



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biología Experimental

"Estudio topológico de la incorporación de nanoesferas de oro sobre la superficie de la membrana plasmática de células de cáncer de mama"

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

PRESENTA

BIOL. EXP. CARLOS LARA CRUZ

CODIRECTORES

Dr. Nikola Batina

Dr. Pablo Damián Matsumura

ASESORES

M. En B. E. Leticia González Núñez

Dra. Eva Ramón Gallegos

México D.F., Diciembre 2011

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular perteneciente al Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, así como en el laboratorio de Endocrinología Molecular adscrito al Departamento de Biología de la Reproducción de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los Drs. Nikola Batina y Pablo G. Damián Matsumura.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT con registro 001481, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

El alumno Carlos Lara Cruz fue apoyado con la beca otorgada por parte del CONACYT con el No. de registro 233333/No. CVU: 330292.

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES:

Dr. Nikola Batina

Departamento de Química.

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

bani@xanum.uam.mx

Dr. Pablo G. Damián Matsumura

Departamento de Biología de la reproducción.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

pgdm@xanum.uam.mx

ASESORES:

M. En B. E. Leticia González Núñez

Departamento de Biología de la reproducción.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

gnleti@yahoo.es

Dra. Eva Ramón Gallegos

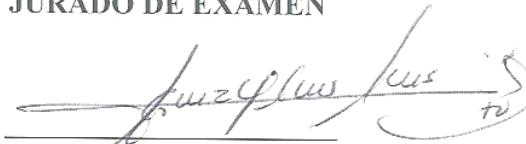
Departamento de Morfología.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Unidad Zacatenco.

eramon68@hotmail.com

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**Estudio topológico de la incorporación de nanoesferas de oro sobre la superficie de la membrana plasmática de células de cáncer de mama**”. El examen se realizó el día 02 del mes de diciembre de 2011.

JURADO DE EXAMEN



PRÉSIDENTE

Dr. José Luis Gómez Olivares

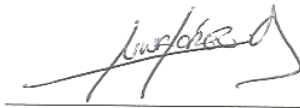
Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
gool@xanum.uam.mx



SECRETARIO

Dra. Eva Ramón Gallegos.

Profesora-Investigadora, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Unidad Zacatenco. ramon68@hotmail.com.



VOCAL

Dr. Armando Luna López

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Investigación Básica. Instituto Nacional de Geriátria. allbioexp@yahoo.com



VOCAL

M. en B.E. Leticia Gonzales Núñez.

Profesor Asociado Nivel D. Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. gnleti@yahoo.com.es.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme dado la oportunidad de formarme como profesionista de alto nivel, crecer como persona y por brindarme el conocimiento sobre las enfermedades relacionadas con el cáncer. Por darme la oportunidad de involucrarme en campos de la ciencia como la Nanotecnología.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura y al Dr. Nikola Batina, por su confianza, infinito apoyo, paciencia, por sus consejos y sobre todo por su amistad, a la Dra. Eva Ramón Gallegos y a la Maestra Melina Tapia Tapia por su enseñanza y conocimiento aportados a este trabajo de investigación, a los Mestros en Biología Experimental Leticia González Núñez y Javier Jiménez Salazar por su apoyo, consejos, enseñanzas, paciencia y por su valiosa amistad. A los Drs. José Luis Gómez Olivares y Armando Luna López por su apoyo en la revisión, orientación y consejos en la presente tesis.

A mi familia con mucho amor; mis hermanas Ana, Roció, Liliana, Alma y Noemí que siempre me apoyaron y sobre todo por su infinita amistad y consejos. Con mucho respeto y amor a mis padres, mis mejores maestros, que nunca dudaron de mí y porque siempre han sido un ejemplo a seguir. Por haberme conducido por el camino del bien. A mis sobrinos que vieron la redacción de este trabajo, sin entenderla y que en algún momento podrán comprender su contenido.

A mis compañeros y amigos, Leticia, Javier, Alicia, Gaby F., Israel, Ximena, Melina, Cristina, Angélica, Paty, Jessica, Pedro, Oscar, Marlen, Aristeo por su amistad y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado a través de la beca de posgrado para el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Nanoesferas de oro	7
2.2 Características estructurales de las células cancerosas	8
2.3 Efecto del estradiol (E ₂) sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células de carcinoma mamario humano MCF-7	9
2.4 Interacción de las AuNP con la membrana plasmática de las células cancerosas	10
2.5 Efecto de las propiedades de superficie de las AuNP con la membrana celular	11
2.6 Cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de células de cáncer inducidos por la interacción con AuNP	12
2.7 Empleo de las AuNP en la terapia contra el cáncer de mama.	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5. HIPÓTESIS	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Material biológico	16
6.2 Medio de cultivo celular	16
6.3 Cultivo de células MCF-7	17
6.4 Sincronización de las células MCF-7	17
6.5 Determinación de ciclina D1 en células MCF-7 por inmunocitoquímica	18
6.6 Preparación de suspensión de nanoesferas de oro en medio de cultivo	18

6.7 Incorporación de las nanoesferas de oro en las células	19
6.8 Caracterización de células MCF-7 por AFM	19
6.8.1 Preparación de placas de Au empleadas como sustrato para AFM.	19
6.8.2 Crecimiento de células MCF-7 en las placas de oro	20
7. Evaluación cuantitativa de las propiedades morfológicas de la membrana plasmática	20
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
9. RESULTADOS	22
9.1 Sincronización del ciclo celular de las células MCF-7	22
9.2 Análisis de la morfología de las células MCF-7 por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	23
9.3 Análisis de rugosidad de la superficie de membrana de células MCF-7 por AFM	27
9.4 Variación de la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 analizadas a diferentes tiempos	29
9.5 Efecto del E ₂ sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7	34
9.6 Efecto de la incubación con AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7	38
9.7 Efecto de las AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 incubadas con E ₂ a diferentes tiempos	42
10. DISCUSIÓN	46
11. CONCLUSIONES	51
12. PERSPECTIVAS	52
13. BIBLIOGRAFÍA	53
14. ANEXOS	61
13.1 Anexo 1. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	56
13.2 Anexo 2. Rugosidad	58
13.3 Anexo 3. Diseño de nanopartículas de oro	59

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica (del idioma inglés Atomic Force Microscopy)
ANOVA	Análisis de Varianza
AuNP	Nanopartículas de oro
CD1	Ciclina D1
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Medio de cultivo propuesto por Eagle y modificado por Dubelcco
E ₂	Estradiol
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético (o su sal de sodio)
G1	Fase G1 del ciclo celular (del idioma inglés Gap 1)
G2	Fase G2 del ciclo celular (del idioma inglés Gap 2)
h	Abreviación de tiempo en horas
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (del idioma inglés Human Epidermal Receptor 2)
M	Fase de mitosis del ciclo celular
MCF-7	Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de Michigan Cancer Fundation)
nm	Nanómetros
PBS	Solución salina de fosfatos (del idioma inglés Phosphate Buffer Solution)
RE	Receptor de estrógenos
RMS[Rq]	Raíz cuadrada de la media (del idioma inglés, root-mean-square)
S	Fase de Síntesis del ciclo celular
SFB	Suero de feto de bovino

SEM	Microscopia de electrónica de transmisión (del idioma inglés Scanning electron microscopy)
TEM	Microscopia electrónica de transmisión (del idioma inglés Transmission electron microscopy)
μm^2	Micrómetro cuadrado

LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS

Figura 1. Representación esquemática de las alteraciones presentes en una célula cancerosa.

Figura 2. Microfotografía (confocal) de la expresión de ciclina D1 en células MCF-7 sincronizadas. Microscopía.

Figura 3. Microfotografía (óptica) de la morfología de las células MCF-7 distribuidas sobre el sustrato de oro.

Figura 4. Microfotografía (AFM) de la morfología una célula MCF-7.

Figura 5. Microfotografía (AFM) de la morfología una célula MCF-7 tratada con E_2 .

Figura 6. Microfotografía (AFM) en 3D de la célula MCF-7 tratada con 1 nM de E_2 .

Figura 7. Microfotografías (AFM) de células MCF-7 sin y con E_2 . Diferencias en la superficie de la membrana medida por las condiciones del eje z.

Figura 8. Microfotografía (AFM) de célula MCF-7 control.

Figura 9. Microfotografía (AFM) de una región de la membrana citoplasmática de una célula MCF-7.

Figura 10. Microfotografías (AFM) de las regiones citoplasmáticas de las células MCF-7 control observadas en diferentes fases del ciclo celular.

Figura 11. Microfotografías (AFM) de célula MCF-7 incubada con E_2 .

Figura 12. Microfotografías (AFM) de diferentes regiones de membrana de la célula MCF-7 incubadas con E_2 .

Figura 13. Microfotografías (AFM) de AuNP localizadas sobre la superficie del sustrato de oro.

Figura 14. Microfotografías (AFM) y análisis de la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7 incubadas con AuNP.

Figura 15. Microfotografías (AFM) y análisis de la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7 incubadas con AuNP y E_2 .

Gráfica 1. Análisis de la rugosidad en las diferentes regiones analizadas de una célula MCF-7.

Gráfica 2. Análisis de la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 tratadas con el vehículo e incubadas a diferentes tiempos.

Gráfica 3. Análisis de la rugosidad de la membrana plasmática de la célula MCF-7 tratada con E₂.

Gráfica 4. Influencia del E₂ sobre la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 a diferentes tiempos de incubación.

Gráfica 5. Análisis de la rugosidad de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratadas con AuNP.

Gráfica 6. Comparación de la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7 que estuvieron expuestas a las AuNP con respecto al control.

Gráfica 7. Comparación de la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7 que fueron expuestas al E₂ y E₂ con AuNP a diferentes tiempos.

Gráfica 8. Comparación de los valores de RMS[Rq] en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 con los diferentes tratamientos (Vh, E₂, AuNP y E₂+ AuNP) incubadas a diferentes tiempos.

Tabla 1. Valores de rugosidad (RMS[Rq]) de la superficie de las regiones analizadas de la membrana plasmática de una célula MCF-7 en la fase G1 del ciclo celular.

Tabla 2. Valores de rugosidad (RMS[Rq]) de la superficie de la membrana plasmática de una célula MCF-7 en diferentes fases del ciclo celular.

Tabla 4. Valores de rugosidad (RMS[Rq]) de la superficie de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratadas con AuNP a diferentes tiempos.

Tabla 5. Concentrado de todos los valores promedio de rugosidad (RMS[Rq]) de la superficie de la membrana plasmática del efecto generado por los diferentes tratamientos en células MCF-7.

