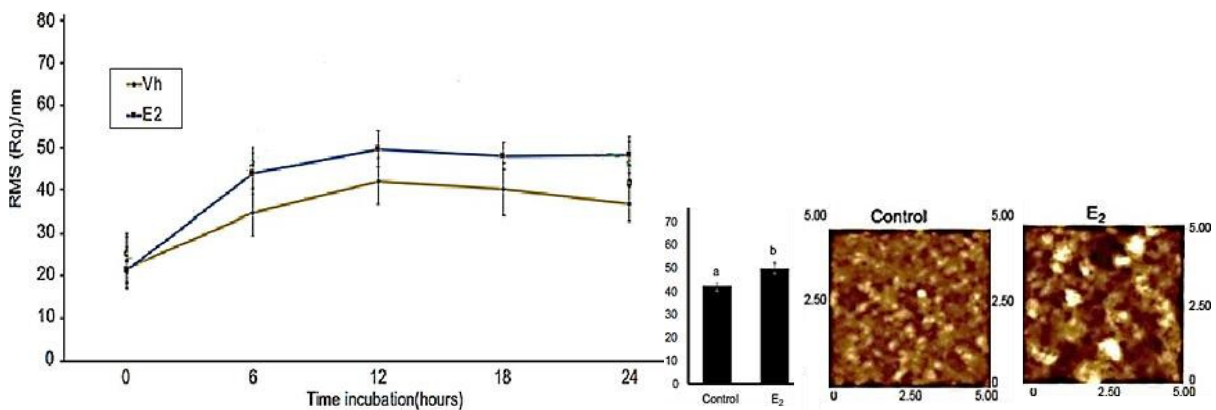


Figura 13. Rugosidad de la superficie de las células MCF-7. El gráfico muestra los valores de rugosidad a las 12 horas de incubación con E_2 en comparación con el grupo de control (células tratadas con etanol). Mientras que, las imágenes representativas de AFM muestran cambios en la rugosidad de la superficie de la membrana celular MCF-7 (Tomado y modificado de Lara-Cruz et al., 2019).

Por su parte, el año pasado Zbiral y colaboradores demostraron que al estimular con estrógenos las células MCF-7 se observaron cambios en la morfología tridimensional, es decir, incremento la rugosidad de la superficie de las células ubicadas en torno a la región nuclear de las células cultivadas en medio DMEM. De tal modo que, en la Figura 14 se puede ver

como la altura y la rugosidad de las células demostraron ser mayores en las células cultivadas en medio CTL HF que en el medio DMEM (Zbiral et al., 2021).

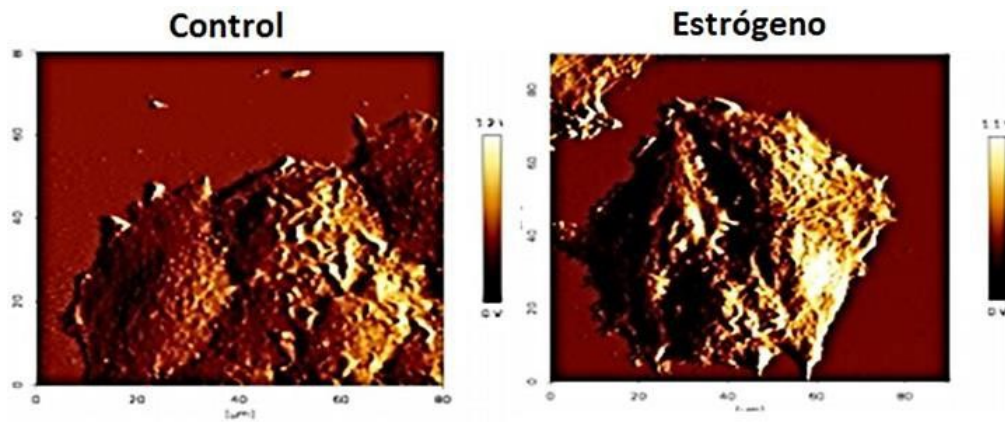


Figura 14. Imágenes de AFM en modo de contacto. Se observan cambios en la morfología tridimensional de las células MCF-7, en donde, parece que la rugosidad de la superficie de las células que rodean la región nuclear aumentó ligeramente cuando se estimularon con estrógenos (Tomado y modificado de Zbiral et al., 2021).

Efecto de los andrógenos en células diferentes a CaM (CMTN); cáncer de próstata (CaP)

Entre el 80-90% de los casos diagnosticados de cáncer de próstata (CaP) son dependientes de andrógenos al momento del diagnóstico inicial; por lo tanto, la primera terapia adoptada es la ablación de andrógenos, es decir, la extirpación de los testículos está dirigida para suprimir o bloquear la producción o la acción de los andrógenos testiculares y la inhibición del AR. Sin embargo, la respuesta del paciente a este tipo de terapia es variable, aproximadamente del 20 al 30% de los pacientes con CaP experimentan progresión aún cuando el nivel de T en sangre es menor a 20 ng/dl. Para este momento, el tumor se vuelve resistente a la castración (CRPCa) (Aurilio et al., 2020).

Como bien sabemos, los andrógenos son los encargados de llevar a cabo la diferenciación y maduración de los órganos sexuales masculinos, al igual que de las características sexuales secundarias masculinas. Alrededor del 90% de los andrógenos son producidos en los testículos por las células de Leydig, se secretan como T y el resto es secretado por la corteza suprarrenal como dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual puede biotransformarse en T en otros tejidos. El 54% de la T circulante se une principalmente a la albúmina, el 44% se une a una globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y entre el 1-2% está libre (So et al., 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, la T puede transformarse en formas más potentes, ya sea en el estrógeno más potente el estradiol por aromatización o en el andrógeno más potente la DHT por medio de la enzima 5 α -reductasa, que se localiza en muchos tejidos diana como la próstata. La T unida a SHBG necesita un receptor de membrana para ingresar a la célula. Una vez en el citoplasma, se mantendrá como T o se biotransformará en DHT por la 5 α -reductasa y preferentemente se unirá con un receptor citoplasmático (AR) o con un receptor nuclear como el receptor de estrógenos (ER) (So et al., 2003).

La principal función fisiológica del AR en la próstata es promover la diferenciación de las células epiteliales luminales y regular la transcripción de genes que codifican proteínas que son requeridas para la función prostática, como el antígeno prostático específico (PSA) (Green et al., 2012). Mientras que, las células epiteliales mamarias luminales internas expresan altos niveles del AR (Bleach y McIlroy 2018).

Se cree que el AR en el CaP regula la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular, la supervivencia y el crecimiento (Green et al., 2012). De igual manera se ha observado que, se conserva la expresión del AR en la mayoría de los CaP y CRPCa independientes de andrógenos, ya que, permanece activa la señalización del AR estimulando la supervivencia y el crecimiento de las células del CaP (Aurilio et al., 2020).

Por otro lado, se sabe que el eje de señalización de andrógenos juega un papel fundamental en el CaP, es decir, las vías genómicas y no genómicas están involucradas en el efecto que los andrógenos ejercen en el CaP. En la vía genómica, el AR es activado mediante la unión de andrógenos, seguido de cambios conformacionales o de la translocación hacia el núcleo del complejo receptor-ligando para reclutar corre reguladores. Una vez que el AR está activado también puede regular a la alza los niveles de expresión de oncogenes mediante el reordenamiento de genes, como con ERG, ETV1, B-RAF y C-RAF. De tal manera que, el AR para formar un complejo puede interactuar con TF-SP1, para posteriormente unirse al promotor p21 y desencadenar el inicio de la transcripción de genes. Para la vía no genómica, el AR activado puede estimular la expresión de cinasas corriente abajo por medio de segundos mensajeros para activar la vía de señalización MAPK/PI3K (Dai et al., 2017; Liu et al., 2020).

Por otra parte se ha reportado que el receptor de andrógenos tiene una estrecha relación con la aparición, el desarrollo, la recurrencia, la metástasis y el pronóstico del CMTN, demostrando que la vía de señalización de AR juega un papel crítico en la aparición y el desarrollo de esta

enfermedad, por lo tanto, al inhibir la vía de señalización del AR podría ser eficaz para su tratamiento (Kong et al., 2020).

Hasta el año 2018 la información recaudada hasta ese momento sugiere que el AR fomenta la proliferación celular en el CaM si el ER se expresa, hecho que se asocia con un peor resultado y un mayor riesgo de recurrencias en el CMTN (Guiu et al., 2018).

La T y la DHT pueden ejercer un efecto estimulante o inhibitor en líneas celulares de CaM dependiendo de la coexpresión de otros receptores de hormonas esteroides y de la presencia o ausencia de fibroblastos del tejido adiposo de la mama (BAF) (Chottanapund et al., 2013). La T es capaz de inducir la proliferación celular en líneas celulares RE-positivas (MCF7 y T47D), pero no MDA-MB-231 que es una línea celular de CMTN, esto en presencia de BAF. Dicho fenómeno se explica por los altos niveles de expresión de la enzima aromatasa, que convierte los andrógenos en estrógenos en los BAF, seguido de la proliferación celular a través del ER (Chavez et al., 2010; Chottanapund et al., 2013). En cambio, la DHT induce la supresión de la proliferación celular en las líneas celulares ER-positivas (MCF7 y T47D), así como en la línea celular ER-negativa (MDA-MB-231) debido a que la DHT no es un sustrato de la aromatasa (Chottanapund et al., 2013). Especialmente en las células MDA-MB-231 la inhibición de la proliferación celular poder ser mediada a través de la vía Akt/Bad/Bax (Cao et al. 2022). En el 2006, Doane y colaboradores observaron que la línea celular ER-negativa (MDA-MB-453) presentaba una respuesta proliferativa a los andrógenos de una manera dependiente del AR e independiente del ER (Doane et al., 2006). Mientras que en el 2014 Cochrane y colaboradores comprobaron que la inhibición de la proliferación esta mediada por la DHT y por el E₂ en líneas celulares de CaM ER-positivas y AR-positivas por efecto de los antiandrógenos (Cochrane et al., 2014).

Aproximadamente el 80% de los cánceres de mama son positivos al AR, esto se asocia con características del tumor más favorables y un mejor pronóstico, incluyendo un incremento en el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global (Nagini, 2017). Sin embargo, otros reportes señalan que la presencia del AR puede ser de peor pronóstico (Antonio et al., 2012; Venema et al., 2019).

Diversos estudios han demostrado que la T y la DHT se expresan en la glándula mamaria, tanto en tejidos normales como en tumorales (Pelletier et al., 2001; Tiefenbacher y Daxenbichler, 2008). En el 2007 Suzuki y col. informaron que en tejidos de mama no tumorales la concentración de DHT es de 97 ± 9 pg/g de tejido, mientras que las concentraciones en el

carcinoma ductal invasivo y en tejidos *in situ* de carcinomas ductales fueron más de 3 veces mayores (319 ± 30 pg/g de tejido). La concentración de los niveles de DHT intratumoral se ha relacionado con una mayor malignidad y desdiferenciación (Suzuki et al., 2007); sin embargo, hay datos contradictorios (Takagi et al., 2010; Wang et al., 2015).

El reporte más relevante ha sido publicado recientemente, donde se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*, observaron que la T y la DHT desempeñan un papel predominantemente inhibitor sobre los efectos mitogénicos y promotores en las células mamarias, así mismo, promueven la apoptosis mediante el AR. Sin embargo, se aclara que pueden existir variaciones en dichos efectos dependiendo el tipo de línea celular, el andrógeno y la dosis administrada (Davis et al., 2019).

Los estudios epidemiológicos que analizan las concentraciones de T en relación con el riesgo de CaM tienen importantes limitaciones, tanto teóricas como metodológicas y no proporcionan un consenso. A pesar de esto, las observaciones clínicas y los datos experimentales apoyan predominantemente el hecho de que los andrógenos son capaces de inhibir el crecimiento mamario, siendo utilizados con éxito en terapias contra el CaM (Nagini, 2017; Smith y Batur, 2020).

Justificación

El CaM es la principal causa de mortalidad oncológica en mujeres mexicanas. En años recientes han aumentado el número de casos de mujeres jóvenes que son diagnosticadas con CMTN, el cual es más agresivo debido a que es más metastásico y hay pocas opciones terapéuticas para atacarlo, debido a la baja o nula expresión de los receptores ER, PR y HER-2. Por esta razón, en el presente trabajo se revisará el efecto de DHT y el AR como actores importantes en el CMTN.

Las terapias disponibles contra el CMTN son poco específicas y con baja efectividad, lo que puede deberse a que las membranas de sus células tienen características diferentes a las de otros tipos de CaM.

Una opción terapéutica contra el CMTN sería utilizar el AR como blanco terapéutico. Ya que, recientemente se ha planteado la opción de utilizar terapia anti-androgénica para detener su proliferación y metástasis; sin embargo, el uso de hormonas y antihormonas puede tener resultados contradictorios, ya que las membranas plasmáticas de las células de CMTN tienen características particulares y están muy modificadas en relación con las células no cancerosas. En el presente trabajo se plantea el estudio de los efectos de la DHT sobre la membrana plasmática de células de CMTN, utilizando como modelo experimental la línea celular MDA-MB-231, derivada de un adenocarcinoma mamario de tipo epitelial, para analizar cambios en la rugosidad, a nivel nanométrico mediante la técnica de AFM. Dado que, el andrógeno DHT podría modular la rugosidad de membrana de células de CMTN, a nivel nanométrico, haciéndolas más permeables.

Estudiar la rugosidad, a nivel nanométrico, de las membranas de células de CMTN, así como el efecto de los andrógenos, como la DHT, sobre los cambios en este parámetro y sobre la migración celular permitirá entender sus características y podrían facilitar el diseño de nuevos fármacos que sean más específicos y eficaces para poder detener la capacidad proliferativa y metastásica del CMTN.

Planteamiento del problema

El CMTN es más común en pacientes mexicanas, en comparación con otros países, y suele tener un índice de mortalidad mayor que los otros tipos de cánceres de mama. La falta de expresión de los receptores de ER, PR y HER-2 reduce el número de terapias dirigidas y, por ende, la supervivencia es menor. Este tipo de cáncer es muy heterogéneo, entre los subtipos que se han descrito hay uno en particular que expresa el AR; sin embargo, hay reportes contradictorios sobre su papel, ya que mientras algunos señalan que es de pronóstico favorable, otros aseguran que es de mal pronóstico.

Los efectos de los andrógenos T y DHT en el CMTN pueden deberse a su capacidad de ingresar a las células y de unirse con el AR. Sin embargo, no hay información sobre el efecto de los andrógenos sobre los cambios en la rugosidad en células de cáncer y menos en el CMTN. Recientemente se reportó que el estradiol es capaz de modificar la rugosidad de las membranas de las células de CaM positivas al ER y permite el ingreso de AuNP de manera más rápida.

Conocer el efecto que pueden tener DHT sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de las células de CMTN, así como en la migración celular, permitirá diseñar mejores tratamientos contra este subtipo altamente letal de cáncer.

Pregunta de investigación

¿Qué efecto tiene el andrógeno DHT sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de CMTN y sobre la migración celular?

Hipótesis

La DHT modifica la rugosidad nanométrica de la membrana plasmática y esto permite que aumente la migración de las células de cáncer de mama triple-negativas MDA-MB-231.

Objetivo general

Analizar el efecto de DHT sobre cambios en la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática, así como de la migración de células de CMTN.

Objetivos particulares

1. Estandarizar el análisis de la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células MDA-MB-231, de CMTN.
2. Estudiar el efecto de la DHT sobre los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231.
3. Estudiar el efecto de la DHT sobre los cambios en la migración de las células MDA-MB-231.

Diseño experimental

Con la finalidad de analizar las células MDA-MB-231 empleando el AFM, se retomaron las líneas celulares de CaM (Téllez-Plancarte, 2019).

Las células MDA-MB-231 fueron incubadas con diferentes concentraciones de 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 1 nM [1×10^{-9} M; concentración fisiológica], 100 nM [1×10^{-7} M; concentración farmacológica]) durante 24 horas. La 5 α -DHT se disolvió en etanol, por lo que el testigo (vehículo) fue etanol al 0.01% en medio de cultivo DMEM.

Se analizaron los parámetros de rugosidad a nivel nanométrico, a través de los parámetros $RMS_{[Rq]}$, Ra y Rmax utilizando AFM en modo “*tapping*” y oscilante.

Las células fueron cultivadas hasta la confluencia de 70% para que no hubiera formación de monocapas y se pudieran realizar las determinaciones en células individuales. Esto es debido a que los parámetros de las células en monocapa cambian en relación con las células individuales. Dado que ya se han realizado estudios con otras líneas celulares de CaM, se pretende comparar estos resultados en células individuales.

El análisis de la rugosidad se realizó en la región que se encuentra entre el borde y la elevación debido a la presencia del núcleo (denominada zona I) ya que es la región más homogénea, tratando de evitar la región donde se encuentra el núcleo (N) que, debido a la gran altitud, la punta del AFM se dobla tanto que las medidas son poco confiables, así como las zonas cercanas al borde (E) de las células debido a que se corre el riesgo de analizar el sustrato y no la membrana plasmática (Figura 15). Se realizó el análisis de áreas de $7 \times 7 \mu\text{m}$ ($7 \mu\text{m}^2$) de 6 zonas diferentes por cada una de las 4 células.

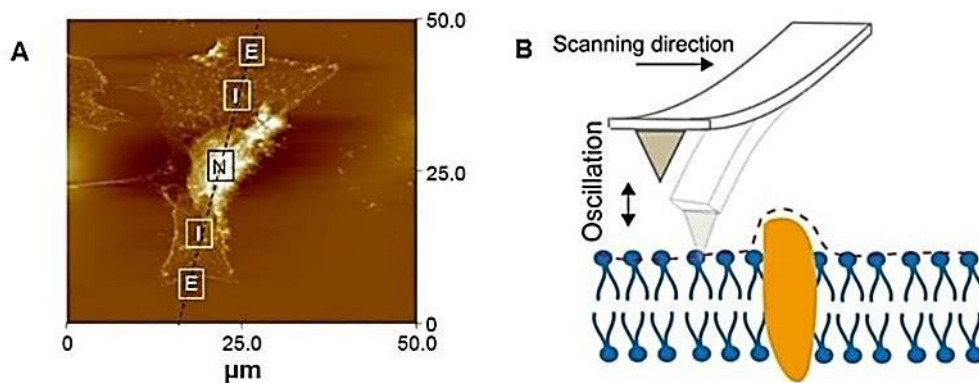


Figura 15. A) Imagen de una célula MCF-7 obtenida mediante AFM y B) representación esquemática del análisis mediante AFM en modo “tapping” y oscilante. En la figura izquierda se observan las zonas que se medirán en las células y las que se evitarán. Las lecturas se harán en la región I, que se encuentra entre el núcleo (N) y el borde (E) con el sustrato de oro. Las zonas más claras representan mayor altura. Imagen obtenida de Lara-Cruz y colaboradores (Tomado y modificado de Lara-Cruz et al., 2016). En el esquema derecho se observa que la sonda se mueve sobre la superficie de la célula en forma ondulatoria “en saltos” o modo “tapping”. En este modo, a diferencia del modo contacto, la punta (probe) del AFM no entra en contacto con la superficie de la membrana celular en algún momento (Tomado y modificado de Deng et al., 2018).