RESUMEN

El número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama sigue aumentando y los tratamientos para contrarrestar esta enfermedad aún son poco específicos y muy agresivos, por lo que exigen mayores esfuerzos en el estudio de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico temprano. La nanotecnología ofrece herramientas especiales para el estudio de moléculas localizadas en la superficie celular que están involucradas con el desarrollo de esta enfermedad.

En este estudio se analizaron los cambios que ocurren en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7, que provienen de un carcinoma mamario humano, cuando son incubadas con nanopartículas de oro (AuNP) de 20 nm de diámetro a diferentes tiempos de incubación. Los resultados revelaron que las AuNP inducen cambios en los valores de rugosidad de la membrana plasmática a las 12 h de incubación con respecto a las células que testigo (incubadas con etanol). Se ha propuesto que el contacto de las AuNP con la superficie de la membrana plasmática ocasiona cambios cinéticos y mecánicos de las estructuras que la componen, especialmente de los lípidos, proteínas y estructuras glicosiladas, generando modificaciones en su rugosidad lo que a su vez aumenta la velocidad de captación hacia el interior de la célula. También se empleó estradiol (E_2) como estimulante de la rugosidad de la membrana celular ya que esta hormona genera cambios en la estructura de la membrana plasmática al estimular la síntesis de diversas proteínas que se anclan en ella, y generar la modificación de algunos fosfolípidos que componen la bicapa lipídica.

Al realizar los experimentos donde se incubaron a las células MCF-7 con la mezcla de AuNP y E_2 , los resultados mostraron que la rugosidad de la membrana plasmática

aumenta con forme avanza el tiempo de incubación y las fases del ciclo celular en ambos casos se incrementa con respecto a las células testigo cuando se hicieron por separado y el incremento inducido por la combinación AuNP y estradiol es menor al observado por la inducción con estradiol sólo, sin embargo no es estadísticamente significativo.

Los resultados descritos en este trabajo proporcionan información importante para comprender la dinámica de los cambios presentes en la membrana de las células de carcinoma mamario cuando éstas son incubadas con AuNP, en ausencia y presencia de estradiol. Los resultados obtenidos presentan datos relevantes para entender las interacciones y la eficiencia de las AuNP con la superficie de la membrana plasmática al generar cambios significativos en la rugosidad analizados por AFM. Como las AuNP juegan un papel crucial en la terapia contra el cáncer de mama, es importante comprender sus interacciones y procesos de internalización a fin de orientar de manera eficiente los sitios específicos en las células.

ABSTRACT

The last tendency in the development of the breast cancer show that number of cases is raising, as well that this particular form of cancer becomes more aggressive and effecting younger population, than years before. Therefore, all over the world new strategies and new way of treatments are under development to prevent or stop such accelerated progress of the breast cancer. Nanotechnology with new multidisciplinary approach offers a new hope and new tools to study and fight this illness. One of the most developed nanotechnology approach in the case of the breast cancer is a treatment using the gold nanoparticles (AuNP).

Here in this thesis, a study based on the change in the surface cell morphology (surface roughness) of the MCF-7 cancer cells, during the treatment with gold nanoparticles (AuNP, 20 nm diameter), are presented. The measurements were conducting using the highly sensitive Atomic Force Microscopy (AFM) technique. The cell surface roughness was monitored during different time of treatments: 6, 12, 16 and 24 h.

Results clearly show some time dependent behavior, with significant changes after 12 h, which is related and discussed in the thesis in the respect of the kinetic and mechanism of the AuNP uptake. Additional very interesting data were obtained with MCF-7 cancer cells cultivated in the presence of the hormone: estradiol (E_2), as a factor which enhances the surface roughness of the cell membrane. In general it influences the synthesis of different proteins (lipoproteins) and causes the changes in the structure and composition of the membrane double layer. As mass important we noticed that such new

type of cell membrane does not show significant changes in the surface roughness during the AuNP treatments, independently of the time.

In order to monitor surface roughness of the MCF-7 cell membrane, a new methodology was developed, as well of cultivation of the cancer cell suitable for the AFM analysis. In many aspects it is a pioneering work, with great potential. The obtained results are very important as a base for the future studies and understanding of the mechanism and kinetics of the incorporation of different nanoparticles in the biological systems. The results reported here show difference for NP treatments for case of the breast cancer previously treated with the hormone estradiol and one without such treatment. It could reflect significantly on the efficiency of the NP therapy.

1. INTRODUCCIÓN

Los avances en la terapéutica contra el cáncer han proporcionado nuevos tratamientos que se han incorporado en la práctica oncológica [Mozafari *et al.*, 2009]. Las terapias empleadas para contrarrestar los efectos del cáncer de mama involucran la aplicación de quimioterapias y radioterapias, las cuales no discriminan en gran medida entre células cancerosas y células normales induciendo a la toxicidad sistémica y ocasionando múltiples efectos adversos [Cardoso *et al.*, 2009]. En consecuencia, la aplicación sistémica de estos medicamentos con frecuencia causa efectos secundarios adversos en otros tejidos que están alejados de la zona afectada por el cáncer provocando daños severos que involucran supresión de células del sistema inmunológico, cardiomiopatías y neurotoxicidad, lo que limita la dosis máxima permitida de la droga debido al efecto no específico [Shapiro y Recht, 2001]. Aunque muchos de los nuevos medicamentos utilizados para tratar el cáncer de mama han tenido buenos resultados, el potencial clínico de esos fármacos se limita por mecanismos fisiopatológicos de resistencia y al comportamiento de la biodistribución del compuesto químico. En el caso de un tumor, el transporte del fármaco se rige también por las propiedades fisicoquímicas del intersticio celular como pH, temperatura, etc., y de las propiedades de la molécula, es decir tamaño, configuración, carga e hidrofobicidad [Chari, 2007]. Una de las ventajas que presentan los fármacos empleados en la terapia contra el cáncer de mama es su tamaño pequeño, dándoles la posibilidad de interactuar con algunas estructuras presentes en la célula al tener dimensiones entre 2 y 10 μm donde muchas de éstas son blancos farmacológicos.

La nanotecnología, se define como la ciencia y la ingeniería implicadas en el diseño, síntesis, caracterización y uso de materiales y dispositivos, cuya organización funcional más pequeña está en el rango del nanómetro. La incursión de la nanotecnología está revolucionando muchas áreas de la medicina y la biología, incluyendo el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama, entre los que se encuentran el área biomédica, bionanomateriales usados como marcadores y en el transporte de fármacos, donde se incluyen diversos tipos de nanopartículas como los liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbón, nanobarras, nanoesferas y nanocápsulas [Zharov *et al.*, 2005; Silva, 2004]. Algunas estructuras subcelulares son mucho más pequeñas y se localizan en el tamaño de los nanómetros (1 nm; 1×10^{-9} m) como las proteínas y ácidos nucleicos que tienen tamaños entre los 1 y 5 nm, comparables con las dimensiones que presentan algunas de las nanopartículas más pequeñas hechas por el hombre (como los puntos cuánticos que tienen dimensiones de 1 nm de diámetro) [Paull *et al.*, 2003]. Para poder utilizarlas como herramientas eficaces en el transporte puntual de fármacos, es importante comprender los mecanismos involucrados en la interacción de las nanopartículas con la membrana de la célula y su internalización, ya que muchos tipos de sistemas de liberación de fármacos con diferentes nanomateriales han sido desarrollados para su aplicación contra el cáncer, tal es caso de las nanopartículas de oro (AuNP) [Nisha y Pramod, 2008], las cuales han despertado gran interés debido a sus propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas, propiedades que dependen en gran medida a su tamaño y forma, características que vienen determinadas por las condiciones experimentales empleadas en su obtención y de esta manera se producen cambios considerables en las propiedades ópticas del material (emisión de luz en las diferentes longitudes de onda), al disminuir el tamaño de partícula a escala nanométrica [Caralero, 2009].

2. ANTECEDENTES

2.1 *Nanoesferas de oro.*

Las AuNP han sido objeto de intensa investigación debido a sus características únicas en comparación con cualquier otro tipo de nanopartículas. Una de estas propiedades se debe a la resonancia del plasmón superficial (RPS), este efecto se trata de un fenómeno físico que surge de la interacción entre una onda electromagnética y los electrones de conducción de este metal, efecto que puede ser aprovechado para detectar y destruir a células cancerosas por calor cuando son funcionalizadas con algún ligando en su superficie [Hu *et al.*, 2006]. Representan una alternativa altamente atractiva para el transporte de fármacos al interior celular con una alta tasa de especificidad por tener dimensiones muy pequeñas, funciones de estabilización en la superficie celular y por la liberación controlada del fármaco [Han *et al.*, 2007]. Sin embargo, la biodistribución de estas nanoesferas se ve limitada por una serie de variables, un ejemplo de ello es la interacción con la superficie de la membrana plasmática debido a sus condiciones hidrofóbicas o hidrofílicas [Bergen *et al.*, 2006]. Alguno de los usos de las AuNP se centra en el diagnóstico clínico empleadas como agentes de contraste para el análisis por Rayos-X, Resonancia Magnética Nuclear y Tomografía Axial Computarizada, estas nanopartículas presentan cualidades especiales en la emisión de luz, por sus propiedades de resonancia del plasmón. Por ejemplo, el oro tiene mayor absorción de energía y emisión de luz, dentro de la longitud de onda del infrarojo, que el yodo cuando se introduce a hueso y en otros tejidos, proporcionando mayor contraste, lo que lleva a administrar una baja dosis de radiación [Hainfeld *et al.*, 2006].

2.2 Características estructurales de las células cancerosas

El éxito en el tratamiento contra el cáncer de mama utilizando AuNP depende de las características de la membrana plasmática de las células contra las que están dirigidas. Por ejemplo, las células cancerosas se originan en respuesta a mutaciones de ciertos genes, por lo que se sugiere que cambios en el genotipo de las células de cáncer ocasionan alteraciones esenciales en la fisiología de la célula, dictando de manera colectiva el crecimiento maligno. Estas alteraciones se clasifican en la 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]. Estos procesos permiten que las células proliferen, migren a sitios secundarios y, en algunos casos, adquieran mecanismos resistentes a la quimioterapia y a multidroga [Lavi y Liscovitch, 2001].

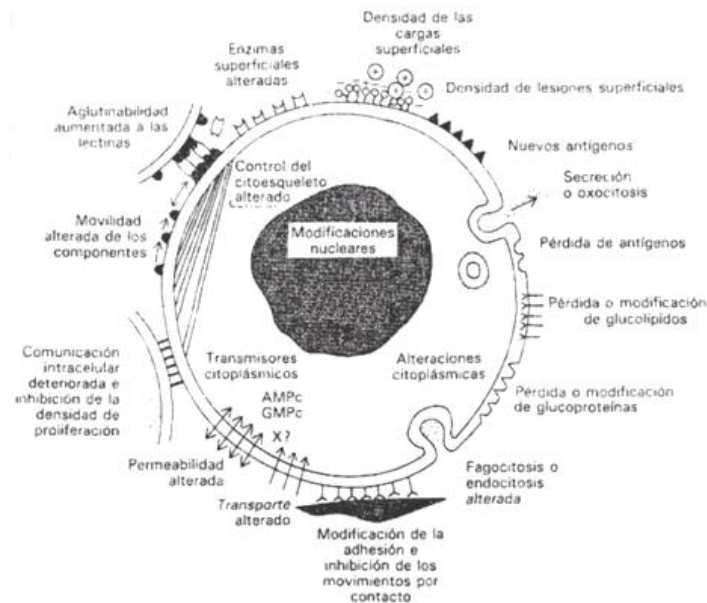


Figura 1. Representación esquemática de las alteraciones presentes en una célula cancerosa. Se observan alteraciones de la membrana plasmática por la transformación neoplásica de la célula [Karp, 1987].

Uno de los cambios en las membranas plasmáticas de células cancerosas involucra modificaciones en la composición de moléculas que constituyen su bicapa lipídica, como ejemplo esta la relación que existe en la cantidad de ácidos grasos insaturados que se encuentran incrementados en la mayoría de los fosfolípidos que componen la bicapa lipídica de las células de carcinoma mamario. La cantidad de fosfatidil etanolamina y de fosfatidil colina están elevadas de manera significativa y las concentraciones de esfingomiélin se encuentran reducidas en las células cancerosas, en comparación con las células normales [Punnonen *et al.*, 1998]. Además de los cambios que se presentan en la composición de los fosfolípidos de la membrana, también se presenta baja expresión de moléculas de adhesión celular como las integrinas [Mukhopadhyay *et al.*, 1999; Maemura *et al.*, 1995], de β -catenina, E-cadherina [Pierceall *et al.*, 1995; Hiraguri *et al.*, 1998], sobreexpresión de algunos receptores de factores de crecimiento [Sheikh *et al.*, 1992; Jakowlew *et al.*, 1997]; como HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2) [Szollosi *et al.*, 1995; Roetger *et al.*, 1998] y de los receptores de estrógenos (RE) [Hall *et al.*, 1990].

2.3 Efecto del estradiol (E_2) sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células de carcinoma mamario humano MCF-7.

Se ha observado que los estrógenos inducen modificaciones en la membrana plasmática de células de carcinoma mamario MCF-7 mediadas por RE que se encuentran anclados a estructuras como las caveolas y microdominios [Nichols, 2003]. Esta evidencia indica que la interacción del RE con su ligando cambia la rugosidad de la membrana plasmática al inhibir la síntesis de caveolina, efecto que puede estar relacionados con la interacción del RE y proteínas que modulan la señal intracelular y remodelación del

citoesqueleto [Razandi *et al.*, 2002]. Otros investigadores han determinado que el E₂ 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 [Ahidouch y Ahidouch, 2008].

También se ha demostrado que el E₂ juega un papel importante en la modificación de la membrana plasmática de células MCF-7, estimulando la síntesis de proteínas que son exportadas a la membrana a través de la activación del gen que codifica a la proteína Ciclina D1 involucrado en la síntesis de la proteína que promueve el paso de G1 a S del ciclo celular, proceso importante de sobrevivencia celular [Levin, 2002].

2.4 Interacción de las AuNP con la membrana plasmática de las células cancerosas.

El éxito de las AuNP en los procesos de internalización depende de la adecuada interacción con la superficie de la membrana en la célula y de sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño, forma y carga eléctrica [Unfried *et al.*, 2007.]. Se ha demostrado que la rugosidad de la membrana plasmática de células RAT2 (células embrionarias de ratón) se ve alterada cuando a éstas se les administraron AuNP funcionalizadas con un polímero cationico en su superficie, provocando la formación de pequeños agujeros nanométricos en la membrana plasmática y aumentando la permeabilidad. Los resultados de dicha investigación proponen que las nanopartículas funcionalizadas con el polímero podrían haberse internalizado a través de un proceso de endocitosis [Hong *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2006].

En otros estudios se demostró que las AuNP provocan alteraciones en la membrana plasmática de algunos tipos de líneas celulares de cáncer de mieloma múltiple al interactuar con la superficie de la misma y al ser internalizadas hacia diferentes regiones celulares. Se observó que las AuNP que ingresaron hacia el interior del núcleo podían inhibir el ciclo celular al haber alta concentración de estas nanoestructuras, provocando la desestabilización del citoesqueleto y la destrucción de las células, evitando así el proceso de metástasis de algunas de ellas [Bhattacharya *et al.*, 2007].

2.5 Efecto de las propiedades de superficie de las AuNP con la membrana celular.

Se ha demostrado que el efecto de la modificación en la superficie de las AuNP (funcionalización) influye en las condiciones de captación por las células, provocando cambios significativos en la membrana plasmática, generando citotoxicidad en líneas celulares pulmonares [Uboldi *et al.*, 2009]. Por otro lado, también se han analizado las interacciones entre nanopartículas poliméricas y membranas biológicas artificiales utilizando técnicas de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) con el fin de obtener una visión real de las interacciones a nivel nanométrico que hay entre las nanoesferas aniónicas con éstas. Se demostró que la interacción provoca cambios en la superficie de dicha membrana llevando a la formación de porosidad por la modificación en la estructura de la bicapa lipídica [Leroueil *et al.*, 2007].

2.6 Cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de células de cáncer inducidos por la interacción con AuNP.

Por otro lado, se han investigado las modificaciones que generan sobre la membrana de células de carcinoma cervicouterino (HeLa) cuando son expuestas a nanoesferas de oro de diferentes tamaños y se determinó que aquellas con diámetro menores a 20 nm son más fáciles de captar debido a que modifica la rugosidad de la superficie celular mediado por los procesos de endocitosis para la internalización de las nanopartículas. En estos experimentos se comprobó que a diferentes tiempos de exposición, nanoesferas de oro de 14 y 20 nm de diámetro presentan alta captación por las células HeLa a las 6 horas cuando fueron comparadas con una línea celular no cancerosa (HaCat) [Chithrani *et al.*, 2005].

En otros estudios se analizó el cambio en la rugosidad de la membrana plasmática de diferentes líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (HeLa), hepático (HEPG2) y de glía de ratón (C6) para determinar el efecto que tienen las AuNP sobre la rugosidad. Los resultados mostraron que la administración de estas nanopartículas sobre las células modificaba la rugosidad de la superficie membranal de las células. El análisis por AFM reveló que la rugosidad en la superficie de la membrana cambia al exponer las AuNP a diferentes tiempos [Wanga *et al.*, 2009].

En resultados anteriores de nuestro laboratorio se demostró que la interacción y distribución de AuNP 40 nm de diámetro en la superficie de la membrana plasmática de células HeLa alteró la rugosidad de dichas membranas. Durante el cultivo celular se realizó la incorporación de nanopartículas a 15 minutos, 4, 8, 16 y 24 horas. Los resultados mostraron que los valores de rugosidad (RMS[Rq]) se incrementó al triple durante las

primeras 4 horas debido a la acumulación de nanopartículas en la superficie de la membrana plasmática. En tratamientos prolongados, el valor de RMS[Rq] decrece lo que sugiere que las nanopartículas se han incorporado en la célula [Tapia *et al.*, 2009].

2.7 Empleo de las AuNP en la terapia contra el cáncer de mama.

Actualmente se están empleando a las AuNP como agentes terapéuticos y en el diagnóstico temprano. En estudios con líneas celulares de cáncer mamario humano, se ha observado que la captación celular de estas nanopartículas en células MCF-7 provoca efectos citotóxicos en comparación con una línea celular con fenotipo no canceroso (células MCF-10), ya que las AuNP fueron funcionalizadas con moléculas orgánicas que permiten mayor interacción con la superficie de la membrana plasmática de las células cancerosas en comparación con las células no malignas. Análisis por microscopía electrónica de transmisión mostraron que las células cancerosas absorben las AuNP debido al grupo funcional con el que fueron recubiertas y la distribución de las nanopartículas en el citoplasma. Estudios *in vitro* señalan que los efectos citotóxicos después de la acumulación de estas nanopartículas en las células cancerosas se presentaba a las 24, 48 y 72 h, y posteriormente se irradiaron con rayos-X para calentar a las AuNP y de esta forma acelerar la muerte de las células por calor [Kong *et al.*, 2008].

3. *Justificación.*

El empleo de nanopartículas en terapias contra el cáncer promete grandes avances para la medicina, especialmente en el proceso de transporte y liberación de fármacos de forma dirigida y específica, así como para el diagnóstico oportuno.

La membrana plasmática de células cancerosas presenta grandes diferencias estructurales y funcionales con respecto a células normales. Estas células se diferencian de las normales en muchas características importantes que incluyen la pérdida en el control de la diferenciación, evasión de la muerte por apoptosis, incremento en la invasividad a otros estratos, disminución en la sensibilidad a fármacos, entre otras. Se han realizado estudios del proceso de incorporación de fármacos antitumorales a través de la membrana plasmática tomando como ventaja las modificaciones estructurales de la bicapa lipídica.

En este trabajo de investigación se planteó la posibilidad de estudiar las modificaciones topológicas que produce la interacción de las nanoesferas de oro en la membrana plasmática de células de carcinoma mamario, utilizando como modelo experimental la línea celular MCF-7 (derivada de un adenocarcinoma mamario de tipo epitelial), la cual representa un buen modelo de estudio para los objetivos de este trabajo de tesis.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar los cambios topológicos, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario MCF-7 al ser expuestas a nanoesferas de oro de 20 nm mediante Microscopía de Fuerza Atómica.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de la proteína Ciclina D1 por inmunocitoquímica.
2. Analizar la homogeneidad, a nivel nanométrico, de la rugosidad de superficie de diferentes zonas de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario.
3. Cuantificar los cambios en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 en ausencia o presencia de nanoesferas de oro de 20 nm.
4. Determinar los cambios topológicos, a nivel nanométrico, de la membrana plasmática de las células MCF-7 inducidos por la exposición a nanoesferas de oro de 20 nm, a estradiol o a ambos en función del tiempo.

5. Hipótesis

La exposición de nanoesferas de oro de 20 nm a células MCF-7 inducirá cambios en la rugosidad de su membrana semejantes a los observados por la exposición a estradiol.