Material y Métodos

Cultivo celular

Se sembraron 150,000 células en cajas Petri de 35 x 15 mm, de las líneas celulares MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231. Para el cultivo se utilizó medio DMEM, que contenía suero fetal de bovino (FBS) al 5 % sin rojo fenol, tratado con carbón-dextrán (BFSC) (para remover la fracción de hormonas esteroides contenidas en el FBS y observar solo el efecto que provoca la DHT en estas células), L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (100 mM), piruvato de sodio (100 mM), ciprofloxacino (100 mg/mL) y antimicótico anfotericina B (250 ng/ml). Las células se dejaron crecer hasta generar una monocapa. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. En todos los experimentos para el análisis mediante AFM las células se cultivaron en baja confluencia.

Ensayo de cierre de la herida (*Wound healing assay*)

Los cultivos de células MDA-MB-231 se realizaron sobre placas específicamente usadas para AFM (1 cm²) que contienen una superficie cristalina de oro [Au(111)] ultraslisa y que se encuentran es una placa de vidrio de una sola capa de 2 mm. Las placas fueron previamente esterilizadas por autoclave durante 20 minutos a 15 lb de presión (120° C). Las placas se

mantuvieron en placas de cultivo de 6 pozos, donde se les pusieron los tratamientos diluidos en el medio de cultivo DMEM con SFB-C/D. Una vez terminadas las 48h con las diferentes concentraciones de 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 1 nM o 100 nM), las células adheridas a las placas fueron fijadas mediante un tren de deshidratación en etanol absoluto (99.9%) grado reactivo (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 96%, 2 minutos en cada uno), se colocaron dentro de la campana durante 30 minutos, para lograr que las células estuvieran totalmente secas y fueron almacenadas a temperatura ambiente, hasta su análisis. Con la finalidad de colocar las placas para el análisis por AFM, se seleccionaron células individuales con morfología elongada en el microscopio óptico acoplado al AFM.

Las células MDA-MB-231 se crecieron en monocapa en alta confluencia y se realizaron dos heridas, en forma perpendicular, utilizando una punta de 10 μ L, lo que generó un área libre de células en la monocapa y las cajas se lavaron con PBS al 1% para retirar las células desprendidas generadas por las heridas (Figura 16). Posteriormente, las células se incubaron con los siguientes tratamientos: Vehículo (Vh; EtOH al 0.01% en medio DMEM), 5 α -DHT; 1 nM [1×10^{-9} M] y 5 α -DHT; 100 nM [1×10^{-7} M]. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Se tomaron 6 fotos de cada uno de los tratamientos en el tiempo inicial 0h (momento en que se realiza la herida), y en los tiempos 24, 48 y 72h. Se utilizó un microscopio óptico digital para obtener las imágenes. Para determinar el área no cubierta de la herida en los diferentes tiempos, cada una de las imágenes se procesaron en el software MImageView (VELABTM).

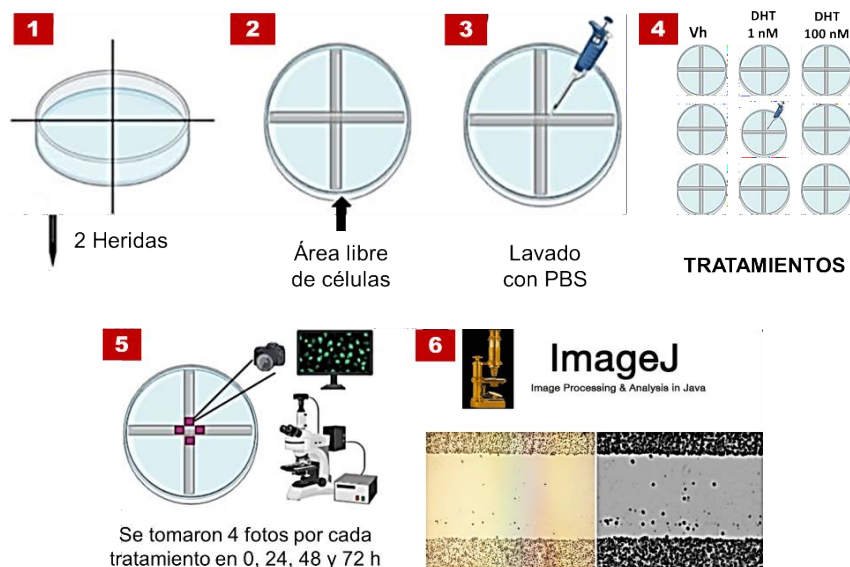


Figura 16. Ensayos de cierre de la herida. 1) Se realizan dos heridas en la monocapa celular; una en dirección horizontal y la otra en dirección vertical. 2) La herida genera un área libre de

células en la monocapa. **3)** Se realiza un lavado con PBS al 1% para retirar los restos celulares. **4)** Las células MDA-MB-231 se incubaron con los diferentes tratamientos; Vehículo (Vh; EtOH al 0.01% en medio DMEM), DHT; 1 nM [1×10^{-9} M] y DHT; 100 nM [1×10^{-7} M] en los tiempos 0, 24, 48 y 72h. **5)** Se tomaron 6 fotos por cada tratamiento en los tiempos 0, 24, 48 y 72h. **6)** Cada una de las imágenes fueron procesadas en el software MIImageView (VELAB™) para determinar el área no cubierta de la herida en los diferentes tiempos.

Obtención y análisis de imágenes previamente obtenidas

Debido a la pandemia del Covid-19, se utilizaron imágenes obtenidas con anterioridad de otras líneas celulares de CaM (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231), ya que, por el tiempo que duro la cuarentena en nuestro país no se podía acceder a los laboratorios de investigación para llevar a cabo los experimentos de manera presencial, como parte de un estudio previo comparativo (Téllez-Plancarte et al., 2018). Los análisis de las imágenes se realizaron con el programa del AFM-NanoScope III software (Veeco Inc.).

Todas las imágenes AFM se caracterizaron a temperatura ambiente, en el modo “*tapping*” con un NanoScope IIIa (Veeco Instruments, Santa Bárbara, CA, EE.UU.).

Las sondas de silicio dopado con antimonio (n) tenían una frecuencia de resonancia media de 317-382 kHz con una constante de resorte de 20-80 N/nm que se usaron a una velocidad de escaneo de 0.4-0.7 Hz. El valor de amplitud de la punta (*cantilever*) se mantuvo constante aproximadamente 3000 mV con un voltaje fijo de 1.5 V. Las imágenes de AFM fueron obtenidas manualmente con un tiempo medio de 45 minutos por muestra; los modos de adquisición fueron altura y fase, sus análisis se realizaron a través del software AFM NanoScope IIIa. Cada célula fue examinada en seis lugares diferentes a lo largo de la región citoplasmática (I), que se encuentra entre el núcleo (N) y el borde (E) sobre el sustrato de oro Au(111) en dos series diferentes de muestras (Téllez-Plancarte, 2019 [Tesis de Doctorado]; Téllez-Plancarte et al., 2018).

Se determinaron los parámetros de altura, R_a , R_{max} , $RMS_{[Rq]}$, para lo cual se analizó una superficie de $7 \times 7 \mu m$, en diferentes lugares de la membrana entre el núcleo y el borde. Se tomaron 6 cuantificaciones de cada célula, se calculó el promedio y la desviación estándar a partir de las 6 diferentes mediciones.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, donde las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p sean menores a 0.05. Se utilizó el programa SPSS (IBM SPSS Statistics, USA) para realizar el análisis estadístico.

Análisis de la rugosidad mediante AFM

El estudio mediante AFM se realizó siguiendo el método descrito por Lara-Cruz y colaboradores (Lara-Cruz et al., 2016, 2019) utilizando el modo “*tapping*” en el AFM NanoScope IIIa (Figura 15), utilizando sondas estándar, con una frecuencia de resonancia de 256 kHz y 365 kHz, así como una constante de muelle de 20–80 pN/nm. La captura de imágenes se ajustó manualmente de manera constante con la finalidad de obtener la señal óptima y la resolución apropiada. Los valores de amplitud del *cantilever* permanecieron a ~1,500 mV y 1.3 V. La velocidad de escaneo fue constante entre 0.3 Hz y 0.9 Hz en la interfaz de aire.

Todos los experimentos se realizaron en una superficie de 1 x 1 μm y de 0.7 x 0.7 μm y se tomarán 2 diferentes áreas de cada una de las 3 células estudiadas. Se realizaron los análisis mediante el AFM en diferentes modos de adquisición: altura, fase y amplitud. El tiempo promedio para obtener cada imagen de una región varía de 40 a 60 minutos. Los análisis de las imágenes se realizaron con el programa del AFM-NanoScope III software (Veeco Inc.), determinando los parámetros de rugosidad mediante el cálculo de $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativa cuando los valores de p fueron menores a 0.05.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de un análisis *post hoc* de Tukey.

Se utilizó el programa SPSS (IBM SPSS Statistics, USA) para realizar el análisis estadístico.

Características de las líneas celulares estudiadas

A continuación, en la Tabla 1 se describen algunas de las características más importantes de las líneas celulares que se tomaron en cuenta para el presente estudio.

Línea celular de CaM	Subtipo	Características	Expresión de receptores	Expresión de Ki-67
SKBR3	HER-2 (+)	Poco agresiva, no invasiva con potencial metastásico bajo.	ER-/PR-/HER2++ AR++	Baja
MDA-MB-231	CMTN	Muy agresiva, invasiva y poco diferenciada.	ER-/PR-/HER2- AR+	Alta
MCF-7	Luminal B	Poco agresiva, no invasiva con potencial metastásico bajo.	ER+/PR+/HER2+/- AR++	Alta
T47D	Luminal A	Poco agresiva, no invasiva con potencial metastásico bajo.	ER+/PR+/HER2+/- AR++	Muy alta

Tabla 1. Características relevantes de las cuatro líneas celulares de CaM analizadas en el presente proyecto. Se puede observar de cada una de las líneas celulares de CaM (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231) a que subtipo pertenecen, sus características más relevantes, su expresión de ER, PR, HER2, AR, así como, de Ki-67 como marcador de proliferación. En color rojo se resalta la expresión del AR que es parte medular del presente trabajo (Cailleau et al., 1978; Comşa et al., 2015; Giovannelli et al., 2019; Goicoechea et al., 2009; Keydar et al., 1979; Liu et al., 2019; Mota et al., 2017; Prat et al., 2010).

Resultados

Estandarización del análisis de la rugosidad de membrana

Las imágenes de AFM que se presentan a continuación fueron procesadas con base en los análisis de las células de las líneas celulares SKBR3, MDA-MB-231, MCF-7 y T47D que se tenían previamente.

Con la finalidad de observar la morfología bidimensional y tridimensional de cada una de las líneas celulares de carcinoma mamario, se procedió a tomar imágenes de 40 x 40 μm y de 7 x 7 μm , mediante AFM.

Como se mencionó anteriormente, una imagen de AFM posee tres ejes x, y, z, estando cubierta por 512 puntos formando así la imagen tridimensional (512 puntos x 512 puntos x 512 puntos) dando como resultado una resolución espacial de 134, 217, 728 pixeles (Band, 1989). Por lo tanto, al escanear un área pequeña se logra una mejor resolución. Por ejemplo, el tamaño de la imagen original es de 40 μm (40,000 nm), se tiene una resolución de 78.125 nm/píxel, es decir, 78.125 nm. En este caso, el tamaño de nuestras imágenes es de 7 μm (7,000 nm), la distancia entre dos pixeles es de 13.67 nm, es decir, la resolución se puede mejorar 5.71 veces.

La primera línea celular que se analizó fue SKBR3, la imagen de la Figura 17A muestra la morfología bidimensional de una célula SKBR3. En la parte superior derecha se observa la barra de escala que indica la altura ($Z = 4000.0 \text{ nm}$), donde las regiones más brillantes corresponden con áreas más altas y las regiones más oscuras corresponden con áreas de celdas más profundas. Área de escaneo de $40 \times 40 \mu\text{m}$. En la parte inferior derecha de la figura B se muestra el valor de la altura ($Z = 6000.000 \text{ nm/div}$), área de escaneo de $40 \times 40 \mu\text{m}$. La célula SKBR3 presenta una forma circular, sin proyecciones celulares, su tamaño es menor al área de escaneo. La célula se observa con mayor detalle en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional muestra las áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro) y con mayor altura (zonas café claro).

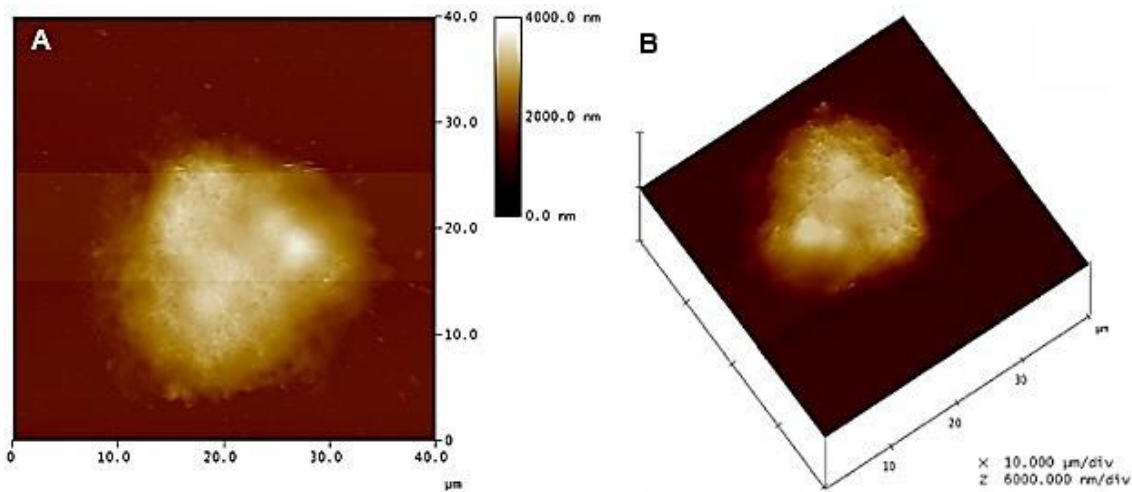


Figura 17. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de $40 \times 40 \mu\text{m}$ (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM, México).

A continuación, en la Figura 18A, podemos observar un área de escaneo de $7 \times 7 \mu\text{m}$, $Z = 500.000 \text{ nm/div}$ de una célula SKBR3. Los cambios más notables se observan en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional que muestra ciertas subestructuras en forma de relieve (zonas café claro) y áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro).

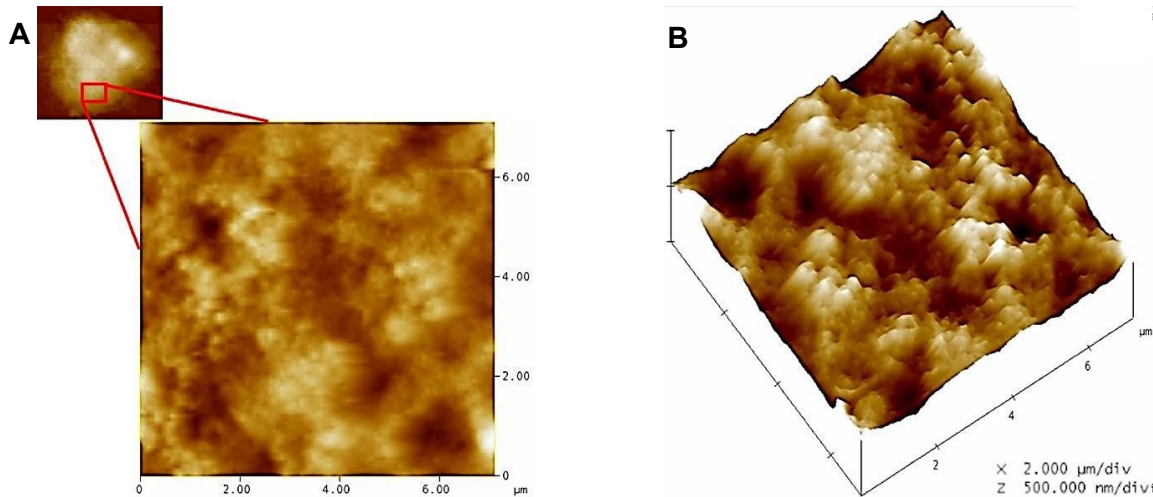


Figura 18. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 7 x 7 μm, Z= 500.000 nm/div (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

La segunda línea celular que se analizó fue MDA-MB-231, la imagen de la Figura 19A muestra la morfología bidimensional de una célula MDA-MB-231, se le colocó el fondo de color negro a través del programa del AFM-NanoScope III, para que resaltara más a diferencia de las demás líneas celulares. Dicha modificación no afecta en nada la resolución de la imagen, ni los valores calculados. La célula se observa con mayor detalle en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional muestra las áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro) y con mayor altura (zonas café claro). La célula MDA-MB-231 presenta una forma semejante a la de una estrella, tiene proyecciones celulares, su tamaño es mayor al área de escaneo.