6. Material y métodos.

6.1 Material Biológico.

Se empleó como modelo de investigación a la línea celular MCF-7 de carcinoma mamario humano, la cual originalmente proceden de un adenocarcinoma de mama humano aislado de la efusión pleural de una mujer caucásica de 69 años. Esta línea celular es positiva para ambos receptores de estrógenos por lo que al adicionar estradiol al medio proliferan a mayor velocidad. Además, presenta fenotipo característico de células luminales del epitelio ductal de la mama [American Tissue Cell Culture, Rockville-MD, EUA].

6.2 Medio de cultivo celular.

Las células se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), libre de rojo de fenol debido a su actividad estrogenica, esterilizado por filtración a través de membranas de Nylon con poro de 0.22 μm (Corning, NY, EUA). Al medio de cultivo se ajustó a pH de 7.4 y se le agregó suero de feto de bovino (SFB) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) al 10%, solución de aminoácidos no esenciales a concentración final de 100 μM , piruvato de sodio 100 μM , L-glutamina 2 mM, así como solución comercial de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 $\mu\text{g/mL}$) y el antimicótico anfotericina B (250 ng/mL; Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

6.3 Cultivo de células MCF-7.

Se sembraron 100,000 células MCF-7 en botellas de cultivo con una superficie de 25 cm³ y se mantuvieron en incubadora a 37° C, con atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, hasta que la población celular alcanzó el 70% de confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon adicionándoles una solución de tripsina al 0.25% y 1 nM de ácido etilén diamino tetraacético (EDTA). La suspensión celular resultante se centrifugó a 1000 x g durante 10 min., se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo nuevo y se resembraron bajo las condiciones experimentales requeridas para realizar los estudios correspondientes.

6.4 Sincronización de las células MCF-7.

Con la finalidad de realizar los estudios correspondientes en la misma fase del ciclo celular, las células MCF-7 fueron sincronizadas con la técnica de privación secuencial de SFB [Lewis *et al.*, 2001] por períodos de 24 h de la siguiente manera. Primero se sembraron 1000 células con medio DMEM adicionando SFB al 5 % en placas de 6 pozos y se incubaron por 24 h con las mismas condiciones de temperatura y de atmósfera antes mencionadas. Posteriormente se retiró el medio de los pozos y se reemplazó por medio DMEM adicionado con SFB al 2.5 %, y finalmente al 0.625% durante 24 h cada cambio. La determinación de la fase del ciclo celular se valoró por la presencia de la proteína ciclina D1 que es específico para la fase S, mediante inmunocitoquímica y observado por microscopía confocal. Como control positivo, las células MCF-7 fueron incubadas con 1 nM de E₂ el cual induce la expresión de la proteína ciclina D1 y la progresión del ciclo celular [Altucci *et al.*, 1996]. Al finalizar el tratamiento durante 24 h se procedió a fijarlas con etanol absoluto.

6.5 Determinación de Ciclina D1 en células MCF-7 por Inmunocitoquímica.

La presencia de Ciclina D1 en las células MCF-7 se utilizó para determinar el porcentaje de células en la fase del ciclo celular G1 ó S, ya que la concentración de ciclina D1 aumenta para regular la progresión en el punto de control G1 a S [Resnitzky *et al.*, 1994]. Para tal efecto, las células MCF-7 fijadas en etanol absoluto se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS) con 2% de Tween. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda a 37°C, para bloquear las peroxidasas endógenas mediante la adición de H₂O₂ al 0.9% durante 7 minutos y se lavaron posteriormente con PBS/Tween. A continuación se añadió el anticuerpo primario anti-Ciclina D1 (Dako, Carpinteria, CA) en concentración 1:100, se incubó por 30 minutos en la cámara húmeda, se realizó un tercer lavado antes de adicionar un anticuerpo secundario acoplado a un fitocromo C (FITC; Biotin-Link, mouse/rabbit). Se hizo un último lavado con PBS/Tween y se prosiguió a revelar con el sistema de detección estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako, Carpinteria, CA) y finalmente se visualizó la muestra mediante el cromógeno diaminobencidina (DAB; Sigma, St. Louis, MO) el cual se inactivó con cloro diluido en agua (1:10). La placa se observó por microscopía confocal, el total de campos visualizados fue de 5 y el porcentaje total de células que presentaron la expresión de ciclina D1 es el promedio de dichos campos.

6.7 Preparación de suspensión de nanoesferas de oro en medio de cultivo.

Se preparó una solución de AuNP de 20 nm en concentración de 20 µg/mL de medio de cultivo. Previamente, la solución concentrada de AuNP se sonicó durante 15 min para permitir su dispersión y posteriormente se adicionó el volumen requerido al medio de

cultivo (DMEM con SFB al 0.625%). Las AuNP vienen en presentación de oro coloidal suspendidas en H₂O para empleo exclusivo de investigación y no para uso diagnóstico [BBI International, reino unido].

6.8 Incorporación de las nanoesferas de oro en las células.

Se sembraron aproximadamente 100,000 células MCF-7 en botellas de cultivo alcanzando el 70% de confluencia. Las células se incubaron con medio conteniendo las AuNP con las células a diferentes tiempos (6, 12, 16 y 24 h) para determinar las condiciones de la rugosidad de la membrana plasmática en cada uno de los tiempos.

Los tratamientos realizados se presentan en la siguiente tabla:

GRUPO	Vehículo	1 nM de E₂	20 µg/mL de	1 nM de E₂ + 20
EXPERIMENTAL	(etanol 50 µl		AuNP	µg/mL de AuNP
	(absoluto))	(2)	(3)	(4)
	(1)			

6.9 Caracterización de células MCF-7 por AFM.

6.9.1 Preparación de placas de Au empleadas como sustrato para AFM.

Las MCF-7 fueron fijadas en placas de 1 cm². Este sustrato se emplea debido a que es una placa con superficie monocristalina de oro (Au (111)) y consiste en un soporte rectangular de vidrio de 2 mm de espesor, una película de cromo de 2000 nm que recubre el cristal y que funcionó como capa de adhesión para la película de Au de 2000 nm. Las

placas se utilizaron estériles por autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión (120°C) y se guardaron.

6.9.2 Crecimiento de células MCF-7 en las placas de oro.

Las placas de oro fueron colocados en cajas Petri que contenía 3 mL de la mezcla de ampicilina-estreptomicina para evitar contaminación fúngica y bacteriana. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se transfirieron las placas de oro en cada uno de los 6 pozos de la placa de cultivo celular y enseguida se adicionaron 100 μ L de la suspensión celular, obtenida por centrifugación mediante el proceso de tripsinización (proceso anteriormente descrito) y se adicionó un volumen final de 300 μ L de DMEM.

Al término de los tratamientos, las células se fijaron por un proceso de deshidratación secuencial con etanol a diferentes concentraciones (40, 50, 60, 70, 80 y 96%) durante 2 minutos en cada concentración y finalmente se analizaron por AFM en modo “tapping” (Anexo 1).

7. Evaluación cuantitativa de las propiedades morfológicas de la membrana plasmática.

Mediante la técnica de AFM se evaluó cuantitativamente la topología superficial de la membrana plasmática de las células MCF-7. La rugosidad de la superficie se analizó mediante el software que viene acompañado con el equipo de AFM-NanoScope III (Veco Inc.). El análisis de la rugosidad de la superficie de membrana, permite encontrar parámetros de diferentes alturas determinadas midiendo el eje “z” (altura). El método para

cuantificar de la rugosidad se basa en el siguiente planteamiento: en un terreno uniformemente plano los vectores perpendiculares a la superficie del mismo serán aproximadamente paralelos y, en consecuencia, presentarán una baja dispersión. Al contrario, en un terreno rugoso, los cambios de pendiente y orientación harán que dichos vectores presenten mayor dispersión [Sagvolden *et al.*, 1999]. Otro parámetro utilizado es la varianza esférica, la cual es un valor estadístico que mide la dispersión de una muestra formada por vectores, es decir, por elementos definidos por una longitud (modulo) y un sentido en un espacio tridimensional. Este valor estadístico puede ser utilizado como indicador de la rugosidad mediante métodos matemáticos que parten de modelos digitales de pendientes y orientaciones.

La rugosidad está representada por [RMS]Rq (root.mean-square/raíz-promedio-cuadrado) y esta dada por la ecuación: $[RMS]Rq = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (Z_i - Z_{ve})^2}$ en donde: Z_{ve} = cálculo del valor promedio en Z dentro de una área delimitada.

Z_i = valor corriente de Z.

N = número de puntos en el área dada.

Los valores de RMS[Rq] son directamente proporcionales a la rugosidad de la superficie.

8. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de una análisis de variancia (ANOVA) para determinar las diferencias entre los grupos con diferentes tratamientos y tiempos de incubación así como una prueba de Tukey para comparar entre cada grupo con diferentes tratamientos y tiempos de incubación. El valor de significancia utilizado fue de $p \leq 0.05$.

9. Resultados

9.1 Sincronización del ciclo celular de las células MCF-7.

Para analizar la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7, primero se sincronizaron y posteriormente se determinó el tiempo en el que la mayor proporción de las células se encontraron en la fase G1/S, que es cuando hay mayor expresión de la proteína cíclica D1. La figura 2 muestra la expresión de dicha proteína y se observa que está presente en más del 90% de las células.

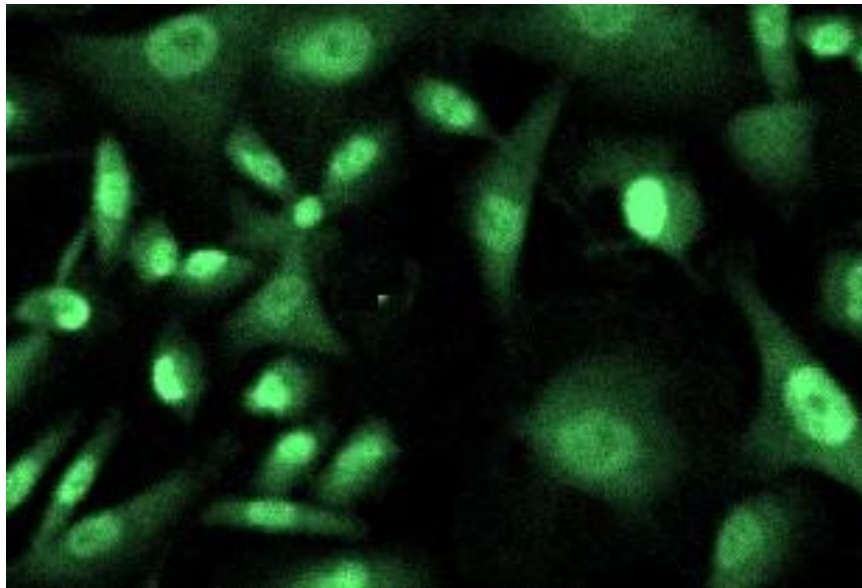


Figura 2. Microscopía confocal de células MCF-7 sincronizada que expresan ciclina D1. La imagen tiene un aumento de 100X.

9.2 Análisis de la morfología de las células MCF-7 por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Con el objetivo de determinar que las células MCF-7 se fijaron al sustrato de oro, se observaron primero por microscopía óptica. La figura 3 muestra la distribución espacial de las células en la placa un área de análisis de $400 \mu\text{m}^2$. Se observa que las células MCF-7 forman redes, además la distribución del soma (cuerpo) y las regiones correspondientes a los filopodios teniendo estos una longitud de 2 a 3 veces más que el soma y en la mayoría de las células pueden tener tres. Cuando una célula MCF-7 no se adhiere de manera correcta a la superficie del sustrato se observa de manera circular y no presenta el alargamiento de las extensiones citoplasmáticas.

El análisis topográfico de la superficie de membrana de células MCF-7 se realizó mediante la técnica de AFM en el modo “tapping”. En este modo la punta de la sonda oscila rápidamente mientras desciende hacia la superficie de la muestra, conforme la punta se acerca a la muestra amplitud de la oscilación disminuye hasta detectar la superficie. La punta, al estar vibrando, toca intermitentemente la superficie, es decir, entra a la parte repulsiva del potencial intermolecular y de este modo la punta está en contacto con la superficie sólo por un tiempo corto, reduciendo la fuerza lateral sobre la punta y el riesgo de producir un daño a la superficie [Hansma *et al.*, 1994]. Primeramente se realizó con medio de cultivo mediante el AFM. En la figura 4A se muestran las estructuras subcelulares como el núcleo y los nucléolos los cuales se distinguen por que se observan con mayor altura que las demás estructuras. El análisis por AFM en el modo altura señala que las zonas más claras de la superficie de la célula, casi blancas, corresponden a las partes más elevadas de la célula en comparación con las zonas más oscuras que representan las

partes bajas de la misma ya que estas imágenes no son ópticas, son una interpretación de la altura determinadas por el barrido de la sonda de la AFM. La figura 4B y 4C muestran el análisis topográfico, la 4B indica la zona de análisis (línea negra y los puntos para medir el modo altura) y la 4C muestra la gráfica de las variables que corresponden a la altura de la superficie celular a lo largo de la línea de análisis.

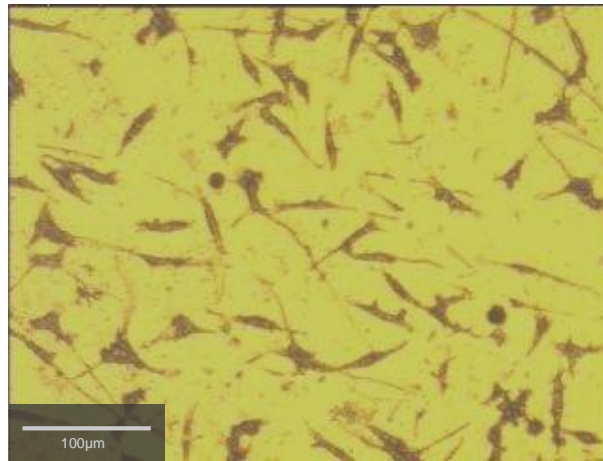


Figura 3. Morfología de las células MCF-7 distribuidas sobre el sustrato de oro. Imagen obtenida por microscopia óptica.

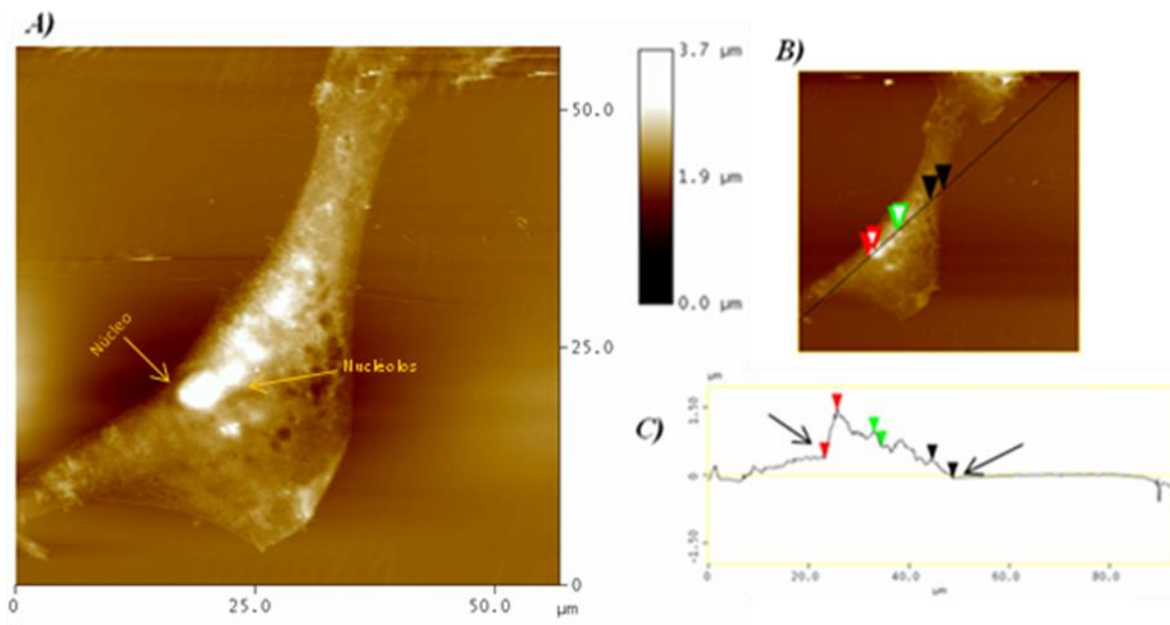


Figura 4. Morfología de una célula MCF-7 por AFM. La imagen (A) muestra las estructuras subcelulares, (B) y (C) muestran el respectivo análisis del perfil topográfico.

En la figura 5 se muestra la micrografía de una célula MCF-7 tratada con 1 nM de E_2 por 24 h. Se observa mayor proporción de volumen en la zona nuclear, aunque no está definido el contorno del núcleo, además se observan elevación de los nucléolos (también indicado por una flecha). Esta información se correlaciona con el análisis del perfil topográfico mostrado en las figuras 5B y 5C, donde se observa la línea trazada sobre la superficie de la célula y los puntos para calcular la altura a lo largo de la zona donde se localizan las estructuras antes mencionadas y su respectiva gráfica.

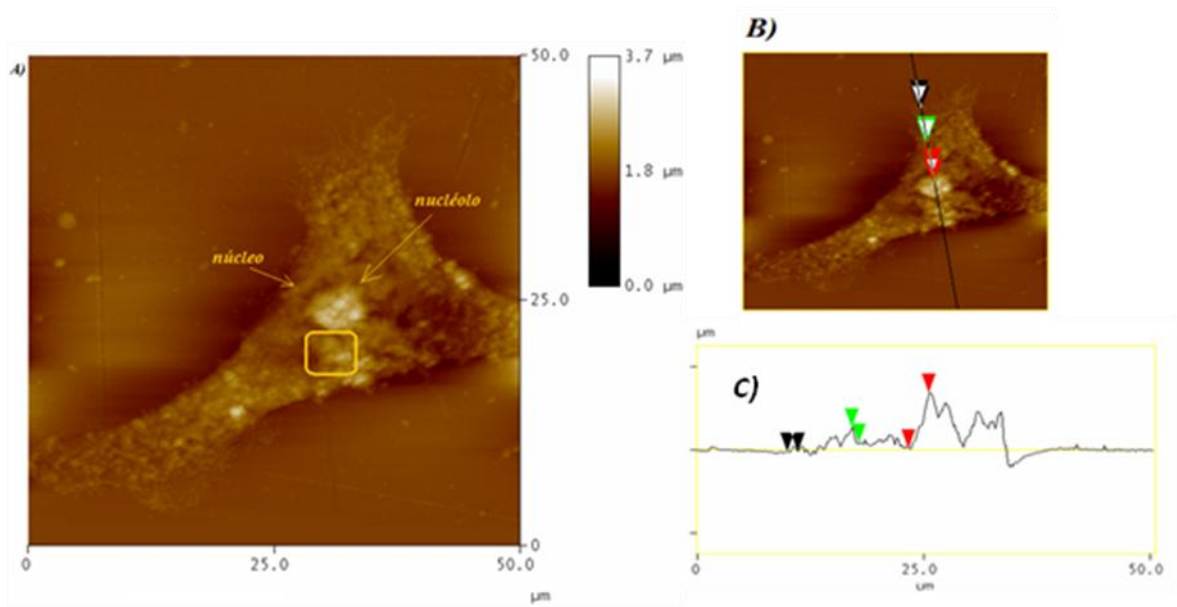


Figura 5. Morfología de una célula MCF-7 tratada con 1 nM de E_2 por 24 h, analizada por AFM. En la imagen en modo altura (A) se observan estructuras subcelulares como el núcleo y nucléolo (flechas y recuadro amarillo), en (B) y (C) muestran línea de análisis para obtener el perfil topográfico.