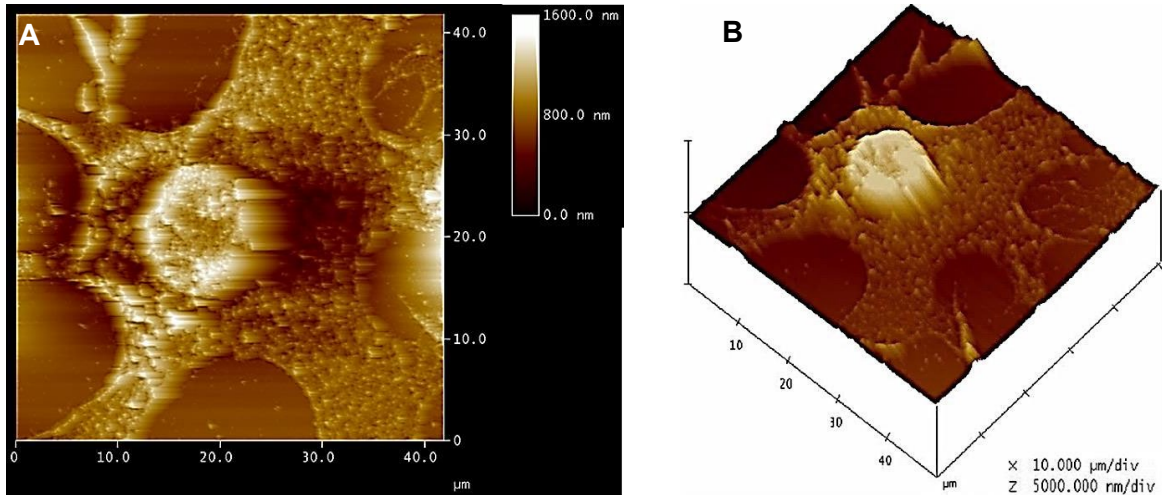


Figura 19. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 40 x 40 μm, Z = 1600.0 nm y Z = 5000.000 nm/div, respectivamente (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

En la Figura 20A, podemos observar un área de escaneo de 7 x 7 μm, Z= 1000.000 nm/div de una célula MDA-MB-231. Los cambios más notables se observan en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional que muestra ciertas subestructuras en forma de relieves (zonas café claro) y áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro).

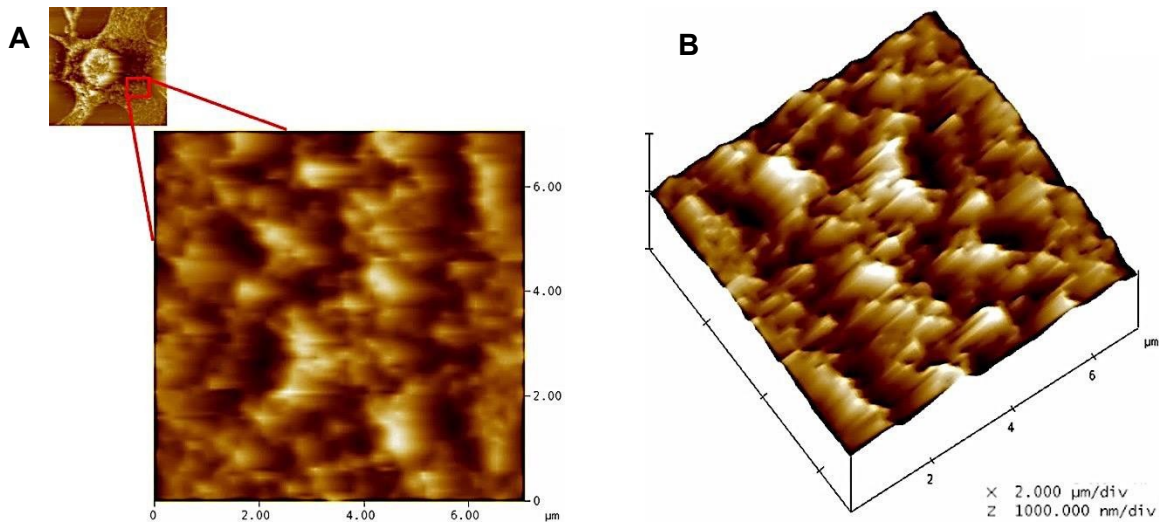


Figura 20. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 7 x 7 μm, Z= 1000.000 nm/div (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

La tercera línea celular que se analizó fue MCF-7, la imagen de la Figura 21A muestra la morfología bidimensional de una célula MCF-7, está presenta una forma semi-circular

alargada, sin proyecciones celulares, su tamaño es menor al área de escaneo. La célula se observa con mayor detalle en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional muestra las áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro) y con mayor altura (zonas café claro).

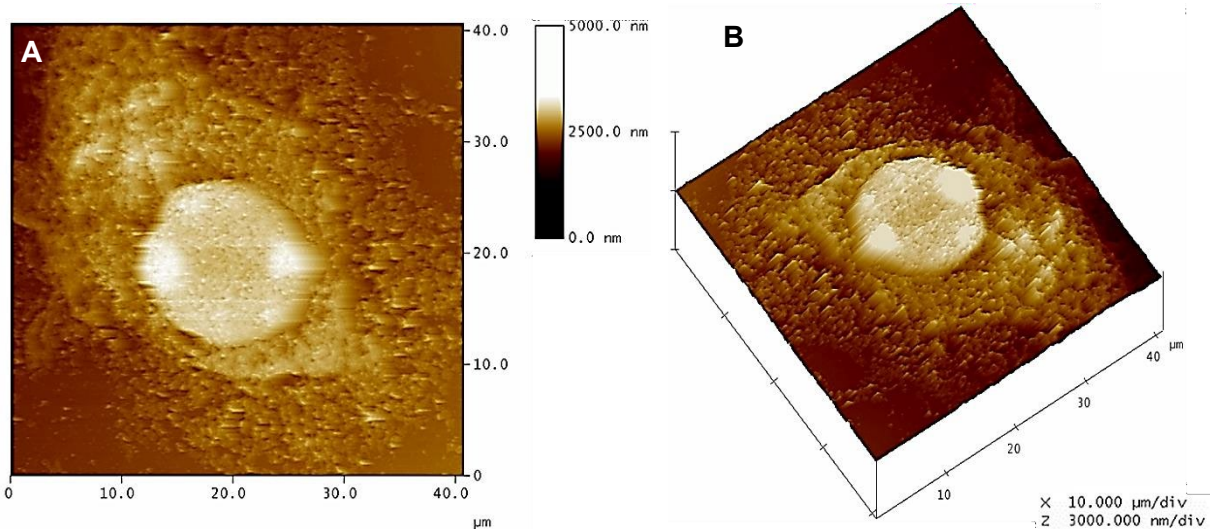


Figura 21. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 40 x 40 μm , Z = 5000.0 nm y Z = 3000.000 nm/div, respectivamente (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

A continuación, en la Figura 22A, podemos observar un área de escaneo de 7 x 7 μm , Z= 500.000 nm/div de una célula MCF-7. Los cambios más notables se observan en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional que muestra ciertas subestructuras con relieves (zonas café claro) y áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro).

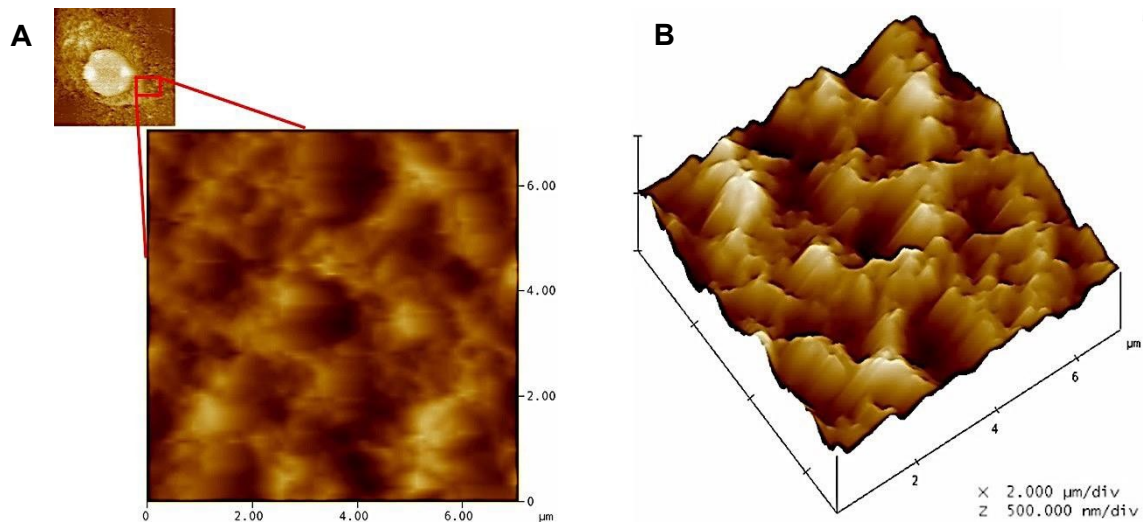


Figura 22. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 7 x 7 μm , Z= 500.000 nm/div (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

La última línea celular que se analizó fue T47D, la imagen de la Figura 23A muestra la morfología bidimensional de una célula T47D, está presenta una forma circular, con proyecciones celulares poco perceptibles, su tamaño es menor al área de escaneo. La célula se observa con mayor detalle en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional muestra las áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro) y con mayor altura (zonas café claro).

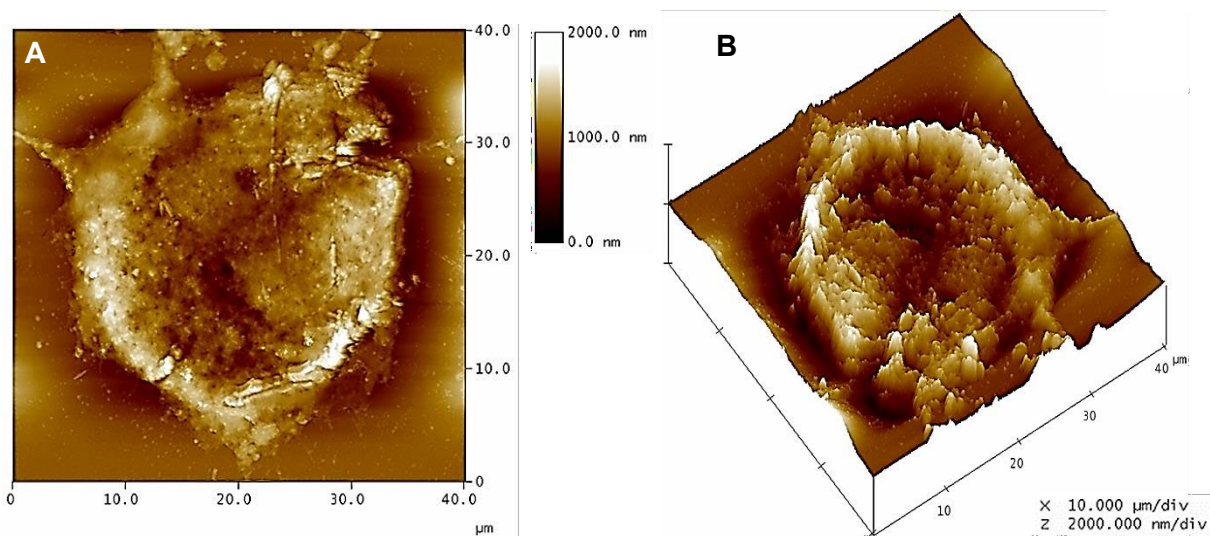


Figura 23. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de 40 x 40 μm , Z = 2000.0 nm y Z = 2000.000 nm/div, respectivamente (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

En la Figura 24A, podemos observar un área de escaneo de $7 \times 7 \mu\text{m}$, $Z = 500.000 \text{ nm/div}$ de una célula T47D. Los cambios más notables se observan en la figura B donde la imagen corresponde con la morfología tridimensional que muestra ciertas subestructuras con relieves (zonas café claro) y áreas con una mayor profundidad (zonas café oscuro).

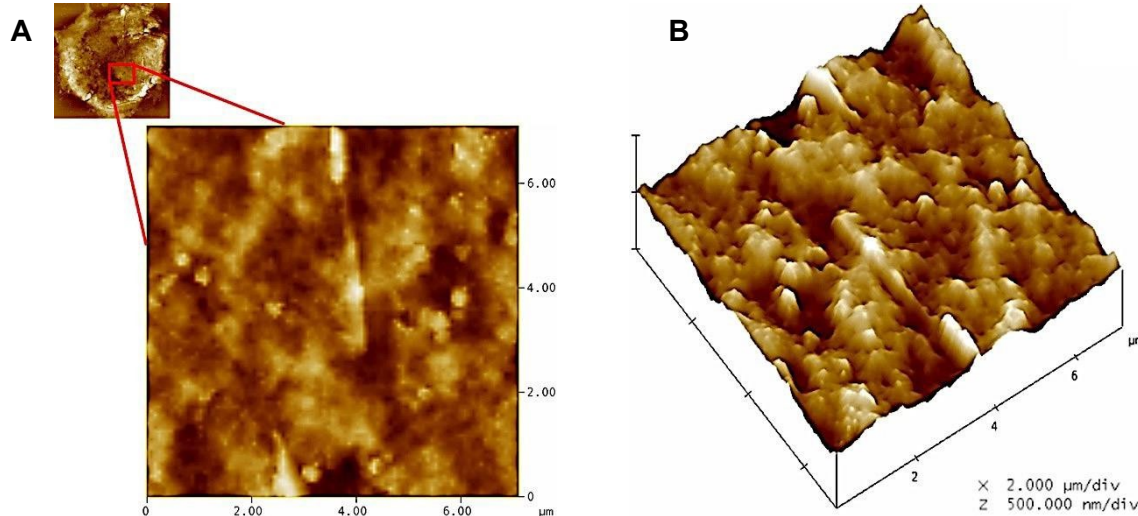


Figura 24. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) en la región citoplasmática de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111). Área de escaneo de $7 \times 7 \mu\text{m}$, $Z = 500.000 \text{ nm/div}$ (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM).

Con la finalidad de analizar las células MDA-MB-231 empleando el AFM, se retomaron imágenes previamente capturadas como parte de un estudio previo comparativo de líneas celulares de CaM (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231) (Téllez-Plancarte, 2019).

A diferencia del estudio de Téllez-Plancarte (Téllez-Plancarte, 2019), se examinó una célula, tomando seis lecturas en diferentes lugares a lo largo de la región citoplasmática (I), que se encuentra entre el núcleo (N) y el borde (E) con el sustrato de oro [Au(111)]. Se obtuvieron los parámetros de altura, R_a , R_{max} , $RMS_{[Rq]}$, analizando una superficie de $7 \mu\text{m}^2$ en función de la superficie original de $40 \mu\text{m}^2$. Se calculó el promedio y la desviación estándar a partir de las seis diferentes mediciones. Por medio de, la prueba de ANOVA, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05.

Por otra parte, al hacer un análisis visual de las imágenes de AFM se puede observar que las figuras 17-18 (SKBR3), 19-20 (MDA-MB-231), 21-22 (MCF-7), 23-24 (T47D) muestran la superficie de la membrana plasmática en 2D y 3D, respectivamente. Los resultados de este análisis demostraron cambios morfológicos (forma, presencia o ausencia de proyecciones

celulares, tamaño) en las células adheridas sobre un sustrato ultraplano Au(111), además, de cambios en la rugosidad de sus membranas plasmáticas la cual se modificó notablemente, en las líneas celulares MCF7 y T47D, de manera estadísticamente significativa por lo que se puede establecer que si existen diferencias significativas entre la rugosidad de las cuatro líneas celulares de CaM.

Determinación mediante AFM para calcular la altura

Para poder calcular cuantitativamente la altura de cada una de las células en las 4 líneas celulares de carcinoma mamario (T47D, MCF-7, SKBR3 y MDA-MB-231), se realizaron análisis por sección colocando tres pares de puntas de flecha (roja, verde, negra o blanca) en las regiones de interés, utilizando el AFM.

Para la determinación de la altura se calculó la distancia vertical en seis lugares diferentes a lo largo de la región citoplasmática, con la ayuda de pares de puntas de flecha como se muestra en la Figura 25. Se calculó el promedio y la desviación estándar a partir de las seis diferentes mediciones. Por medio de, la prueba de Kruskal-Wallis, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05. Mientras que, para la determinación de la rugosidad de la membrana plasmática se calcularon tres factores de rugosidad R_a , R_{max} y $RMS_{[Rq]}$, tomando las bases de un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Lara-Cruz et al., 2016). Ambas determinaciones se realizaron para las cuatro líneas celulares de CaM. Cada par de punta de flecha representa una región de interés (Ejemplo T47D; rojo: sustrato - núcleo, verde: citoplasma - citoplasma, negro: núcleo - citoplasma), en el recuadro rojo se resaltan las puntas de flecha que corresponden a la región citoplasmática.

Como se puede observar en las figuras 25 en la columna de la izquierda A, C, E, G se observa la gráfica del perfil del análisis topográfico, en el recuadro rojo se resalta el par de puntas de flechas que corresponden a la región citoplasmática. En la columna de la derecha en las figuras B, D, F, H se puede observar la morfología tridimensional con los tres pares de punta de flecha, a la derecha se observan los valores que se obtienen a través del software AFM NanoScope IIIa para cada par de flecha, en el recuadro rojo se resalta el valor cuantitativo de la altura para la región citoplasmática. A las figuras G, H se les colocó el fondo de color negro a través del programa del AFM-NanoScope III, para que resaltaran más a diferencia de las demás líneas celulares. Dicha modificación no afecta en nada la resolución de la imagen, ni los valores calculados.