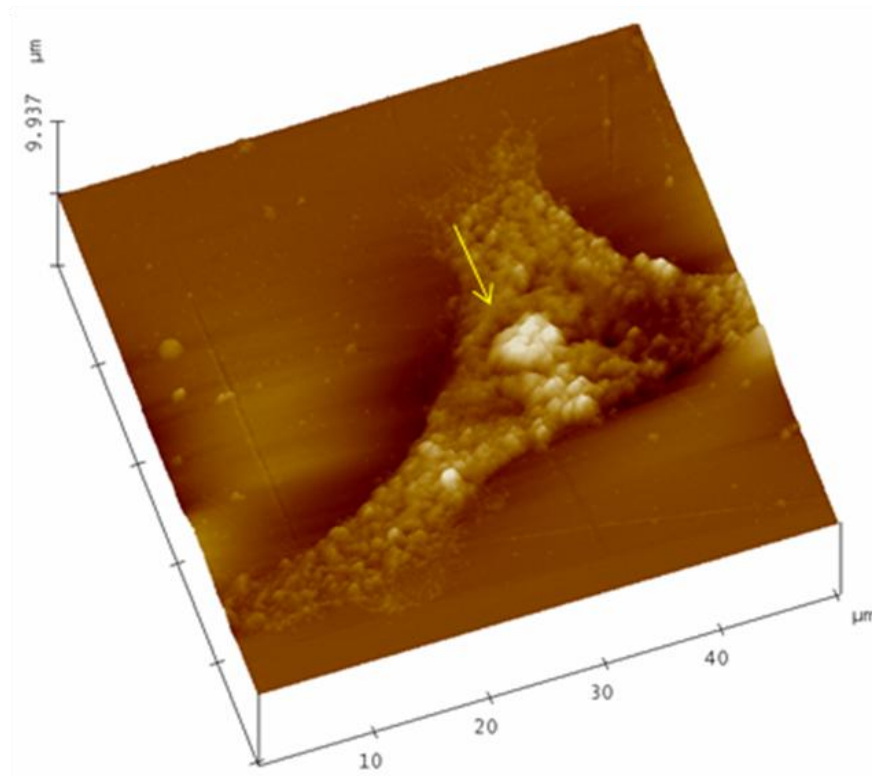
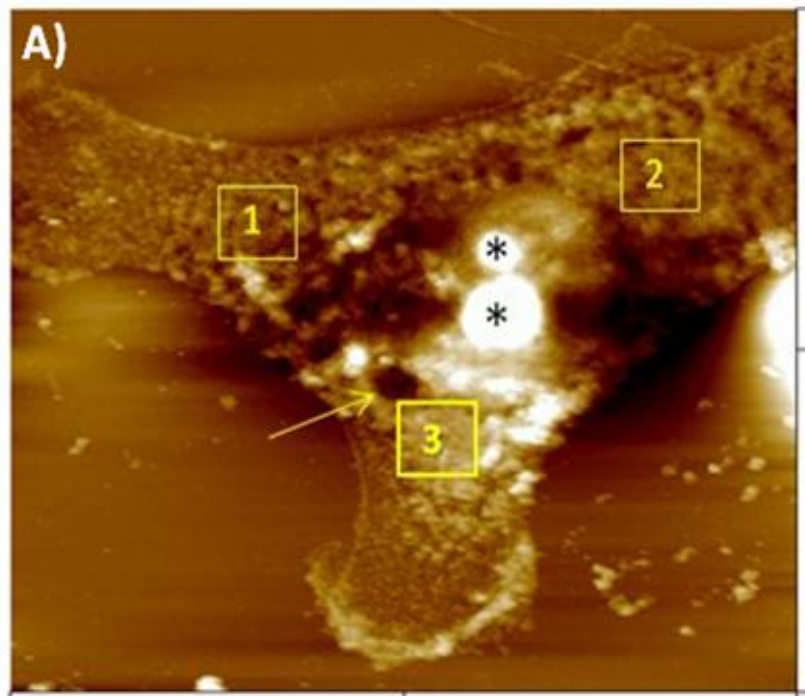


Figura 6. Análisis en 3D de la célula MCF-7 tratada con 1 nM de E₂. En la imagen tridimensional se puede apreciar con mayor precisión las estructuras subcelulares mencionadas en la imagen anterior.

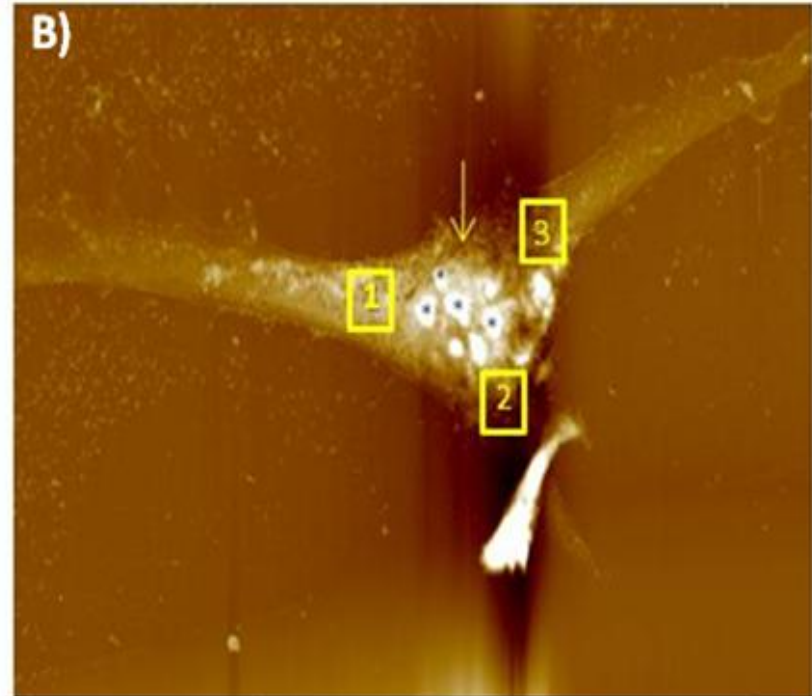
Las ventajas proporcionadas por el AFM con respecto a otras técnicas (por ejemplo SEM o TEM) proporcionan información de la muestra sin requerimientos especiales que destruyan a la misma. Como ya se mencionó en la figura 6 la información de la imagen en 3D de la célula nos muestra la rugosidad de su superficie con respecto a la del substrato donde se encuentra adherida. En la misma imagen, se observó con poco detalle el contorno nuclear que está indicado por la flecha y los nucléolos, mismos que son detectados por su altura (zonas blancas).

9.3 Análisis de rugosidad de la superficie de membrana de células MCF-7 por AFM.

Se realizó el análisis de la superficie de membrana a las células que fueron incubadas con los diferentes tratamientos para determinar los cambios que generan la administración de E₂ y AuNP. La figura 7 muestra dos células MCF-7 que fueron incubadas con el vehículo (testigo) (A) y con 1 nM de E₂ (B) a las 12 h, analizada por AFM, donde se puede observar el borde del núcleo señalado por las flechas, los asteriscos indican la presencia de nucléolo. Al obtenerse imágenes a mayor resolución en áreas de barrido de 5 μm² de regiones citoplasmáticas, se pudo observar con mejor detalle la textura de la superficie de membrana. A partir de estas imágenes topográficas se obtuvieron imágenes tridimensionales (3D), en las cuales se observaron claramente los rasgos topográficos de la membrana. Este experimento se realizó para determinar la homogeneidad de los valores de rugosidad analizados en diferentes regiones de la membrana de las células MCF-7.



MCF-7 sin E2



MCF-7 con E2

Figura 7. Célula MCF-7 sin y con E₂ en el tiempo 12 h. En las imágenes se observan diferencias en la superficie de la membrana medida por las condiciones del eje z. Las zonas con un color más claro representan las partes más elevadas de la célula como lo son los nucléolos (asteriscos). La flecha señala el borde del núcleo y los recuadros enumerados indican las zonas donde se realizaron acercamientos para determinar los valores de rugosidad.

9.4 Variación de la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 analizadas a diferentes tiempos.

En la figura 8 se muestran la imagen de una célula incubada con el vehículo (etanol) durante 6 h. En ella se puede observar la morfología de la célula analizada por AFM

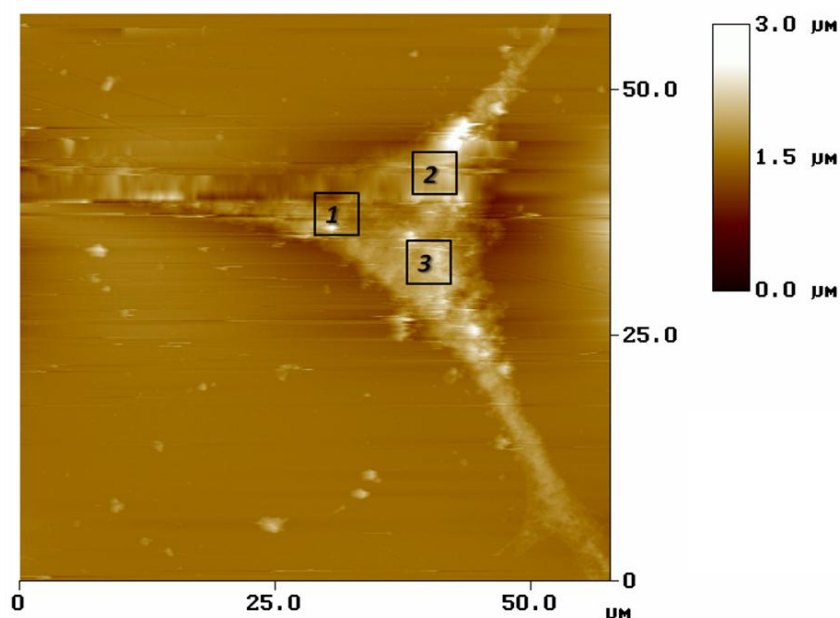


Figura 8. *Célula MCF-7 incubada con etanol (Vh) por 6 h. Los recuadro negros enumerados indican las regiones de la membranas que fueron analizadas para determinar las condiciones de rugosidad.*

La figura 9 muestra la imagen a alta resolución ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) de una región citoplasmáticas de la célula MCF-7 que fue incubada con el vehículo. La figura 9A muestra la superficie donde se puede observar zonas elevadas con dimensiones de aproximadamente 654 nm de altura. La imagen (B) es una representación tridimensional de la región analizada donde se pueden observar con mayor detalle las condiciones de la rugosidad de la membrana plasmática de la célula.