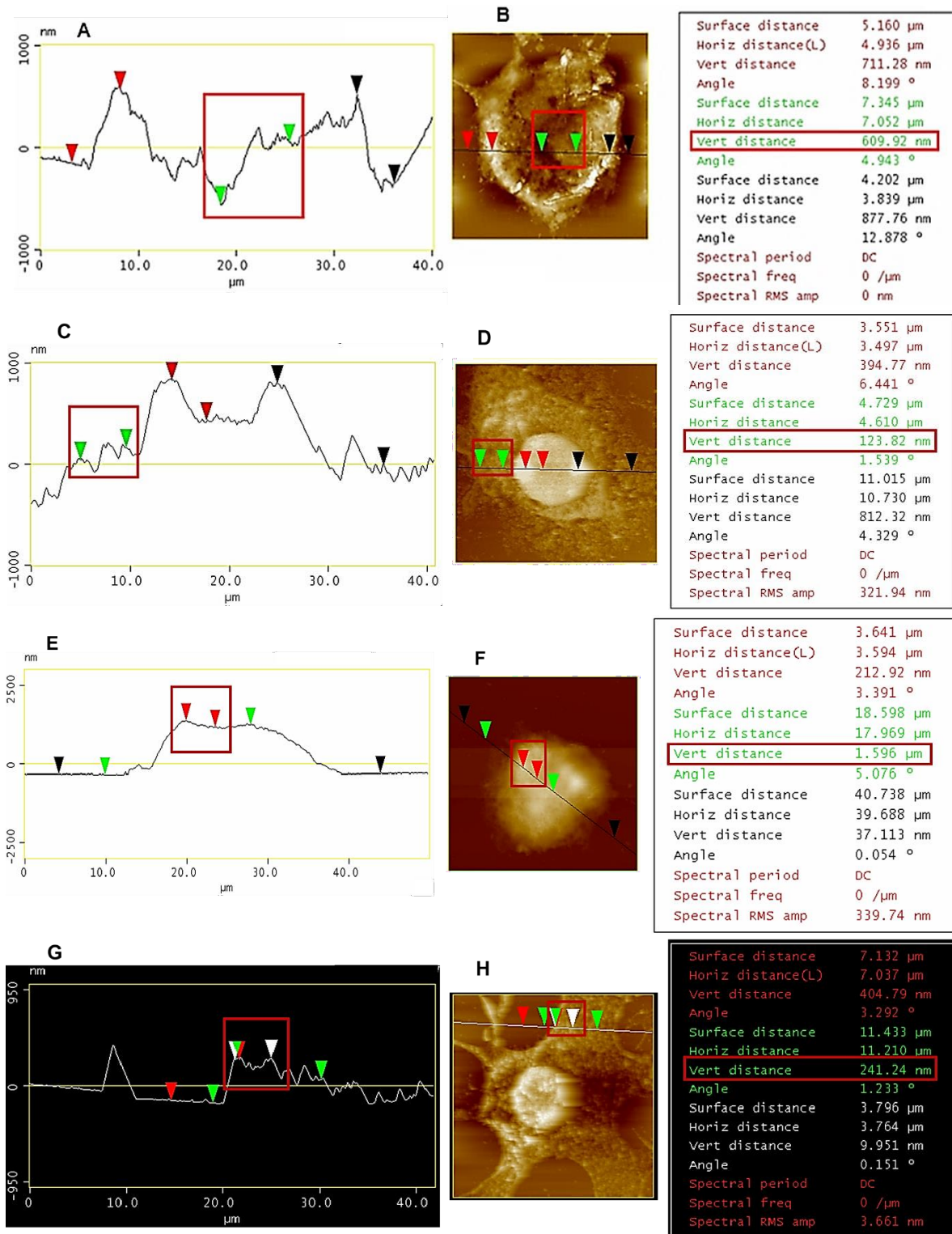
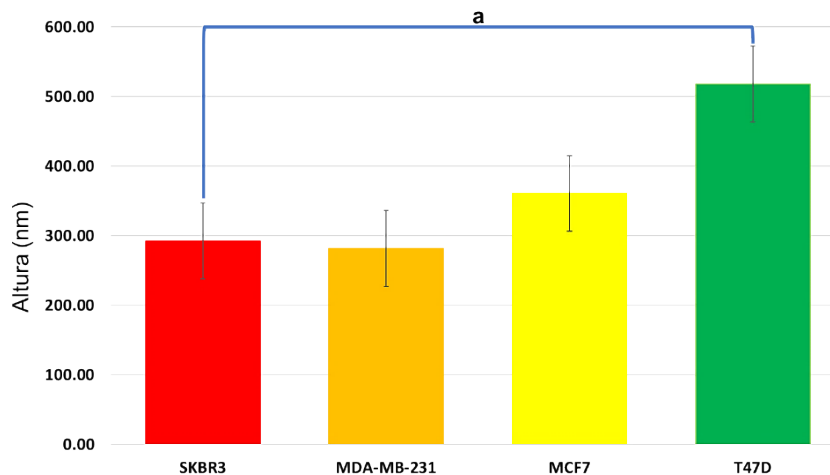


Figura 25. Análisis topográfico y por AFM de un área de escaneo de 40 x 40 μm de una célula T47D (A, B), MCF-7 (C, D), SKBR3 (E, F), MDA-MB-231 (G, H) adheridas sobre un sustrato Au(111).

Análisis de la altura por AFM de las 4 líneas celulares de CaM

Como se mencionó anteriormente se requiere el parámetro de altura para caracterizar la topografía de la superficie, por lo cual, se calculó mediante AFM el valor de la altura en seis diferentes lugares a lo largo del citoplasma de cada célula (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231).

Como se muestra en la Gráfica 1 los resultados demostraron diferencias estadísticas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D, esto quiere decir que, la línea celular SKBR3 presenta una menor altura respecto a T47D.

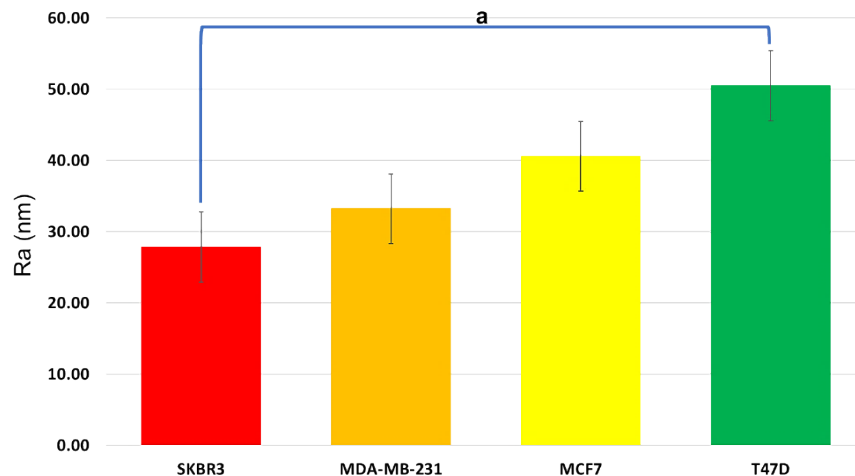


Gráfica 1. Análisis de la altura por AFM a lo largo del citoplasma de las 4 líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111). Se graficó el promedio de la altura de seis mediciones por cada célula. Los valores son expresados como la media \pm DE de seis mediciones independientes. La “a” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

Determinación de la rugosidad de las membranas de las 4 líneas celulares de CaM

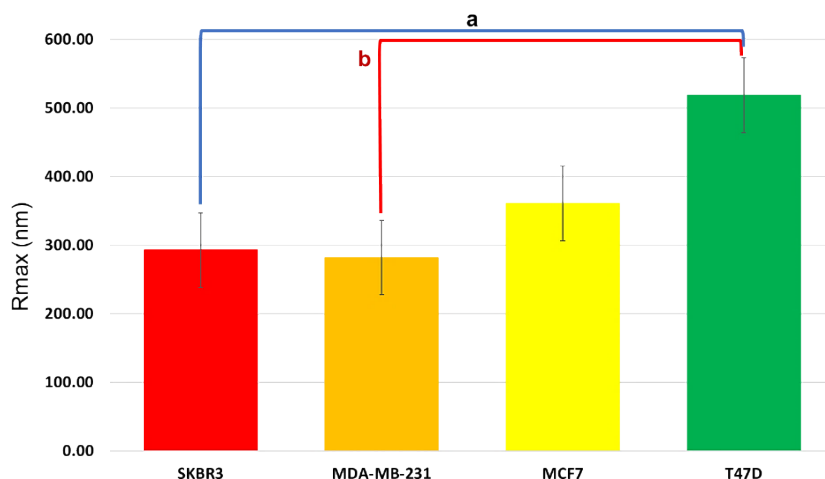
Debido a que, la altura no es sensible a ligeros cambios en las longitudes de onda, posteriormente, se analizaron de igual manera por AFM, las variaciones de la rugosidad en diferentes regiones de la membrana plasmática de las cuatro líneas celulares de CaM, mencionadas anteriormente.

En primer lugar, se calculó el parámetro Ra (Rugosidad media aritmética) que es el más utilizado en todo el mundo al ser un parámetro sencillo. Como se muestra en la Gráfica 2 los resultados demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Esto coincide con lo que podemos observar en la Gráfica 1 donde se muestra el análisis de la altura, lo cual se podría deber a que Ra no hace distinción entre picos y valles.



Gráfica 2. Análisis de la rugosidad (mediante el factor Ra) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111). Se graficó el promedio de la rugosidad de seis mediciones por cada célula. Los valores son expresados como: media \pm DE de seis mediciones independientes. La “a” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

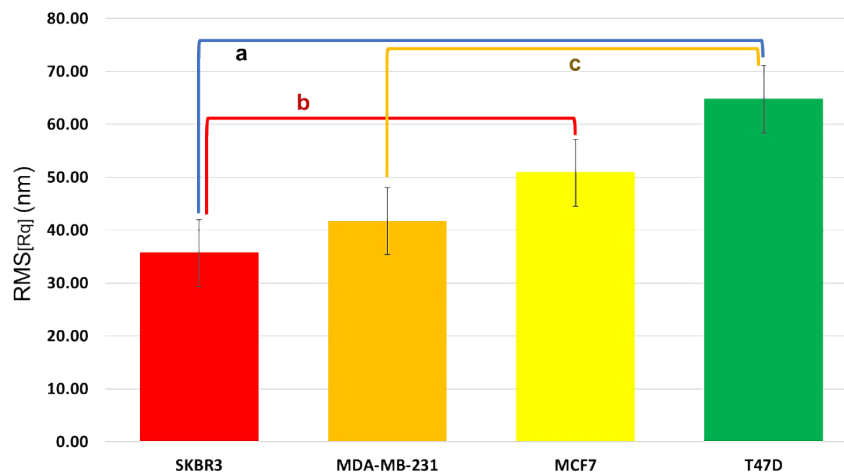
A continuación, se procedió a calcular Rmax, debido a que, brinda información complementaria sobre Ra. En la Gráfica 3 podemos ver que hay diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D (a) así como también entre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D (b), es decir, la membrana plasmática de SKBR3 y MDA-MB-231 son poco rugosas, por el contrario, T47D presenta mucha rugosidad en su membrana.



Gráfica 3. Análisis de la rugosidad (mediante el factor Rmax) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111). Se graficó el promedio de la rugosidad de seis mediciones por cada célula. Los valores son expresados como: media \pm DE de seis mediciones independientes. La “a” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Mientras que,

la “b” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

Por último, se calculó $RMS_{[Rq]}$ (Rugosidad media de la raíz cuadrada), este parámetro se caracteriza por tener mayor precisión y permite que se obtenga una mejor caracterización de la rugosidad. En la Gráfica 4 se observan diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D (a), SKBR3 y MCF-7 (b). Finalmente, también se observaron diferencias significativas entre las líneas MDA-MB-231 y T47D (c).



Gráfica 4. Análisis de la rugosidad (mediante el factor $RMS_{[Rq]}$) por AFM a lo largo del citoplasma de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un sustrato Au(111). Se graficó el promedio de la rugosidad de seis mediciones por cada célula. Los valores son expresados como: media \pm DE de seis mediciones independientes. La “a” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Mientras que, la “b” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares SKBR3 y MCF-7. Finalmente, la “c” representa diferencias estadísticas con $p < 0.05$, entre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

El resultado del análisis cuantitativo de la rugosidad superficial de las diferentes líneas celulares usadas en el presente estudio se muestra en la Tabla 2. Como podemos ver el valor obtenido del análisis cuantitativo de la rugosidad se ordena de menor a mayor, primeramente SKBR3 ($Ra = 27.86 \pm 5.07$, $Rmax = 292.54 \pm 44.61$, $RMS_{[Rq]} = 35.67 \pm 6.39$), seguida de MDA-MB-231 ($Ra = 33.21 \pm 4.98$, $Rmax = 281.65 \pm 29.74$, $RMS_{[Rq]} = 41.71 \pm 6.14$) y MCF-7 ($Ra = 40.58 \pm 2.98$, $Rmax = 360.59 \pm 39.47$, $RMS_{[Rq]} = 50.88 \pm 3.52$), finalmente, T47D ($Ra = 50.47 \pm 5.51$, $Rmax = 518.25 \pm 69.93$, $RMS_{[Rq]} = 64.74 \pm 7.10$). Esto quiere decir que, T47D es la que presenta mayor rugosidad en comparación con SKBR3, la cual presenta menos rugosidad.

Línea celular de CaM	RMS _[Rq] (nm)	Ra (nm)	Rmax (nm)
SK-BR3	35.67 ± 6.39	27.86 ± 5.07	292.54 ± 44.61
MDA-MB-231	41.71 ± 6.14	33.21 ± 4.98	281.65 ± 29.74
* MCF-7	50.88 ± 3.52	40.58 ± 2.98	360.59 ± 39.47
* T47D	64.74 ± 7.10	50.47 ± 5.51	518.25 ± 69.93

Tabla 2. Mediciones de la rugosidad superficial por AFM a lo largo del citoplasma de células de carcinoma de mama. Para la determinación de la rugosidad de la membrana plasmática se calculó el promedio de tres factores de rugosidad: Ra, Rmax y RMS_[Rq], a partir de seis mediciones por cada célula. La rugosidad es significativamente mayor ($p < 0.05$) en las líneas celulares T47D y MCF-7 en comparación con MDA-MB-231 y SKBR3, es decir, T47D es la más rugosa en comparación con SKBR3 que es la menos rugosa. Los valores son expresados como: media ± DE de seis mediciones independientes.

Al asociar la rugosidad de la membrana plasmática con las características de las líneas celulares de CaM, como se muestra en la Tabla 3, las líneas celulares T47D (ER+/PR+/HER2-/AR++) y MCF-7 (ER+/PR+/HER2-/AR++), tienen la misma expresión de receptores. Sin embargo, con respecto al marcador de proliferación Ki-67, la línea celular T47D mostró una muy alta expresión, en cambio, MCF-7 tiene una alta expresión de dicho marcador de proliferación, al igual que MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-/AR+), por el contrario, SKBR3 (ER-/PR-/HER2+/AR++) presenta una baja expresión de Ki-67. Por otro lado, la línea celular SKBR3 si expresa HER2, pero MDA-MB-231 no lo expresa. Por otra parte, el aumento en la rugosidad de la membrana plasmática observado fue en el siguiente orden: T47D > MCF-7 > MDA-MB-231 > SK-BR3. Por lo que nuestros resultados sugieren que la expresión de Ki-67 podría ser proporcional con la rugosidad superficial. De igual forma, la expresión positiva del ER estaría relacionada con una mayor rugosidad, como se ha demostrado anteriormente (Lara-Cruz et al., 2019).

Línea celular de CaM	Expresión de receptores	Expresión de Ki-67/ Proliferación	RMS _[Rq] (nm)	Ra (nm)	Rmax (nm)
SKBR3	ER-/PR-/HER2++ AR++	Baja	35.67 ± 6.39	27.86 ± 5.07	292.54 ± 44.61
MDA-MB-231	ER-/PR-/HER2- AR+	Alta	41.71 ± 6.14	33.21 ± 4.98	281.65 ± 29.74
* MCF-7	ER+/PR+/HER2- AR++	Alta	50.88 ± 3.52	40.58 ± 2.98	360.59 ± 39.47
* T47D	ER+/PR+/HER2- AR++	Muy alta	64.74 ± 7.10	50.47 ± 5.51	518.25 ± 69.93

Tabla 3. Rugosidad vs características de las líneas celulares. La rugosidad de la membrana plasmática es significativamente mayor en las líneas celulares T47D (ER+/PR+/HER2-/AR++) y MCF-7 (ER+/PR+/HER2-/AR++), cuya expresión de receptores es igual, pero difieren en su expresión de Ki-67, como marcador de proliferación, en comparación con MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-/AR+) y SKBR3 (ER-/PR-/HER2++/AR++), que de igual manera difieren en su expresión de Ki-67. Donde, la expresión de rugosidad es de la siguiente manera: T47D > MCF-7 > MDA-MB-231 > SK-BR3, es decir, la línea celular T47D, que es la más rugosa, es la que expresa mayor cantidad de Ki-67. Los valores son expresados como: media ± DE de seis mediciones independientes.

Con base en estos resultados demostramos que efectivamente RMS_[Rq] es el parámetro con mayor precisión al momento de calcular los valores de la rugosidad de la membrana plasmática, como se ha reportado previamente en la literatura (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002).

También es importante señalar que el análisis cuantitativo de la altura y la rugosidad superficial son parámetros que no se pueden utilizar para la caracterización de tumores primarios de CaM, si bien la caracterización se podría llevar a cabo partiendo de los cultivos primarios de CaM, ambos parámetros no se podrían determinar directamente en pacientes. Ya que, para calcular correctamente estos parámetros es necesario hacer las mediciones en células individuales, obtener las imágenes a una temperatura de entre 15 a 20 °C en un área de trabajo libre de ruido, considerando que, la punta o *cantilever* es sumamente sensible a los cambios de temperatura y al ruido.

Efecto de DHT sobre la rugosidad de las membranas de células MDA-MB-231

Con la finalidad de analizar el efecto de la DHT sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de las membranas plasmáticas de las células de cáncer de mama triple negativas, MDA-MB-231, las

células se incubaron con el vehículo etanol (0.01%) o el esteroide DHT (1nM) durante 48 horas y se fijaron en etanol.

Para comparar los efectos de DHT en la rugosidad de la membrana plasmática, fue fundamental determinar el límite inferior de resolución alcanzable, reflejado en los valores obtenidos de R_a , R_{max} y $RMS_{[Rq]}$, en dos tamaños de escaneo diferentes (0.7 y 1 μm^2) con valores descendentes de altura (Z). Es importante mencionar que cuando el tamaño de la imagen es de 1 μm (1,000 nm), se tiene una resolución de 1.953 nm/píxel, es decir, 1.953 nm. Mientras que, si el tamaño de la imagen es de 0.7 μm (700 nm), la distancia entre dos píxeles es de 1.367 nm, es decir, la resolución se mejoró 1.42 veces.

Los resultados demostraron que los valores de R_a , R_{max} y $RMS_{[Rq]}$ obtenidos para los dos tamaños de escaneo presentaron comportamientos distintos se puede observar en las figuras 26 y 27 una imagen representativa para cada tamaño (imagen 2D y 3D, respectivamente). Los valores de R_a , R_{max} y $RMS_{[Rq]}$ se calcularon para cada imagen y cuyos resultados se muestran en la Tabla 4. Los resultados obtenidos del análisis mediante AFM se presentan a continuación:

Las imágenes de las figuras 26 A, B muestran la morfología bidimensional y tridimensional, respectivamente de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo testigo (vehículo). Mientras que, las figuras 26 C, D muestran la morfología bidimensional y tridimensional, respectivamente de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo experimental (1 nM de DHT). Se observa que la rugosidad de la membrana cambia cuando las células se incuban con 1 nM de DHT. Los cambios más notables se observan en las figuras B, D donde las imágenes corresponden con la morfología tridimensional muestran ciertas subestructuras con relieves (figura B, zonas amarillas) y áreas con una mayor profundidad (figura D, zonas café oscuro). A las figuras B, D se les modifico la textura a diferencia de las figuras 18, 20, 22, 24 a través del programa del AFM-NanoScope III, como parte de volver a estandarizar las condiciones para la realización de los experimentos, esta modificación no afecta en nada la resolución de la imagen, ni los valores calculados. Los cambios más notables se observan en las figuras B, D donde las imágenes corresponden con la morfología tridimensional muestran ciertas subestructuras con relieves (figura B: zonas amarillas, figura D: zonas café claro) y áreas con una mayor profundidad (figuras B, D: zonas café oscuro).

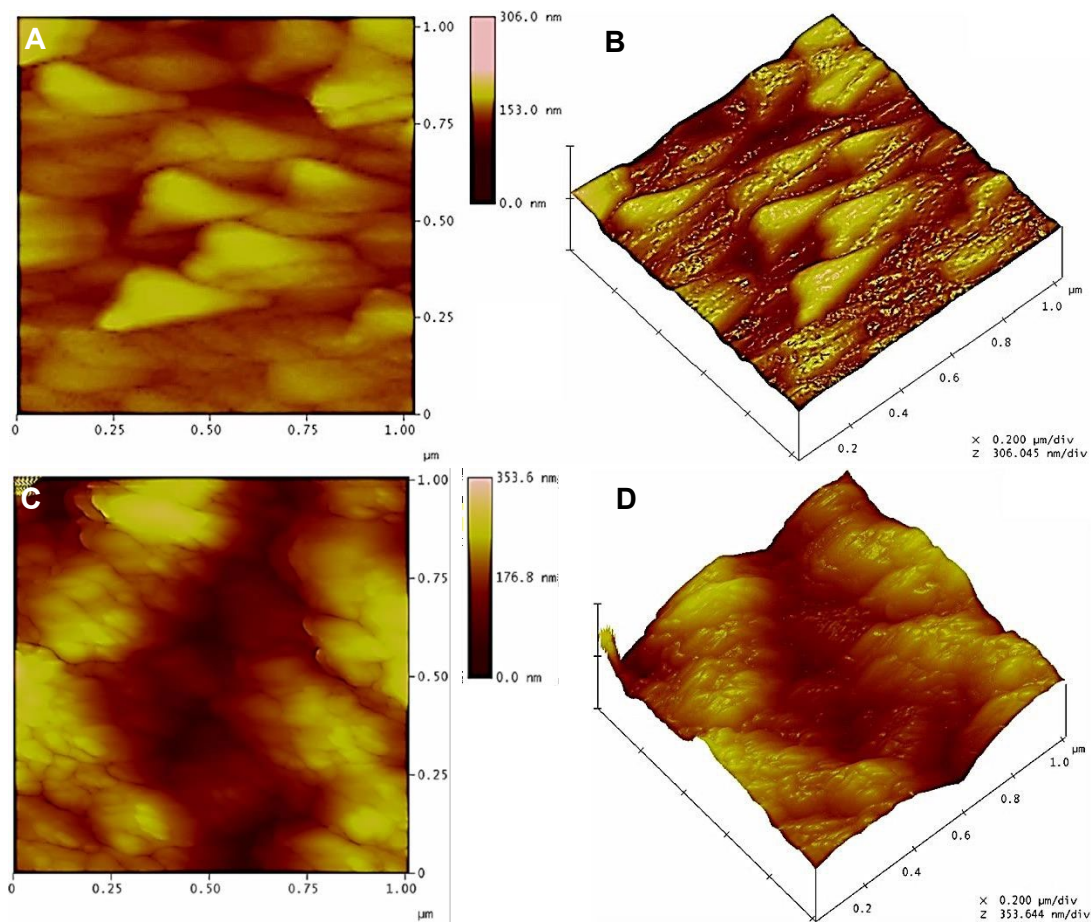


Figura 26. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo testigo (vehículo). Área de escaneo de $1 \times 1 \mu\text{m}$, $Z = 306.0 \text{ nm}$ y $Z = 306.045 \text{ nm/div}$, respectivamente. Morfología bidimensional (C) y tridimensional (D) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo experimental (1 nM de DHT). Área de escaneo de $1 \times 1 \mu\text{m}$, $Z = 353.6 \text{ nm}$ y $Z = 353.644 \text{ nm/div}$, respectivamente (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM, México).

Las imágenes de las figuras 27 A, B muestran la morfología bidimensional y tridimensional, respectivamente de una célula MDA-MB-231 tratada con el vehículo y adherida sobre un sustrato Au(111). Mientras que, las figuras 27 C, D muestran la morfología bidimensional y tridimensional, respectivamente de una célula MDA-MB-231 tratada con 1 nM de DHT y adherida sobre un sustrato Au(111). Cabe mencionar que las figuras B, D se les modificó la textura a diferencia de las figuras 18, 20, 22, 24 a través del programa del AFM-NanoScope III, con el objetivo de estandarizar estas nuevas condiciones para la realización de estos experimentos, esta modificación no afecta en nada la resolución de la imagen, ni los valores calculados.

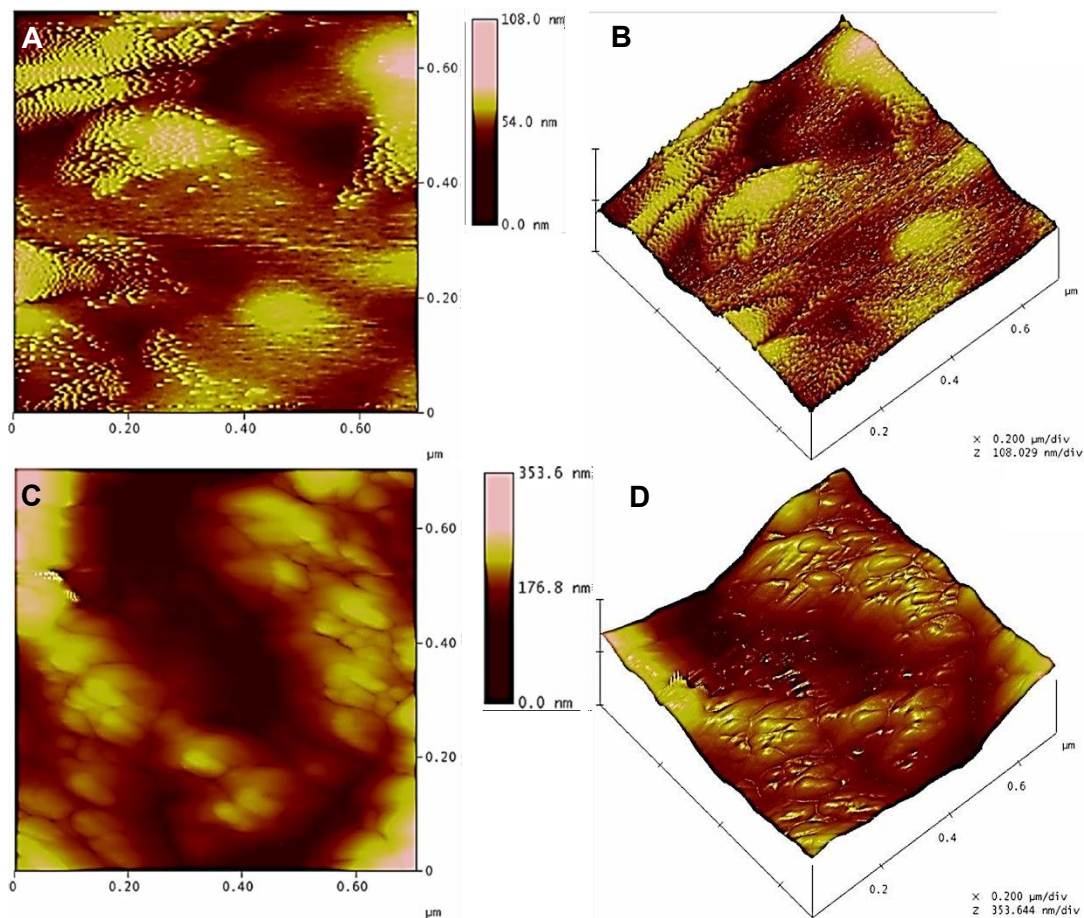


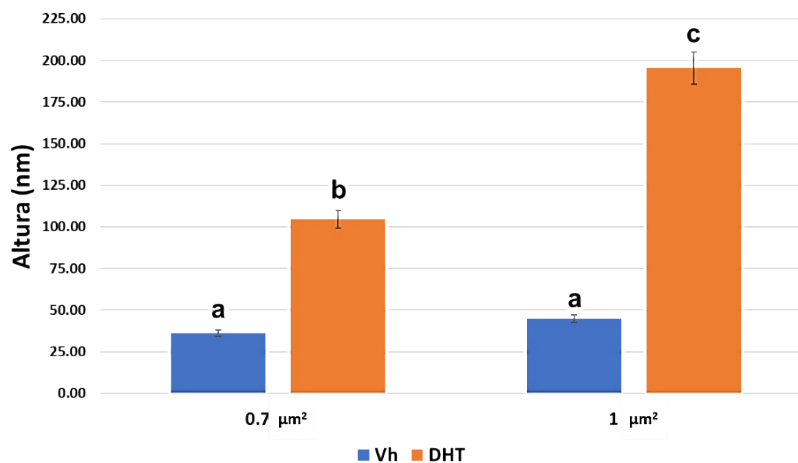
Figura 27. Morfología bidimensional (A) y tridimensional (B) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo testigo (vehículo). Área de escaneo de $0.7 \times 0.7 \mu\text{m}$, $Z = 108.0 \text{ nm}$ y $Z = 108.029 \text{ nm/div}$, respectivamente. Morfología bidimensional (C) y tridimensional (D) de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111) del grupo experimental (1 nM de DHT). Área de escaneo de $0.7 \times 0.7 \mu\text{m}$, $Z = 353.6 \text{ nm}$ y $Z = 353.644 \text{ nm/div}$, respectivamente (Imagen tomada en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Unidad Iztapalapa, UAM, México).

Es importante mencionar, que los resultados del efecto de DHT sobre la rugosidad de las membranas de células MDA-MB-231 no son comparables con los resultados previos de las cuatro líneas celulares de CaM (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231), en los que se comparan los parámetros de altura y rugosidad superficial debido a que, por el tiempo transcurrido desde la realización del trabajo de Téllez-Plancarte (Téllez-Plancarte et al., 2018) y a la pandemia de Covid-19, se tuvieron que volver a estandarizar las condiciones para la realización de estos experimentos, la altura y la rugosidad de la membrana plasmática en presencia o ausencia de DHT se calcularon en las mismas condiciones experimentales, como se describió anteriormente.

Análisis de la altura por AFM en células MDA-MB-231 tratadas con el Vh o DHT 1 nM

Dado que el parámetro de altura es necesario para caracterizar la topografía de la superficie, se calculó su valor en cuatro diferentes lugares a lo largo del citoplasma de cada célula, esto se realizó para ambos casos en las superficies de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$.

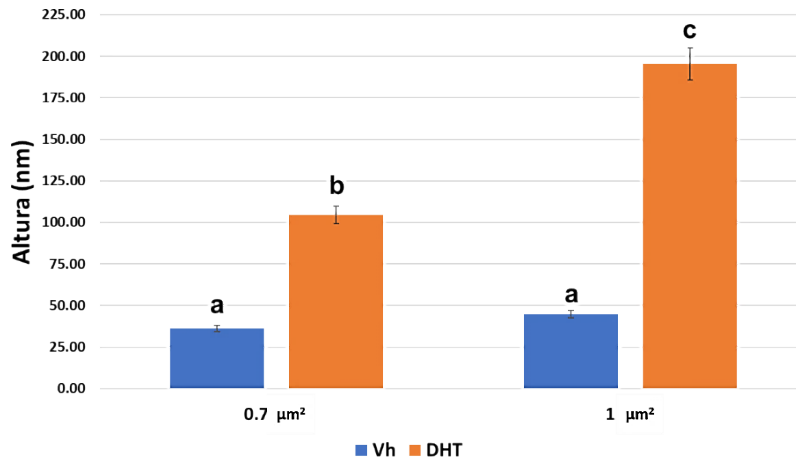
Como se muestra en la Gráfica 5 los resultados demostraron diferencias estadísticas entre las células MDA-MB-231 incubadas con el Vh y DHT, con un área de escaneo de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. La gráfica muestra que la incubación con 1 nM de DHT provoca cambios en la altura a lo largo de la membrana plasmática en estas células.



Gráfica 5. Análisis de la altura por AFM a lo largo del citoplasma en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh, DHT 1nM, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Se graficó el promedio de la altura de cuatro mediciones por cada célula. Los valores son expresados como la media \pm DE de cuatro mediciones independientes. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

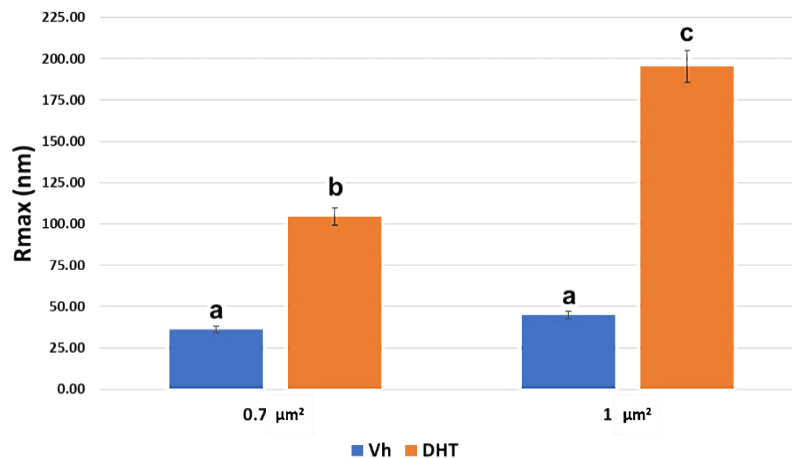
Análisis de la rugosidad por AFM en células MDA-MB-231 tratadas con Vh, DHT 1 nM

En primer lugar, se calculó Ra como se muestra en las gráficas 6, 7, 8 los resultados demostraron diferencias significativas entre las células MDA-MB-231 tratadas con DHT con respecto al control, con ambas áreas de escaneo $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Por lo que la DHT aumenta la rugosidad de la membrana plasmática en estas células.



Gráfica 6. Análisis de la rugosidad (mediante el factor Ra) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Se graficó el promedio de la altura de cuatro mediciones por cada célula. Los valores son expresados como la media \pm DE de cuatro mediciones independientes. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

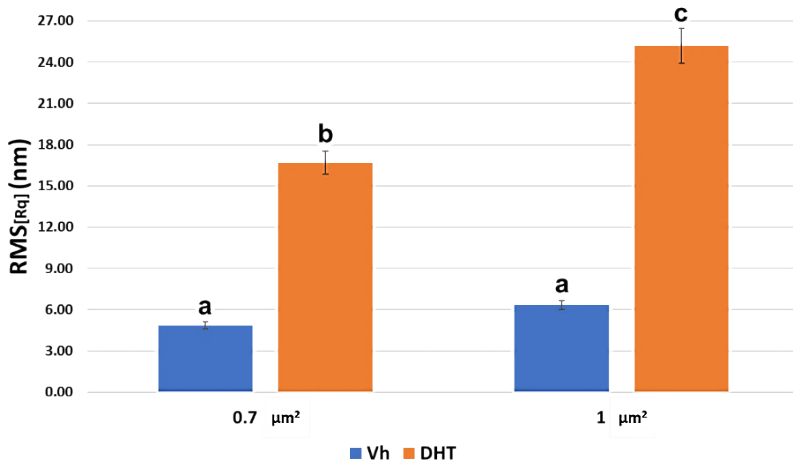
A continuación, se procedió a calcular Rmax en las células MDA-MB-231, debido a que, brinda información complementaria sobre Ra. Los resultados (Gráfica 7) también demostraron un aumento significativo en la Rmax después de la exposición a DHT.



Gráfica 7. Análisis de la rugosidad (mediante el factor Rmax) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Se graficó el promedio de la altura de cuatro mediciones por cada célula. Los valores son expresados como la media \pm DE de cuatro mediciones independientes. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

Por último, se calculó $\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$, este parámetro se caracteriza por tener mayor precisión y permite que se obtenga una mejor caracterización de la rugosidad. La Gráfica 8 muestra los

resultados y como podemos observar el tratamiento con DHT también aumento significativamente.



Gráfica 8. Análisis de la rugosidad (mediante el factor $RMS_{[Rq]}$) por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT, cuya área de escaneo es de $0.7 \mu m^2$ y $1 \mu m^2$, respectivamente. Se graficó el promedio de la altura de cuatro mediciones por cada célula. Los valores son expresados como la media \pm DE de cuatro mediciones independientes. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos.

El resultado del análisis cuantitativo de la rugosidad superficial de las células MDA-MB-231 tratadas con DHT se muestra en la Tabla 4. Los resultados demuestran que la rugosidad de la membrana plasmática aumento 4 veces más en los valores de Ra, Rmax y $RMS_{[Rq]}$ cuando las células se incubaron con 1 nM de DHT en comparación con los grupos tratados con vehículo (etanol).

Tratamiento	Tamaño (μm)	$RMS_{[Rq]}$ (nm)	Ra (nm)	Rmax (nm)
Vh	1	6.31 ± 2.62	5.36 ± 2.91	44.89 ± 8.74
1 nM DHT	1	25.20 ± 4.99	20.44 ± 5.03	195.38 ± 56.03
Vh	0.7	4.85 ± 2.82	3.83 ± 2.38	36.28 ± 15.85
1 nM DHT	0.7	16.68 ± 2.83	13.59 ± 3.31	104.60 ± 38.86

Tabla 4. Valores de la rugosidad superficial por AFM en células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111), tratadas con Vh o 1nM de DHT. Para la determinación de la rugosidad de la membrana plasmática se calculó el promedio de tres factores de rugosidad: Ra, Rmax y $RMS_{[Rq]}$, a partir de cuatro mediciones por cada célula, para dos áreas de escaneo: $0.7 \mu m^2$, $1 \mu m^2$ en células MDA-MB-231 incubadas con Vh o 1nM de DHT, durante 48 h.

La rugosidad es significativamente mayor en las células MDA-MB-231 incubadas 1nM de DHT en comparación con las células que fueron incubadas con Vh. Los valores son expresados como: media \pm DE de cuatro mediciones independientes.