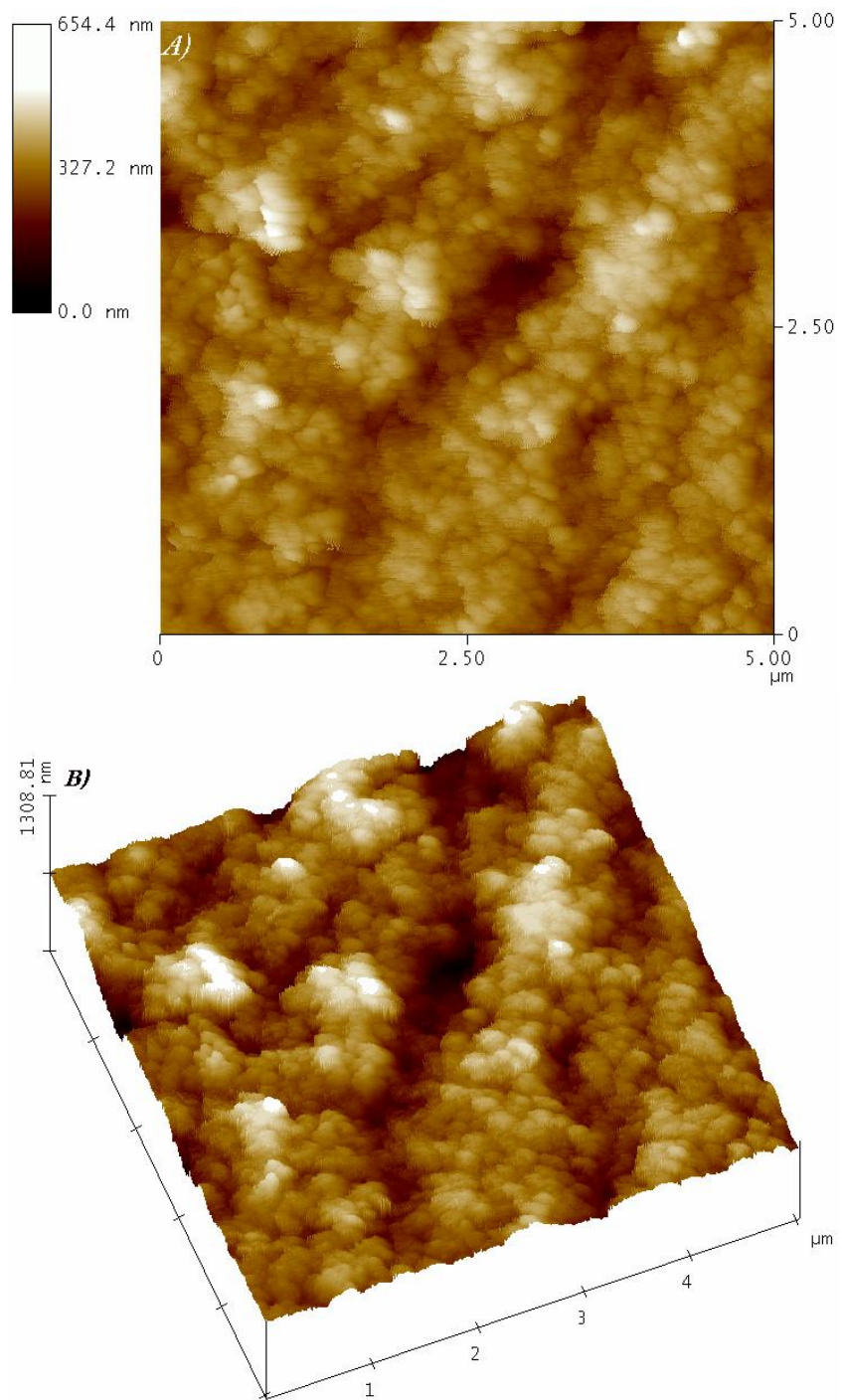
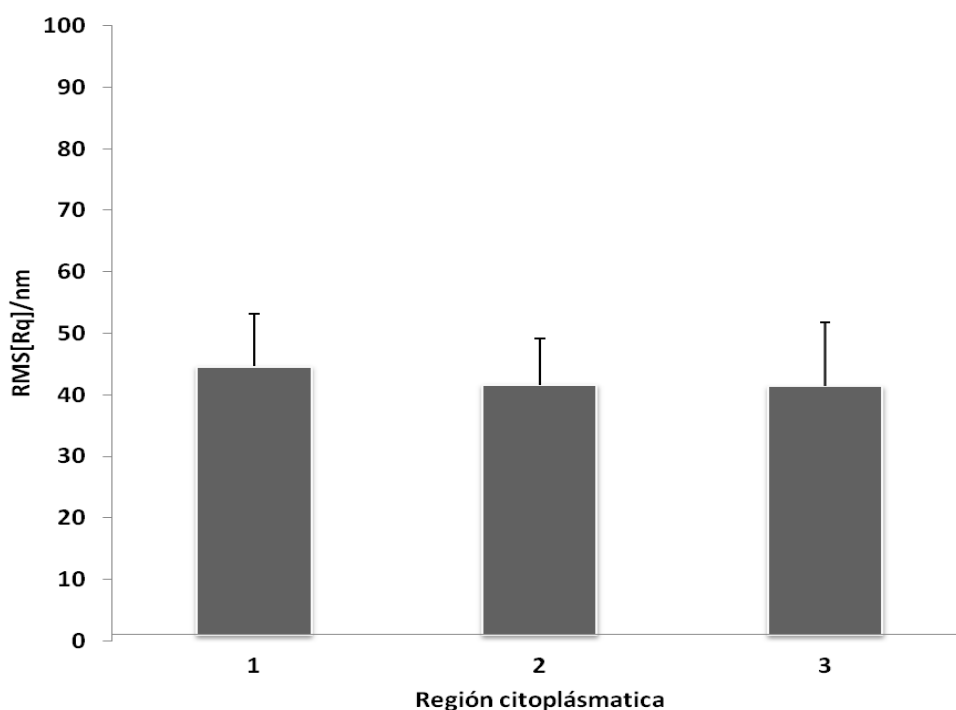


Figura 9. Región de la membrana citoplasmática analizada por AFM de una célula MCF-7. La imagen (A) muestra las condiciones de la rugosidad de la superficie de la membrana en el modo altura, mientras que la figura (B) es una imagen en tres dimensiones donde se puede observar detalladamente la rugosidad de la superficie en un área de barrido de $5 \mu\text{m}^2$.

Tabla 1. Valores de rugosidad de la superficie de las regiones analizadas de la membrana plasmática de una célula MCF-7 incubada con el vehículo por 6 h.

REGIÓN	1	2	3
Valores de rugosidad (RMS[Rq]/nm)	44.6 ± 8.5nm	41.6 ± 7.5 nm	41.4 ± 10.3 nm



Grafica 1. Rugosidad en las diferentes regiones analizadas de una célula MCF-7. Se muestran los valores de rugosidad de cada región citoplásmatica analizada por el AFM.

En la *tabla 2* se indican los valores de RMS[Rq] que corresponden a las rugosidad de la superficie de la membrana plasmática de células MCF-7 expuestas al vehículo. Los resultados indican que la rugosidad de la superficie de las células mostraron cambios significativos comparados a diferentes tiempos de incubación.

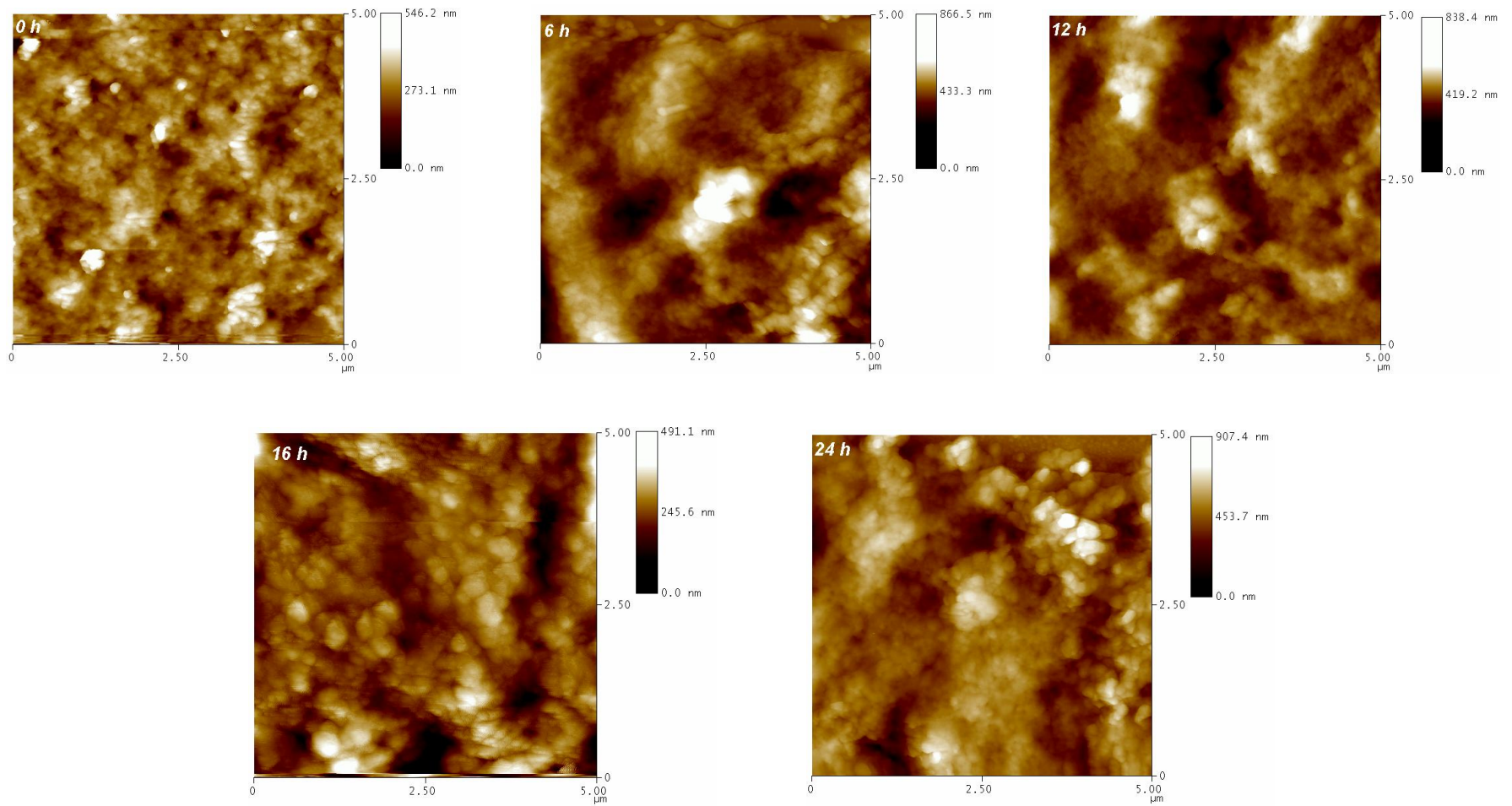
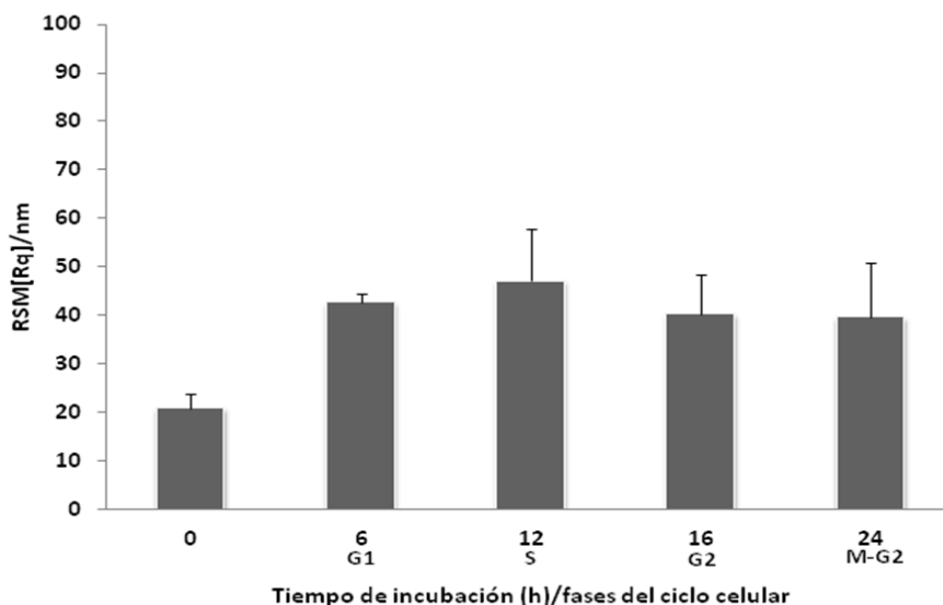


Figura 10. Imágenes de las regiones citoplasmáticas de las células que fueron incubadas con el vehículo a diferentes horas de incubación. Se observa como va cambiando la rugosidad de la superficie de la membrana conforme avanza el tiempo de incubación. Se muestra en la imagen de 6 y 12 h (fases G1 y S) como la rugosidad es mas irregular en comparación con las demas imágenes, sobre todo por la presencia de estructuras elevadas (zonas blancas) y regiones porosas.