Efecto de DHT sobre la migración de la línea celular MDA-MB-231

En la Figura 28 podemos observar como la DHT induce la migración de las células MDA-MB-231. La figura muestra el efecto de las incubaciones con vehículo (Vh), 1 nM de DHT y 100 nM de DHT en los tiempos cero (T0), 24, 48 y 72 horas de incubación en un ensayo de cierre de la herida (“*wound healing*”) en donde se puede observar la migración de las células MDA-MB-231 hasta cerrar casi por completo la herida.

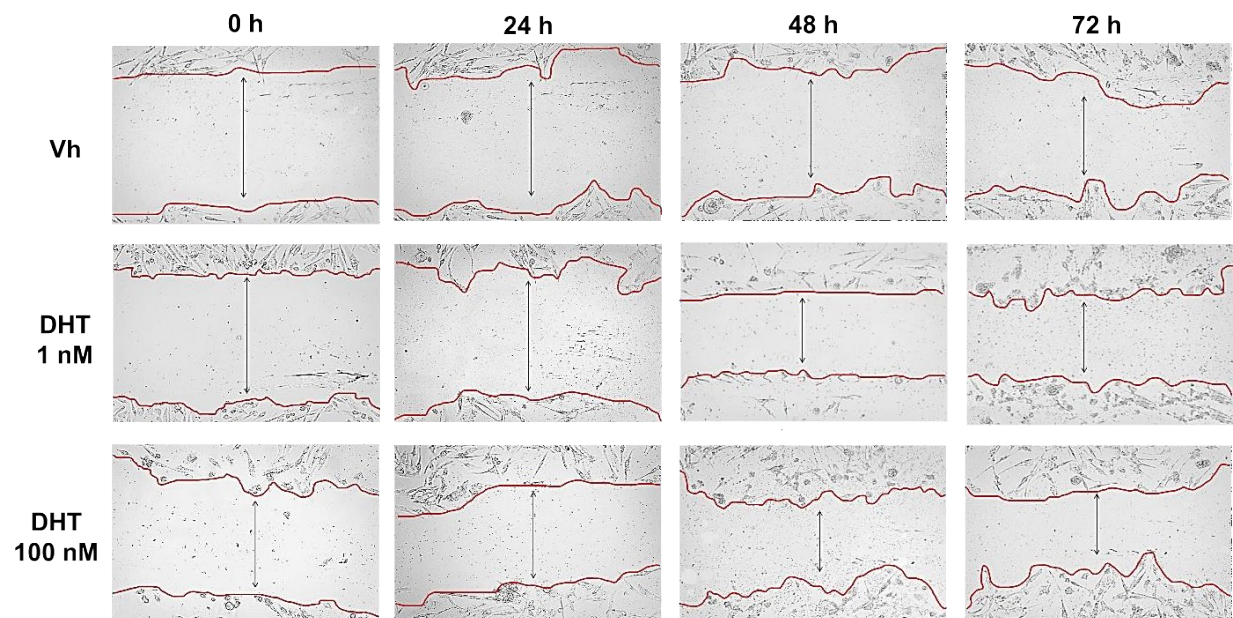
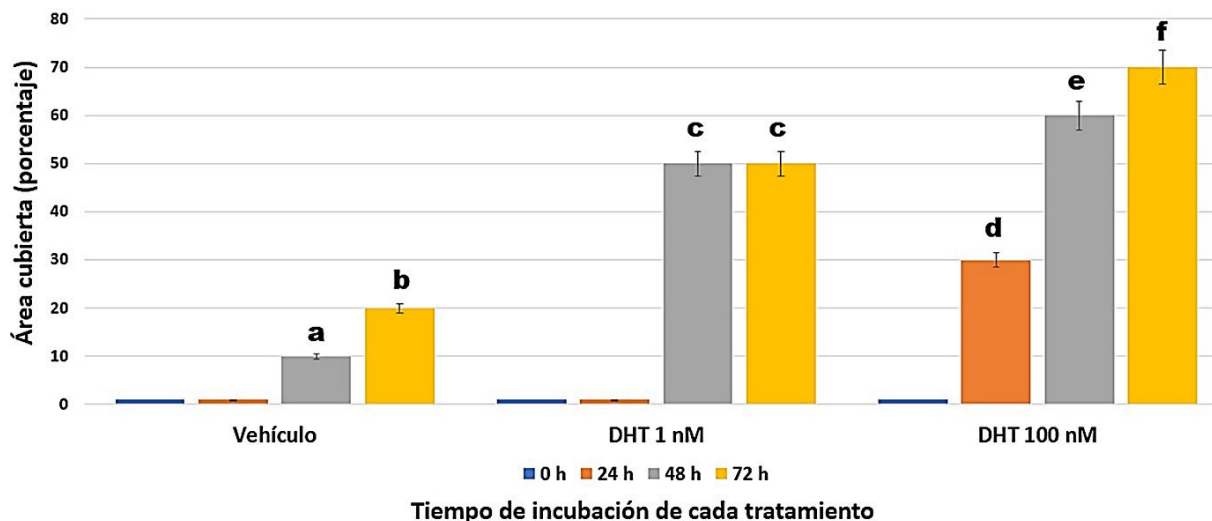


Figura 28. Efecto de la dihidrotestosterona (DHT; 1 nM o 100 nM) sobre la migración de células MDA-MB-231. Las flechas representan la distancia entre los bordes del área no cubierta. Los cambios morfológicos se observaron mediante el microscopio óptico digital, se muestran fotografías representativas de al menos tres experimentos independientes por triplicado. Amplificación 40 X.

La Gráfica 9 muestra el área de las células migrantes incubadas con los diferentes tratamientos. El tratamiento con 100 nM de DHT incremento de manera significativa ($p < 0.05$) el área cubierta de células desde las 24 h hasta las 72 h en comparación con las células tratadas solo con Vh. Mientras que, el tratamiento con 1 nM de DHT incremento de manera significativa ($p < 0.05$) el área cubierta de células desde las 48 h hasta las 72 h en comparación con las células tratadas solo con Vh. Por otra parte, al comparar el tratamiento con 1 nM y 100 nM de DHT se observó un incremento de manera significativa ($p < 0.05$) con 100 nM del área

cubierta de células a partir de las 24 h y hasta las 72 h en comparación con las células tratadas con 1 nM de DHT.



Gráfica 9. Efecto de DHT; 1 nM o 100 nM sobre la migración de células MDA-MB-231 (área cubierta en porcentaje). La gráfica muestra el porcentaje del área cubierta que representa la migración de las células antes los diferentes estímulos y durante los tiempos señalados. Los valores son expresados como: media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

En la Gráfica 9 se observa que la migración de las células MDA-MB-231 alcanza el máximo a las 48 h al incubarlas con 1 nM, con valores iguales (50%) a las 72 h. Cuando se incuban con 100 nM, la migración inicia desde las 24 h y alcanza el 70% a las 72 h. En el caso del grupo incubado con el vehículo (Vh; etanol) se observa migración a las 72 h, hasta alcanzar el 20% en relación con el tiempo inicial (“0 h”).

Discusión

La rugosidad de la membrana plasmática, medida a nivel nanométrico, desempeña un papel importante en el estudio de la progresión tumoral, debido a que, la información que proporciona el análisis de este parámetro permite observar los cambios que suceden en la superficie membranal de las células cancerosas, asociados a la sobreexpresión de receptores relacionados con la proliferación y la migración celular (Kaul-Ghanekar et al., 2009).

Con base en estos antecedentes los resultados del análisis cuantitativo de la rugosidad superficial de las diferentes líneas celulares usadas en el presente estudio (Tabla 2) las células T47D presentaron mayor rugosidad en comparación con SKBR3 que es la menos rugosa.

Debido a que la altura permite conocer la distancia vertical de las irregularidades que presenta la membrana plasmática y a su vez posibilita el poder caracterizar la topografía para lograr comprender la morfología de la membrana (Oliveira et al., 2012). En la Gráfica 1 se observó que la línea celular SKBR3, MDA-MB-231 y MCF-7 presenta una menor altura significativamente con respecto a T47D, esto sugiere que las células T47D presentan una mayor distancia vertical de las irregularidades en su membrana con respecto a su perfil bidimensional. Desafortunadamente este parámetro no es sensible a pequeños cambios en las longitudes de onda, en consecuencia, solo es capaz de brindar información en perfiles bidimensionales.

Por ese motivo, se realizó un análisis más detallado y preciso para calcular los parámetros de rugosidad (Gadelmawla et al., 2002). En este estudio se calculó el promedio de tres factores de rugosidad: Ra es un parámetro sencillo y el más utilizado en todo el mundo, sin embargo, no hace distinción entre picos y valles (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002). Como se muestra en la Gráfica 2 los resultados demostraron diferencias significativas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D. Esto coincide con lo que podemos observar en la Gráfica 1 donde se muestra el análisis de la altura, lo cual se podría deber a que Ra no hace distinción entre picos y valles. Mientras que, Rmax brinda información complementaria sobre Ra, pero no brinda información respecto a la forma de la membrana plasmática (Gadelmawla et al., 2002). En la Gráfica 3 podemos ver que hay diferencias significativas entre las líneas celulares SKBR3 y T47D (a) así como también entre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D (b), es decir, la membrana plasmática de SKBR3 y MDA-MB-231 son poco rugosas, a diferencia de, T47D que presenta mucha rugosidad en su membrana. Al medir el parámetro, $RMS_{[Rq]}$ el cual presenta una mayor precisión al calcular los valores de la rugosidad de la membrana, en comparación con Ra y Rq (Bellitto, 2012; Gadelmawla et al., 2002) observamos (Gráfica 4) diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares SKBR3, T47D (a) y SKBR3, MCF-7 (b). Finalmente, también se observaron diferencias significativas entre las líneas MDA-MB-231 y T47D (c).

Con la finalidad de confirmar lo anterior, se propuso comparar nuestros resultados con los resultados que habían sido obtenidos previamente en nuestro laboratorio, mediante AFM, y publicados en 2018 (Téllez-Plancarte et al., 2018), utilizando los 4 parámetros señalados

anteriormente en las 4 líneas celulares de CaM (MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231), con diferentes características de proliferación.

Por otro lado, las imágenes AFM presentaron diferencias en la morfología de la superficie de las 4 líneas celulares analizadas, pero sin modificaciones significativas en la rugosidad de la superficie (Téllez-Plancarte et al., 2018). Sin embargo, en el presente trabajo demostramos que la rugosidad, es significativamente mayor debido a que se observó que la rugosidad aumenta de la siguiente manera: T47D > MCF-7 > MDA-MB-231 > SKBR3, es decir, la línea celular T47D, es la más rugosa y SKBR3, es la menos rugosa.

A continuación, se obtuvieron los parámetros de altura, Ra, Rmax, $RMS_{[Rq]}$, calculando el promedio y la desviación estándar a partir de seis diferentes mediciones. Al analizar la altura por AFM en la Gráfica 1 observamos que MDA-MB-231 no presenta diferencias significativas en relación con las otras líneas celulares (SKBR3, MCF-7 y T47D). Así mismo, como se muestra en la Gráfica 2 el análisis de la rugosidad mediante el factor Ra coinciden con el análisis de la altura. En cambio, en la Gráfica 3 podemos ver que el análisis de la rugosidad mediante el factor Rmax demuestra que existen diferencias significativas entre MDA-MB-231 y T47D (b), aunque no entre MDA-MB-231 y SKBR3, MCF-7, pero si entre SKBR3 y T47D. Finalmente, al analizar la rugosidad mediante el factor $RMS_{[Rq]}$ en la Gráfica 4 de igual manera se observan diferencias significativas entre MDA-MB-231 y T47D (c), aunque no entre MDA-MB-231 y SKBR3, MCF-7, pero si entre SKBR3 y T47D (a), SKBR3 y MCF-7 (b).

Por lo antes mencionado, nosotros llegamos a la conclusión de que es mejor utilizar el parámetro $RMS_{[Rq]}$ para cuantificar la rugosidad de la membrana plasmática.

Algunos estudios han demostrado que la rugosidad de la membrana plasmática de células tumorales y sanas (Antonio et al., 2012) se modifica bajo distintos tratamientos farmacológicos, por ejemplo; el paclitaxel incremento la rugosidad superficial en células Ishikawa y HeLa (Kim et al., 2012; Wang et al., 2009a). También se ha reportado que la rugosidad superficial de células cancerosas de igual manera se modifica bajo la incubación con diferentes hormonas como la progesterona (P_4), la cual cambia la altura celular en células Hec-1-A e Ishikawa cambian después del tratamiento (Francis et al., 2009). Otro estudio demostró que la incubación de células MCF-7 con AuNP y E_2 incremento la rugosidad de la membrana celular en comparación con las células tratadas solamente con AuNP (Lara-Cruz et al., 2019). Al estimular con estrógenos aumentó la rugosidad superficial de las células MCF-7 en zonas que rodean la región nuclear (Zbiral et al., 2021). Téllez-Plancarte y colaboradores demostraron

que la expresión de HER2 siguió el siguiente orden: SKBR3 > MCF-7 > T47D > MDA-MB-231, es decir, SKBR3 es la línea celular con mayor expresión de HER2, en contraste MDA-MB-231 la cual es la línea celular con menor expresión de HER2 (Téllez-Plancarte et al., 2018).

Por otra parte, se ha reportado que el aumento de la altura al incrementar la superficie de análisis es proporcional con la resolución espacial (cantidad de píxeles), ya que, en cada píxel existe información en las dimensiones x, y, z (Band, 1989).

Por lo que al analizar un área de muestreo de $1 \mu\text{m}$, la distancia entre dos píxeles es de 1.953 nm , en cambio, cuando el área de muestreo mide $0.7 \mu\text{m}$, la distancia entre dos píxeles es de 1.367 nm , por lo tanto, la resolución se mejoró 1.42 veces. Es decir, entre más pequeña es el área de muestreo, tenemos una menor distancia entre los píxeles y una mejor resolución, por lo que es mejor utilizar un área de escaneo de $0.7 \mu\text{m}^2$. Los valores obtenidos bajos estos criterios en células MDA-MB-231 tratadas con DHT demostraron que la rugosidad de la membrana incrementa después de la incubación con DHT en comparación con las células no tratadas (vehículo).

Posteriormente, se obtuvieron los parámetros de altura, Ra, Rmax, $\text{RMS}_{\text{[Rq]}}$, calculando el promedio y la desviación estándar a partir de cuatro diferentes mediciones. En las células MDA-MB-231 tratadas con DHT (Gráfica 5) la altura incremento 2.8 veces con respecto a las incubadas con el Vh en un área de escaneo de $0.7 \mu\text{m}^2$. A su vez, la altura de estas células incubadas con DHT, pero con una área de escaneo de $1 \mu\text{m}^2$ incremento 4.3 veces con respecto a las incubadas con el Vh. Mientras que cuando se compararon ambas áreas de escaneo se observó un incremento en la altura de 1.8 veces en las células MDA-MB-231 tratadas con DHT, con un área de escaneo de $1 \mu\text{m}^2$ con respecto a $0.7 \mu\text{m}^2$.

En la Gráfica 6 observamos que la rugosidad de las células MDA-MB-231 calculada mediante el factor Ra después de la incubación con DHT en un área de escaneo de $0.7 \mu\text{m}^2$ incremento 3.5 veces con respecto a las incubadas con el Vh (a). En cambio, la rugosidad de estas células al analizar un área de escaneo de $1 \mu\text{m}^2$ incremento 1.5 veces en comparación con las que se incubaron con DHT, pero con un área de escaneo de $0.7 \mu\text{m}^2$ (b). Por su parte, la rugosidad de las células MDA-MB-231 incubadas con DHT incremento 3.8 veces, con respecto a las incubadas con el Vh (c) al escanear un área de $1 \mu\text{m}^2$. Se ha informado que las células MDA-MB-231 muestran una forma parecida a la de un huso regular con núcleos en forma elíptica y una membrana suave y fluida (Jung et al. 2018). El incremento en la rugosidad de la membrana plasmática podría atribuirse a cambios en la expresión de proteínas como Cav-1 la

cual se asocia con la formación de vesículas, el AR tiene la capacidad de interactuar con esta proteína (Bennett et al., 2010; Qian et al. 2019). Los cambios en la altura y el incremento de la rugosidad superficial en estas células se asocia en respuesta a la estimulación hormonal con DHT, como se ha demostrado anteriormente en células MCF-7 (Lara-Cruz et al., 2019; Zbiral et al., 2021).

También se ha observado que en la línea celular de cáncer MDA-MB-231 la Cav-1 se localiza en las microvesículas al igual que otras proteínas de adhesión como la proteína asociada con Ras 1 (Rap-1A), CYR61 (inductor angiogénico rico en cisteína) y tenascina. En consecuencia, la colocación de las microvesículas con Cav-1 y otras proteínas de adhesión podrían estar involucradas en el desarrollo del CaM (Mughees et al., 2020). Además, recientemente se demostró que DHT incrementa la presencia total de CD9 en las pequeñas vesículas extracelulares doble positivas para CD9 y CD63 (S-EV) aisladas de células de CaP (Martens-Uzunova et al., 2021). Estas evidencias nos hacen suponer que el hecho de una mayor rugosidad en la membrana plasmática en células MDA-MB-231 por efecto de DHT podría ser causado por la formación y/o presencia de vesículas intracelulares y extracelulares.

Con base en la literatura podrían existir dos diferentes mecanismos de como el AR ligado a la membrana plasmática podría ser el responsable del incremento de la rugosidad superficial en células MDA-MB-231. 1) El AR membranal potencia la actividad transcripcional del AR en presencia de bajos niveles de andrógenos al aumentar su translocación al núcleo. 2) El AR membranal activa las cascadas de señalización de AKT, ERK y Src promoviendo la proliferación, la invasión y la supervivencia celular (Li et al. 2018; Zarif et al. 2015).

Por último, en la Gráfica 8 demostramos que al utilizar el factor $RMS_{[Rq]}$ cuya área de escaneo fue de $0.7 \mu m^2$ la rugosidad de las células MDA-MB-231 incubadas con DHT incremento 3.4 veces con respecto a las incubadas con el Vh (a). Mientras que, al analizar un área de escaneo de $1 \mu m^2$ la rugosidad de estas células incubadas con DHT incremento 1.5 veces, con respecto a las incubadas con DHT, con un área de escaneo de $0.7 \mu m^2$ (b). Cuando se escanea un área de $1 \mu m^2$ la rugosidad de las células MDA-MB-231 incubadas con DHT incremento 3.9 veces, con respecto a las incubadas con el Vh (c).

Al analizar estos resultados (Tabla 4) demostramos que la rugosidad de la membrana plasmática incremento hasta 4.3 veces dependiendo del factor que se utilice para calcular la rugosidad, como ya se había mencionado, $RMS_{[Rq]}$ es el parámetro que se caracteriza por

tener mayor precisión. De igual forma, demostramos que el tratamiento con DHT incrementa la rugosidad de las células de manera evidente.

De manera interesante, actualmente ningún estudio ha cuantificado los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática posteriormente a la incubación con DHT en la línea celular MDA-MB-231.

Por otro lado, para conocer el papel que juega DHT en el CaM, particularmente en el CMTN, en un estudio realizado en el 2016 utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y Hs578T, estas se incubaron durante 24, 48 y 72 h con diferentes concentraciones de DHT que fueron de 0.1 a 100 nM, con el objetivo de estudiar el papel del AR en el CMTN y observaron que al incubar estas líneas celulares con DHT incrementaba significativamente la expresión del AR (Zhu et al., 2016). Mientras que, un año después estudiaron el papel que desempeña el AR en la proliferación celular en el CMTN, utilizando las mismas líneas celulares las cuales fueron incubadas con 100 nM de DHT durante 24, 48 y 72 h demostraron que la activación del AR mediante DHT promovía la proliferación celular en el CMTN (Shen et al., 2017). Con base en estos antecedentes en el presente trabajo se utilizaron dos concentraciones diferentes de DHT (1 nM o 100 nM), para poder estudiar su efecto sobre los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática y en la migración en células MDA-MB-231.

Finalmente, se analizó el efecto de la incubación de DHT en las células MDA-MB-231 en un parámetro biológico como su capacidad de migración después de ser estimuladas con 1 o 100 nM de DHT.

Como sabemos DHT promueve la metástasis mediante la activación de AR en el CaM (Bahnassy et al., 2020; Feng et al., 2017); sin embargo, no se ha reportado que esta hormona esteroide induzca la migración de las células MDA-MB-231, proceso previo a la metástasis.

Debido a que la migración celular involucra moduladores del citoesqueleto de actina encargados de coordinar la motilidad celular (Sahai et al. 2007) y la dinámica de los filamentos de actina tienen un papel decisivo en la regulación de la membrana (Chang et al., 2017), nuestros resultados sugieren que el incremento en la rugosidad de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231 posterior al tratamiento con DHT en combinación con la reorganización de los filamentos de actina estarían asociados con la migración celular. Además, la rugosidad de la membrana plasmática como parámetro citológico, que está relacionado con los mecanismos celulares, específicamente en la adhesión y motilidad celular,

implicaría que a lo largo de la cascada metastásica cambiaria (Metsiou, Kozaniti, y Deligianni 2021).

Conclusiones

En el presente estudio se demuestra que para cuantificar la rugosidad es mejor utilizar el parámetro $RMS_{[Rq]}$ y que la rugosidad, medida por $RMS_{[Rq]}$, ya que este parámetro se caracteriza por tener mayor precisión y permite que se obtenga una mejor caracterización de la rugosidad en comparación con Ra y Rmax.

Las líneas celulares que presentan mayor rugosidad en la membrana plasmática son: T47D (Luminal A; AR++) y MCF-7 (Luminal B; AR++) en comparación con MDA-MB-231 (CMTN; AR+), donde la rugosidad de la línea celular MDA-MB-231, es la segunda menos rugosa. La rugosidad de la membrana plasmática podría reflejar las diferentes condiciones fisiológicas de las células como cambios en la composición de lípidos, la adhesión celular, entre otros, que estarían reflejando el fenotipo de las células.

También se demostró por primera vez, mediante la utilización del AFM que la rugosidad nanométrica de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231 incubadas con 1 nM de DHT se modifica hasta poco más de 4 veces, en comparación con aquellas células que fueron incubadas con el Vh. Así como también se determinó que el tratamiento con DHT incrementa la migración de estas células, lo cual puede estar asociado con el aumento de la rugosidad nanométrica de sus membranas plasmáticas.

Por lo tanto, el AR podría ser un punto de referencia en los subtipos del CMTN con AR positivo, ya que los pacientes que sean detectados con CMTN y expresión del AR podrían beneficiarse con las terapias dirigidas contra el AR.

Este enfoque podría brindar una visión novedosa del papel que juega el AR en el CMTN, a nivel nanométrico, promoviendo el uso del AFM para el diagnóstico temprano del CaM al incrementar la investigación a nivel nanométrico. Estos hallazgos también pueden tener implicaciones al momento de escoger el tratamiento y/o la terapia de los pacientes con CMTN.

Perspectivas

Actualmente, se llevan a cabo experimentos en los que la utilización del AFM de alta resolución son cruciales al momento de observar los cambios en la morfología bidimensional y tridimensional, a nivel nanométrico, de las células cancerosas al estimularlas con hormonas. También, sería prudente analizar las modificaciones que presentan en su estructura con la manera en la que dichas modificaciones podrían afectar la respuesta que las células cancerosas muestran ante los agentes terapéuticos. Además, sería interesante realizar experimentos relacionados con el efecto de más hormonas y agentes terapéuticos sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de CMTN.

Un punto importante para continuar con esta línea de investigación es el hecho que demostramos que el AR podría ser un objetivo eficaz en los subtipos del CMTN con AR positivo, por lo tanto, los pacientes que expresen el AR podrían beneficiarse con las terapias dirigidas al AR. Sin embargo, es importante realizar más estudios donde se trabaje a nivel nanométrico, ya que, lamentablemente existen pocos grupos de trabajo donde se realice investigación a nivel nanométrico. El realizar investigación a nivel de nanómetros nos permitiría crear terapias mucho más dirigidas, beneficiando así a los pacientes.

Bibliografia

Aine, M., Boyaci, C., Hartman, J., Häkkinen, J., Mitra, S., Campos, A.B., Nimeus, E., Ehinger, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., et al. (2021). Molecular analyses of triple-negative breast cancer in the young and elderly. *Breast Cancer Research* 23, 20. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01392-0>.

Alarmo, E.-L., Pärssinen, J., Ketolainen, J.M., Savinainen, K., Karhu, R., and Kallioniemi, A. (2009). BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Letters* 275, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.028>.

Allison, D.P., Mortensen, N.P., Sullivan, C.J., and Doktycz, M.J. (2010). Atomic force microscopy of biological samples. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2, 618–634. <https://doi.org/10.1002/wnan.104>.

Alves, A.C., Ribeiro, D., Nunes, C., and Reis, S. (2016). Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim Biophys Acta* 1858, 2231–2244. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025>.

Antonio, P.D., Lasalvia, M., Perna, G., and Capozzi, V. (2012). Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochim Biophys Acta* 1818, 3141–3148. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.001>.

Armasu, I., Preda, C., Ianole, V., Mocanu, V., Hristov, I., Andriescu, E.C., Cretu-Silivestru, I., Vasiliu, I., Dascalu, C.G., Lupascu, C.D., et al. (2020). Insights on aromatase immunohistochemistry: variations between intrinsic molecular subtypes of breast cancers. *Acta Endocrinol (Buchar)* 16, 22–29. <https://doi.org/10.4183/aeb.2020.22>.

Aurilio, G., Cimadamore, A., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Verri, E., Scarpelli, M., Massari, F., Cheng, L., Santoni, M., and Montironi, R. (2020). Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells* 9, 2653. <https://doi.org/10.3390/cells9122653>.

Azzouni, F., and Mohler, J. (2012). Role of 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic diseases. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 15, 222–230. <https://doi.org/10.1038/pcan.2012.1>.

Bahnassy, S., Thangavel, H., Quttina, M., Khan, A.F., Dhanyalayam, D., Ritho, J., Karami, S., Ren, J., and Bawa-Khalife, T. (2020). Constitutively active androgen receptor supports the metastatic phenotype of endocrine-resistant hormone receptor-positive breast cancer. *Cell Commun Signal* 18, 154. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00649-z>.

Band, L.E. (1989). Spatial aggregation of complex terrain. *Geographical Analysis* 21, 279–293.

Baritaki, S., Apostolakis, S., Kanellou, P., Dimanche-Boitrel, M., Spandidos, D.A., and Bonavida, B. (2007). Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications. In *Advances in Cancer Research*, (Academic Press), pp. 149–190.

Barton, V.N., D'Amato, N.C., Gordon, M.A., Christenson, J.L., Elias, A., and Richer, J.K. (2015). Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Horm Cancer* 6, 206–213. <https://doi.org/10.1007/s12672-015-0232-3>.

Bellitto, V. (2012). Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale.

Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., and Gobe, G.C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.013>.

Bergin, A.R.T., and Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res* 8, F1000 Faculty Rev-1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>.

Bhat, S., Jun, D., Paul, B.C., and Dahms, T.E.S. (2012). Viscoelasticity in Biological Systems: A Special Focus on Microbes (IntechOpen).

Bleach, R., and McIlroy, M. (2018). The Divergent Function of Androgen Receptor in Breast Cancer; Analysis of Steroid Mediators and Tumor Intracrinology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 594. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00594>.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 0. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Brown, J.M., Wasson, M.-C.D., and Marcato, P. (2021). Triple-Negative Breast Cancer and the COVID-19 Pandemic: Clinical Management Perspectives and Potential Consequences of Infection. *Cancers (Basel)* 13, 296. <https://doi.org/10.3390/cancers13020296>.

Bulun, S.E., Lin, Z., Zhao, H., Lu, M., Amin, S., Reierstad, S., and Chen, D. (2009). Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1155, 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03705.x>.

Cailleau, R., Olivé, M., and Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14, 911–915. <https://doi.org/10.1007/BF02616120>.

Cao, Wei, Renhui Shen, Seth Richard, Yu Liu, Mohammad Jalalirad, Margot P. Cleary, Antonio B. D'Assoro, Sergio A. Gradilone, y Da-Qing Yang. 2022. Inhibition of triple-negative breast cancer proliferation and motility by reactivating p53 and inhibiting overactivated Akt. *Oncology Reports* 47 (2): 41. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8252>.

Chan, J.W., Taylor, D.S., Zwerdling, T., Lane, S.M., Ihara, K., and Huser, T. (2006). Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J* 90, 648–656. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>.

Chang, C.-H., Lee, H.-H., and Lee, C.-H. (2017). Substrate properties modulate cell membrane roughness by way of actin filaments. *Scientific Reports* 7, 9068. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09618-y>.

Chavez, K.J., Garimella, S.V., and Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* 32, 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.

Chottanapund, S., Van Duursen, M.B.M., Navasumrit, P., Hunsonti, P., Timtavorn, S., Ruchirawat, M., and Van den Berg, M. (2013). Effect of androgens on different breast cancer cells co-cultured with or without breast adipose fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 138, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.007>.

Christenson, Jessica L., Kiel T. Butterfield, Nicole S. Spoelstra, John D. Norris, Jatinder S. Josan, Julie A. Pollock, Donald P. McDonnell, Benita S. Katzenellenbogen, John A. Katzenellenbogen, y Jennifer K. Richer. (2017). MMTV-PyMT and Derived Met-1 Mouse Mammary Tumor Cells as Models for Studying the Role of the Androgen Receptor in Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Hormones and Cancer* 8 (2): 69–77. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0285-6>.

Cochrane, D.R., Bernales, S., Jacobsen, B.M., Cittelly, D.M., Howe, E.N., D'Amato, N.C., Spoelstra, N.S., Edgerton, S.M., Jean, A., Guerrero, J., et al. (2014). Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 16, R7. <https://doi.org/10.1186/bcr3599>.

Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., and Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 35, 3147–3154. .

Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.

Dai, C., Heemers, H., and Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a030452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030452>.

- Davey, R.A., and Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* 37, 3–15. .
- Davis, S.R., Baber, R., Panay, N., Bitzer, J., Cerdas Perez, S., Islam, R.M., Kaunitz, A.M., Kingsberg, S.A., Lambrinoudaki, I., Liu, J., et al. (2019). Global Consensus Position Statement on the Use of Testosterone Therapy for Women. *Climacteric* 22, 429–434. <https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1637079>.
- Davison, S.L., and Davis, S.R. (2003). Androgens in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 363–366. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(03\)00204-8](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00204-8).
- Deng, X., Xiong, F., Li, X., Xiang, B., Li, Z., Wu, X., Guo, C., Li, X., Li, Y., Li, G., et al. (2018). Application of atomic force microscopy in cancer research. *J Nanobiotechnology* 16, 102. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0428-0>.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., and von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet* 389, 2430–2442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0).
- Dieci, M.V., Tsvetkova, V., Griguolo, G., Miglietta, F., Mantiero, M., Tasca, G., Cumerlato, E., Giorgi, C.A., Giarratano, T., Faggioni, G., et al. (2019). Androgen Receptor Expression and Association With Distant Disease-Free Survival in Triple Negative Breast Cancer: Analysis of 263 Patients Treated With Standard Therapy for Stage I-III Disease. *Front Oncol* 9, 452. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00452>.
- Dietze, E.C., Sistrunk, C., Miranda-Carboni, G., O'Regan, R., and Seewaldt, V.L. (2015). Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology. *Nat Rev Cancer* 15, 248–254. <https://doi.org/10.1038/nrc3896>.
- Digital Instruments Veeco Metrology Group (2001). Command Reference Manual Software Version 5.12 r3 (Technical Publications).
- Dimitrakakis, C., and Bondy, C. (2009). Androgens and the breast. *Breast Cancer Res* 11, 212. <https://doi.org/10.1186/bcr2413>.
- Doane, A.S., Danso, M., Lal, P., Donaton, M., Zhang, L., Hudis, C., and Gerald, W.L. (2006). An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 25, 3994–4008. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209415>.
- Dutta, D., Palmer, X.-L., Ortega-Rodas, J., Balraj, V., Dastider, I.G., and Chandra, S. (2020). Biomechanical and Biophysical Properties of Breast Cancer Cells Under Varying Glycemic Regimens. *Breast Cancer (Auckl)* 14, 1178223420972362. <https://doi.org/10.1177/1178223420972362>.
- Erazo-Oliveras, A., Fuentes, N.R., Wright, R.C., and Chapkin, R.S. (2018). Functional link between plasma membrane spatiotemporal dynamics, cancer biology, and dietary membrane-altering agents. *Cancer Metastasis Rev* 37, 519–544. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9733-1>.
- Exman, P., and Tolaney, S.M. (2021). HER2-positive metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Clin Adv Hematol Oncol* 19, 40–50. .
- Feng, J., Li, L., Zhang, N., Liu, J., Zhang, L., Gao, H., Wang, G., Li, Y., Zhang, Y., Li, X., et al. (2017). Androgen and AR contribute to breast cancer development and metastasis: an insight of mechanisms. *Oncogene* 36, 2775–2790. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.432>.
- Francis, L.W., Lewis, P.D., Gonzalez, D., Ryder, T.A., Webb, G., Joels, L.A., White, J.O., Wright, C.J., and Conlan, R.S. (2009). Progesterone induces nano-scale molecular modifications on endometrial epithelial cell surfaces. *Biology of the Cell* 101, 481–493. <https://doi.org/10.1042/BC20080189>.
- Gadelmawla, E.S., Koura, M.M., Maksoud, T.M.A., Elewa, I.M., and Soliman, H.H. (2002). Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology* 123, 133–145. [https://doi.org/10.1016/S0924-0136\(02\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0924-0136(02)00060-2).

- Gao, W., Bohl, C.E., and Dalton, J.T. (2005). Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem Rev* *105*, 3352–3370. <https://doi.org/10.1021/cr020456u>.
- Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., Coinu, A., Martorana, F., De Santo, I., Del Mastro, L., et al. (2018). Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treat Rev* *68*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.005>.
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Auricchio, F., Castoria, G., and Migliaccio, A. (2019). Androgens Induce Invasiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Through AR/Src/PI3-K Complex Assembly. *Sci Rep* *9*, 4490. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41016-4>.
- Glaser, R., and Dimitrakakis, C. (2015). Testosterone and breast cancer prevention. *Maturitas* *82*, 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.06.002>.
- Goicoechea, S.M., Bednarski, B., García-Mata, R., Prentice-Dunn, H., Kim, H.J., and Otey, C.A. (2009). Palladin contributes to invasive motility in human breast cancer cells. *Oncogene* *28*, 587–598. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.408>.
- Gong, Y., Xu, J., and Buchanan, R.C. (2018). Surface roughness: A review of its measurement at micro-/nano-scale. *Physical Sciences Reviews* *3*. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0057>.
- Govindan, S., Siraganahalli Eswaraiah, M., Basavaraj, C., Adinarayan, M., Sankaran, S., and Bakre, M. (2020). Androgen Receptor mRNA levels determine the prognosis in triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* *20*. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07218-0>.
- Green, S.M., Mostaghel, E.A., and Nelson, P.S. (2012). Androgen Action and Metabolism in Prostate Cancer. *Mol Cell Endocrinol* *360*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.046>.
- Grino, P.B., Griffin, J.E., and Wilson, J.D. (1990). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* *126*, 1165–1172. <https://doi.org/10.1210/endo-126-2-1165>.
- Gucalp, A., and Traina, T.A. (2016). Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Current Problems in Cancer* *40*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2016.09.004>.
- Guiu, S., Mollevi, C., Charon-Barra, C., Boissière, F., Crapez, E., Chartron, E., Lamy, P.-J., Gutowski, M., Bourgier, C., Romieu, G., et al. (2018). Prognostic value of androgen receptor and FOXA1 co-expression in non-metastatic triple negative breast cancer and correlation with other biomarkers. *Br J Cancer* *119*, 76–79. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0142-6>.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hendrich, A., and Michalak, K. (2003). Lipids as a Target for Drugs Modulating Multidrug Resistance of Cancer Cells. *CDT* *4*, 23–30. <https://doi.org/10.2174/1389450033347172>.
- Holschbach, M.A., and Handa, R.J. (2017). Chapter 22 - Androgen Action and Stress. In *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*, G. Fink, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 227–235.
- Holst, J.P., Soldin, O.P., Guo, T., and Soldin, S.J. (2004). Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* *24*, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2004.01.004>.
- INEGI, 2020 (2020). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre) (Comunicado de prensa Núm. 462/20).
- Jung, Gyeong Bok, Jeong-Eun Huh, Hyo-Jung Lee, Dohyun Kim, Gi-Ja Lee, Hun-Kuk Park, y Jae-Dong Lee. (2018). Anti-Cancer Effect of Bee Venom on Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Using Raman Spectroscopy. *Biomedical Optics Express* *9* (11): 5703–18. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.005703>.

- Karangadan, S., Patil, A., and Andola, S. (2016). Immunohistochemical characterization of molecular classification of breast carcinoma and its relation with Ki-67. *Clin Cancer Investig J* 5, 430. <https://doi.org/10.4103/2278-0513.197876>.
- Kaul-Ghanekar, R., Singh, S., Mangain, H., Jalota-Badwar, A., Paknikar, K.M., and Chattopadhyay, S. (2009). Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study. *BMC Cancer* 9, 350. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-350>.
- Keren, K., Pincus, Z., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Marriott, G., Mogilner, A., and Theriot, J.A. (2008). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* 453, 475–480. <https://doi.org/10.1038/nature06952>.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., and Brenner, H.J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer* (1965) 15, 659–670. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(79\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0014-2964(79)90139-7).
- Kim, K.S., Cho, C.H., Park, E.K., Jung, M.-H., Yoon, K.-S., and Park, H.-K. (2012). AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *PLoS One* 7, e30066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030066>.
- Klinge, C.M. (2009). Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Curr Genomics* 10, 169–183. <https://doi.org/10.2174/138920209788185289>.
- Kong, Y., Qu, F., Yuan, X., Yan, X., and Yu, W. (2020). Effect of Bicalutamide on the proliferation and invasion of human triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Medicine (Baltimore)* 99, e19822. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019822>.
- Lara-Cruz, C., Jiménez-Salazar, J., Ramón-Gallegos, E., Damian-Matsumura, P., and Batina, N. (2016). Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 11, 5149–5161. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108768>.
- Lara-Cruz, C., Jiménez-Salazar, J.E., Arteaga, M., Arredondo, M., Ramón-Gallegos, E., Batina, N., and Damián-Matsumura, P. (2019). Gold nanoparticle uptake is enhanced by estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 14, 2705–2718. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196683>.
- Lee, Y.-M., Oh, M.H., Go, J.-H., Han, K., and Choi, S.-Y. (2020). Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes Genom* 42, 1381–1387. <https://doi.org/10.1007/s13258-020-01014-7>.
- Leung, J.K., and Sadar, M.D. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 2. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00002>.
- Li, Jianzhuo, Xueqi Fu, Subing Cao, Jing Li, Shu Xing, Dongying Li, Yan Dong, et al. (2018). Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). *The Journal of Biological Chemistry* 293 (33): 12719–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003075>.
- Li, M., Dang, D., Liu, L., Xi, N., and Wang, Y. (2017). Atomic Force Microscopy in Characterizing Cell Mechanics for Biomedical Applications: A Review. *IEEE Trans Nanobioscience* 16, 523–540. <https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2714462>.
- Liao, R.S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., and Raj, G.V. (2013). Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol* 2, 187–196. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07>.
- Liu, W.-J., Zhao, G., Zhang, C.-Y., Yang, C.-Q., Zeng, X.-B., Li, J., Zhu, K., Zhao, S.-Q., Lu, H.-M., Yin, D.-C., et al. (2020). Comparison of the roles of estrogens and androgens in breast cancer and prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 121, 2756–2769. <https://doi.org/10.1002/jcb.29515>.

- Liu, Y.-L., Chou, C.-K., Kim, M., Vasisht, R., Kuo, Y.-A., Ang, P., Liu, C., Perillo, E.P., Chen, Y.-A., Blocher, K., et al. (2019). Assessing metastatic potential of breast cancer cells based on EGFR dynamics. *Sci Rep* 9, 3395. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37625-0>.
- Lucas-Herald, A.K., Alves-Lopes, R., Montezano, A.C., Ahmed, S.F., and Touyz, R.M. (2017). Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 131, 1405–1418. <https://doi.org/10.1042/CS20170090>.
- Lucio, M., Lima, J.L.F.C., and Reis, S. (2010). Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. *CMC* 17, 1795–1809. <https://doi.org/10.2174/092986710791111233>.
- Lyalkin, S.A., Verevkin, N.O., Alekseyenko, O.O., and Syvak, L.A. (2020). Prognostic role of androgen receptor expression in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Exp Oncol* 42, 140–143. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14579>.
- Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., and Rodriguez-Cuevas, S. (2017). Clinical and pathological features of breast cancer in a population of Mexico. *Cirugía y Cirujanos* 85, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2017.05.010>.
- Martens-Uzunova, E.S., Kusuma, G.D., Crucitta, S., Lim, H.K., Cooper, C., Riches, J.E., Azad, A., Ochiya, T., Boyle, G.M., Southey, M.C., et al. (2021). Androgens alter the heterogeneity of small extracellular vesicles and the small RNA cargo in prostate cancer. *J Extracell Vesicles* 10, e12136. <https://doi.org/10.1002/jev2.12136>.
- Matthews, Q., Jirasek, A., Lum, J., Duan, X., and Brolo, A.G. (2010). Variability in Raman Spectra of Single Human Tumor Cells Cultured *in Vitro*: Correlation with Cell Cycle and Culture Confluency. *Appl. Spectrosc.*, AS 64, 871–887. .
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the raf/mek/erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>.
- McEwan, I.J., and Brinkmann, A.O. (2000). Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J.M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Méndez-Vilas, A. (2007). Modern research and educational topics in microscopy. Vol. 2: Applications in physical/chemical sciences, techniques (Badajoz: Formatex).
- Metsiou, Despoina Nektaria, Foteini K. Kozaniti, y Despina D. Deligianni. (2021). Engineering Breast Cancer Cells and HUMSCs Microenvironment in 2D and 3D Scaffolds: A Mechanical Study Approach of Stem Cells in Anticancer Therapy. *Bioengineering* 8 (11): 189. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110189>.
- Mika, J.T., Thompson, A.J., Dent, M.R., Brooks, N.J., Michiels, J., Hofkens, J., and Kuimova, M.K. (2016). Measuring the Viscosity of the Escherichia coli Plasma Membrane Using Molecular Rotors. *Biophys J* 111, 1528–1540. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.08.020>.
- Mota, A. de L., Evangelista, A.F., Macedo, T., Oliveira, R., Scapulatempo-Neto, C., Vieira, R.A., and Marques, M.M.C. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett* 13, 4708–4712. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6093>.
- Mughees, M., Chugh, H., and Wajid, S. (2020). Vesicular trafficking–related proteins as the potential therapeutic target for breast cancer. *Protoplasma* 257, 345–352. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01462-3>.
- Muller, D.J. (2008). AFM: A Nanotool in Membrane Biology. *Biochemistry* 47, 7986–7998. <https://doi.org/10.1021/bi800753x>.

- Müller, D.J., and Dufrêne, Y.F. (2011). Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol* 21, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.008>.
- Nagini, S. (2017). Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem* 17, 152–163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>.
- Nguyen, J.N.T., and Harbison, A.M. (2017). Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. In *Molecular Profiling: Methods and Protocols*, V. Espina, ed. (New York, NY: Springer), pp. 71–84.
- Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116, 4707–4714. <https://doi.org/10.1242/jcs.00840>.
- Odle, T.G. (2017). Precision Medicine in Breast Cancer. *Radiol Technol* 88, 401M-421M. .
- Oliveira, R.R.L.D., Albuquerque, D. a. C., Cruz, T.G.S., Yamaji, F.M., and Leite, F.L. (2012). Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications (IntechOpen).
- Olson, M.F., and Sahai, E. (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 26, 273–287. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9174-2>.
- Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., and Tecalco-Cruz, A.C. (2015). Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP* 18, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.005>.
- Ouadid-Ahidouch, H., and Ahidouch, A. (2008). K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* 221, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9080-6>.
- Peairs, K.S., Choi, Y., Stewart, R.W., and Sateia, H.F. (2017). Screening for breast cancer. *Seminars in Oncology* 44, 60–72. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.02.004>.
- Pelletier, G., Luu-The, V., El-Alfy, M., Li, S., and Labrie, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland. *J Mol Endocrinol* 26, 11–19. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0260011>.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R68. <https://doi.org/10.1186/bcr2635>.
- Provenzano, E., Ulaner, G.A., and Chin, S.-F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin* 13, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>.
- Puech, P.-H., Poole, K., Knebel, D., and Muller, D.J. (2006). A new technical approach to quantify cell–cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy* 106, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2005.08.003>.
- Qian, Xian-Ling, Yi-Hang Pan, Qi-Yuan Huang, Yu-Bo Shi, Qing-Yun Huang, Zhen-Zhen Hu, y Li-Xia Xiong. (2019). Caveolin-1: a multifaceted driver of breast cancer progression and its application in clinical treatment. *OncoTargets and therapy* 12, 1539–52. <https://doi.org/10.2147/OTT.S191317>.
- Raicu, V., and Popescu, A. (2008). Cell Membrane: Structure and Physical Properties. In *Integrated Molecular and Cellular Biophysics*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 73–99.
- Raposo, M., Ferreira, Q., and Ribeiro, P.A. (2007). A guide for atomic force microscopy analysis of soft-condensed matter. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 1, 758–769.
- Runel, G., Lopez-Ramirez, N., Chlasta, J., and Masse, I. (2021). Biomechanical Properties of Cancer Cells. *Cells* 10, 887. <https://doi.org/10.3390/cells10040887>.

- Sahai, Erik, Raquel Garcia-Medina, Jacques Pouysségur, y Emmanuel Vial. (2007). Smurf1 Regulates Tumor Cell Plasticity and Motility through Degradation of RhoA Leading to Localized Inhibition of Contractility. *The Journal of Cell Biology* 176 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605135>.
- Sato, K., Adachi, T., Ueda, D., Hojo, M., and Tomita, Y. (2007). Measurement of local strain on cell membrane at initiation point of calcium signaling response to applied mechanical stimulus in osteoblastic cells. *Journal of Biomechanics* 40, 1246–1255. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.05.028>.
- Schiffer, C.A., Bohlke, K., Delaney, M., Hume, H., Magdalinski, A.J., McCullough, J.J., Omel, J.L., Rainey, J.M., Rebullá, P., Rowley, S.D., et al. (2018). Platelet Transfusion for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 36, 283–299. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.1734>.
- Shen, Y., Yang, F., Zhang, W., Song, W., Liu, Y., and Guan, X. (2017). The Androgen Receptor Promotes Cellular Proliferation by Suppression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *CPB* 43, 2047–2061. <https://doi.org/10.1159/000484187>.
- Shwetabh Singh, S.S. (2013). Microscopic Image Analysis of Nanoparticles by Edge Detection Using Ant Colony Optimization. *IOSR-JCE* 11, 84–89. <https://doi.org/10.9790/0661-1138489>.
- Smith, T., and Batur, P. (2020). Prescribing testosterone and DHEA: The role of androgens in women. *Cleve Clin J Med* 88, 35–43. <https://doi.org/10.3949/ccjm.88a.20030>.
- So, A.I., Hurtado-Coll, A., and Gleave, M.E. (2003). Androgens and prostate cancer. *World J Urol* 21, 325–337. <https://doi.org/10.1007/s00345-003-0373-9>.
- Sok, M., Šentjerc, M., Schara, M., Stare, J., and Rott, T. (2002). Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* 73, 1567–1571. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)03458-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(02)03458-6).
- Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J.-I., Hirakawa, H., Ohuchi, N., and Sasano, H. (2007). In situ production of sex steroids in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol* 40, 121–127. <https://doi.org/10.1007/s00795-007-0365-8>.
- Szlasa, W., Zendran, I., Zalesińska, A., Tarek, M., and Kulbacka, J. (2020). Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr* 52, 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>.
- Takagi, K., Miki, Y., Nagasaki, S., Hirakawa, H., Onodera, Y., Akahira, J., Ishida, T., Watanabe, M., Kimijima, I., Hayashi, S., et al. (2010). Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. *Endocr Relat Cancer* 17, 415–430. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0257>.
- Takahashi, Y. (2018). Scanning Electrochemical Microscopy. *Compendium of Surface and Interface Analysis* 551–556. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6156-1_89.
- Tamagawa, H., and Morita, S. (2014). Membrane Potential Generated by Ion Adsorption. *Membranes* 4, 257–274. <https://doi.org/10.3390/membranes4020257>.
- Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., and Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36, 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>.
- Téllez-Plancarte, A. (2019). Detección de HER2 en células de carcinoma de mama mediante sustratos funcionalizados. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Téllez-Plancarte, A., Haro-Poniatowski, E., Picquart, M., Morales-Méndez, J.G., Lara-Cruz, C., Jiménez-Salazar, J.E., Damián-Matsumura, P., Escobar-Alarcón, L., and Batina, N. (2018). Development of a Nanostructured Platform for Identifying HER2-Heterogeneity of Breast Cancer Cells by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nanomaterials (Basel)* 8, E549. <https://doi.org/10.3390/nano8070549>.

- Tiefenbacher, K., and Daxenbichler, G. (2008). The Role of Androgens in Normal and Malignant Breast Tissue. *Breast Care (Basel)* 3, 325–331. <https://doi.org/10.1159/000158055>.
- Tonietto, L., Gonzaga, L., Veronez, M.R., Kazmierczak, C. de S., Arnold, D.C.M., and Costa, C.A. da (2019). New Method for Evaluating Surface Roughness Parameters Acquired by Laser Scanning. *Sci Rep* 9, 15038. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51545-7>.
- Uscanga-Perales, G.I., Santuario-Facio, S.K., Sanchez-Dominguez, C.N., Cardona-Huerta, S., Muñoz-Maldonado, G.E., Ruiz-Flores, P., Barcenas-Walls, J.R., Osuna-Rosales, L.E., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J.F., et al. (2019). Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from Northeastern Mexico. *Oncol Lett* 17, 3581–3588. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9984>.
- Velegol, S.B., Pardi, S., Li, X., Velegol, D., and Logan, B.E. (2003). AFM imaging artifacts due to bacterial cell height and AFM tip geometry. *Langmuir* 19, 851–857.
- Venema, C.M., Bense, R.D., Steenbruggen, T.G., Nienhuis, H.H., Qiu, S.-Q., van Kruchten, M., Brown, M., Tamimi, R.M., Hospers, G.A.P., Schröder, C.P., et al. (2019). Consideration of breast cancer subtype in targeting the androgen receptor. *Pharmacol Ther* 200, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.005>.
- Villarreal-Garza, C., Weitzel, J.N., Llacuachaqui, M., Sifuentes, E., Magallanes-Hoyos, M.C., Gallardo, L., Alvarez-Gómez, R.M., Herzog, J., Castillo, D., Royer, R., et al. (2015). The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 150, 389–394. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3312-8>.
- Wang, C., Pan, B., Zhu, H., Zhou, Y., Mao, F., Lin, Y., Xu, Q., and Sun, Q. (2016a). Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* 7, 46482–46491. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10208>.
- Wang, C.-C., Lin, J.-Y., and Lee, C.-H. (2005). Membrane ripples of a living cell measured by non-interferometric widefield optical profilometry. *Opt. Express*, OE 13, 10665–10672. <https://doi.org/10.1364/OPEX.13.010665>.
- Wang, J., Wan, Z., Liu, W., Li, L., Ren, L., Wang, X., Sun, P., Ren, L., Zhao, H., Tu, Q., et al. (2009a). Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosens Bioelectron* 25, 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.011>.
- Wang, X., Wang, Y., Chen, Z.G., and Shin, D.M. (2009b). Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *Cancer Res Treat* 41, 1–11. <https://doi.org/10.4143/crt.2009.41.1.1>.
- Wang, X., Gérard, C., Thériault, J.-F., Poirier, D., Doillon, C.J., and Lin, S.-X. (2015). Synergistic control of sex hormones by 17 β -HSD type 7: a novel target for estrogen-dependent breast cancer. *J Mol Cell Biol* 7, 568–579. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv028>.
- Wang, Y., Xu, C., Jiang, N., Zheng, L., Zeng, J., Qiu, C., Yang, H., and Xie, S. (2016b). Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning* 38, 558–563. <https://doi.org/10.1002/sca.21300>.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>.
- Wishart, G.C., Rakha, E., Green, A., Ellis, I., Ali, H.R., Provenzano, E., Blows, F.M., Caldas, C., and Pharoah, P.D.P. (2014). Inclusion of KI67 significantly improves performance of the predict prognostication and prediction model for early breast cancer. *BMC Cancer* 14, 908. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-908>.
- Won, K.-A., and Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol* 57, 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>.

- Wright, A.S., Thomas, L.N., Douglas, R.C., Lazier, C.B., and Rittmaster, R.S. (1996). Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* 98, 2558–2563. <https://doi.org/10.1172/JCI119074>.
- Wu, S., Altenried, S., Zogg, A., Zuber, F., Maniura-Weber, K., and Ren, Q. (2018). Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation. *ACS Omega* 3, 6456–6464. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00769>.
- Xu, M., Yuan, Y., Yan, P., Jiang, J., Ma, P., Niu, X., Ma, S., Cai, H., and Yang, K. (2020). Prognostic Significance of Androgen Receptor Expression in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Breast Cancer* 20, e385–e396. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.01.002>.
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., and Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research* 22, 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
- Zalba, S., and ten Hagen, T.L.M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 52, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>.
- Zarif, Jelani C., Laura E. Lamb, Veronique S. Schulz, Eric A. Nollet, y Cindy K. Miranti. (2015). Androgen receptor non-nuclear regulation of prostate cancer cell invasion mediated by Src and matriptase. *Oncotarget* 6 (9): 6862–76.
- Zbiral, B., Weber, A., Iturri, J., Vivanco, M. d. M., and Toca-Herrera, J.L. (2021). Estrogen Modulates Epithelial Breast Cancer Cell Mechanics and Cell-to-Cell Contacts. *Materials (Basel)* 14, 2897. <https://doi.org/10.3390/ma14112897>.
- Zhao, S., Zuo, W.-J., Shao, Z.-M., and Jiang, Y.-Z. (2020). Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Annals of Translational Medicine* 8, 499–499. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.194>.
- Zhu, A., Li, Y., Song, W., Xu, Y., Yang, F., Zhang, W., Yin, Y., and Guan, X. (2016). Antiproliferative Effect of Androgen Receptor Inhibition in Mesenchymal Stem-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem* 38, 1003–1014. <https://doi.org/10.1159/000443052>.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00106

Matrícula: 2202900639

Efecto de los andrógenos sobre la rugosidad, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de cáncer de mama triple-negativas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de noviembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
- DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
- DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
- DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: YESSSENIA MARTINEZ ORTIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



YESSSENIA MARTINEZ ORTIZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

VOCAL

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

SECRETARIA

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