Tabla 2. Valores de rugosidad de la superficie de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratadas con el vehículo a diferentes tiempos.

Horas de incubación	0	6	12	16	24
RMS[Rq]/nm	20.8 ± 3.1nm	42.57 ± 1.79nm	47.1 ± 10.8nm	40.3 ± 8.1nm	39.53 ± 42nm



Gráfica 2. Rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 tratadas con el vehículo e incubadas a diferentes tiempos. Los resultados muestran los cambios de rugosidad en la membrana conforme avanza el tiempo y la transición de las fases del ciclo celular.

La figura 10 muestra las imágenes de regiones citoplasmáticas de 5 μm x 5 μm donde se observan los cambios de rugosidad a lo largo del ciclo celular de las células MCF-7 analizadas (0 y 6 h= G1; 12 h= S; 16 h= G2 y 24 h= M-G1). En ellas se puede observar los detalles en los cambios de rugosidad en la superficie de membrana.

9.5 Efecto del E_2 sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7.

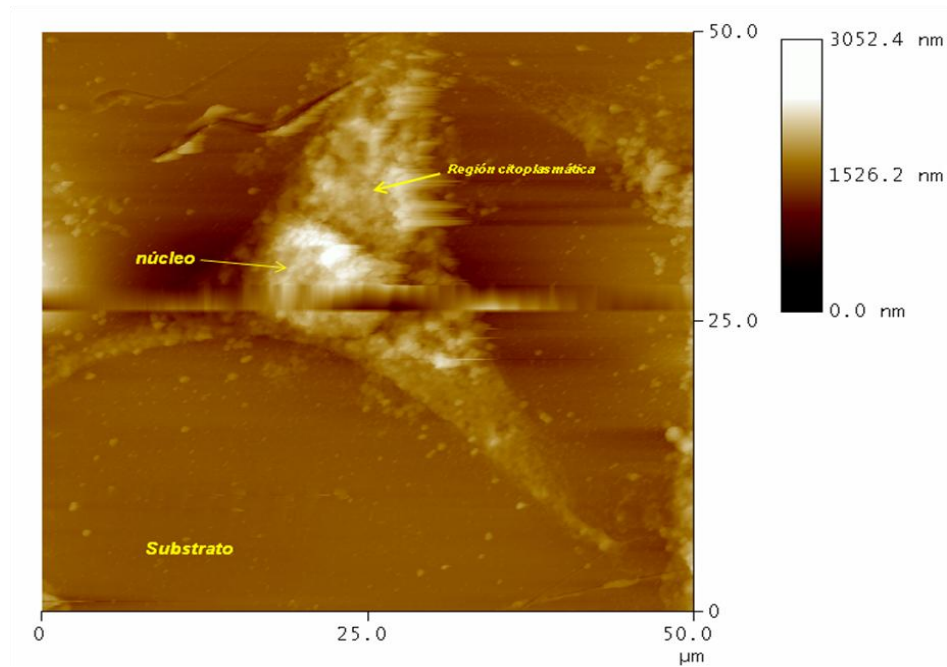


Figura 11. Célula MCF-7 incubada con E_2 por 12 h. Se observa la estructura nuclear que tiene dimensiones en altura de aproximadamente $3 \mu\text{m}$ con respecto a otras zonas de la célula que se encuentran en los $2 \mu\text{m}$ de altura según los datos proporcionados por la barra lateral izquierda de la imagen. Cabe señalar que en la mitad de la imagen se observa una línea producida por interferencia de ruido (efecto mecánico producido por la sonda sobre la superficie).

La figura 11 muestra una célula MCF-7 que fue expuesta con E_2 por un periodo de incubación de 12 h y la figura 12 muestra micrografías a alta resolución en áreas de barrido de de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de regiones en la membrana que corresponden a la célula descrita anteriormente donde se puede observar cambios en la rugosidad de acuerdo a los valores de RMS[Rq]. Las imágenes A, C y E presentaron valores de 482.5, 706.7 y 586.1 nm (datos obtenidos por la microscopía no graficados) respectivamente. Las imágenes B, D y F son una representación tridimensional donde se pueden observar con mayor detalle los cambios en la rugosidad de la membrana.

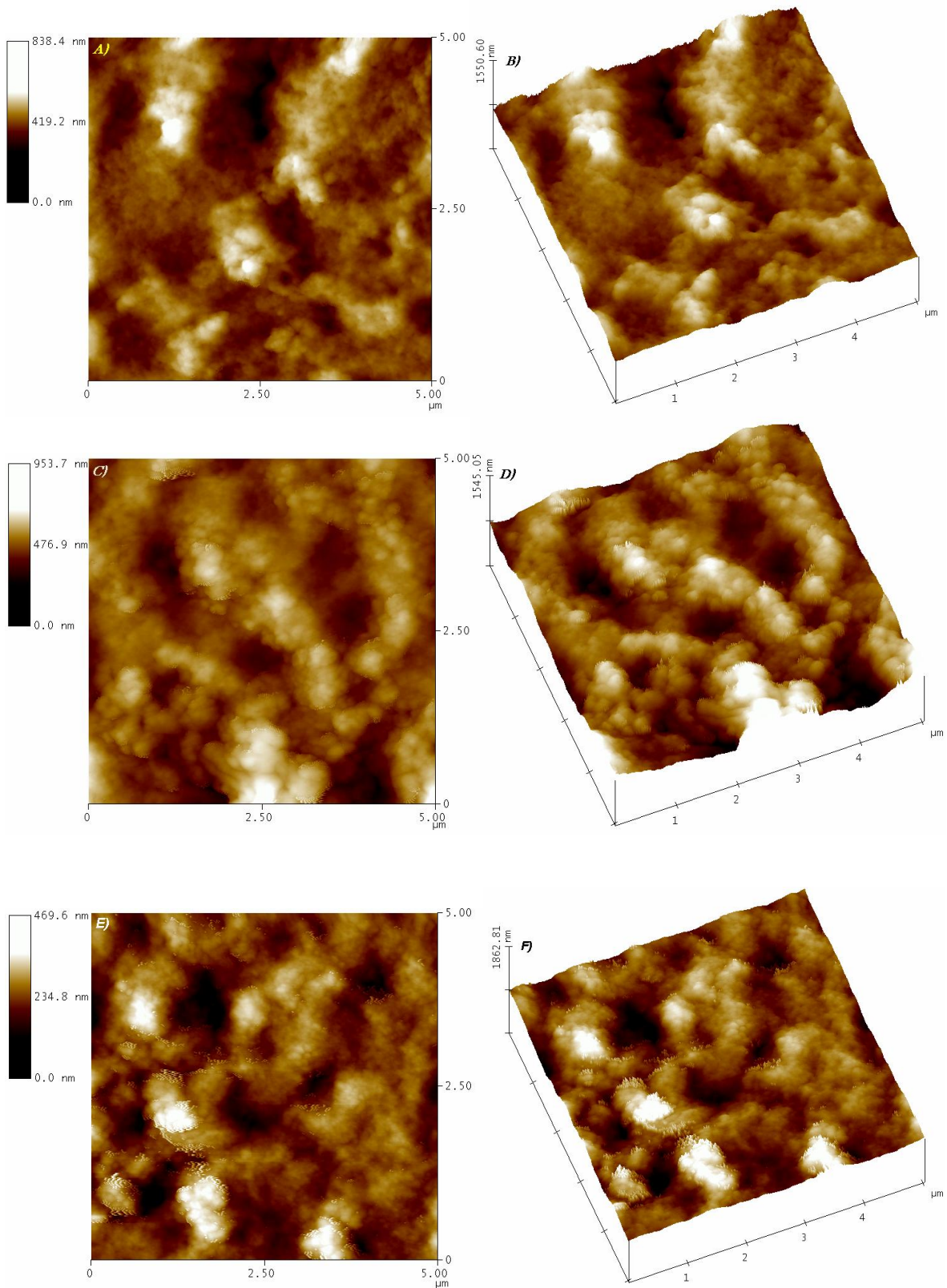
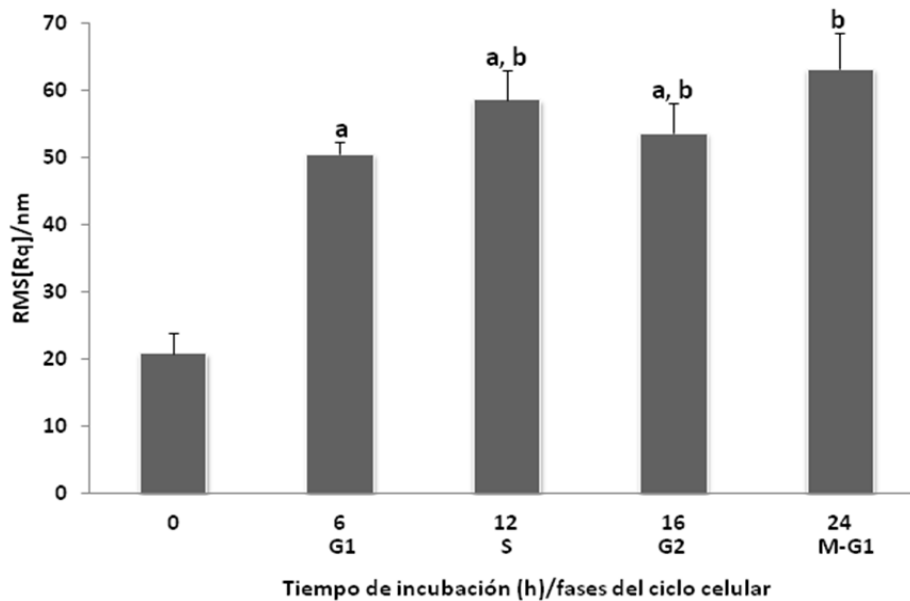
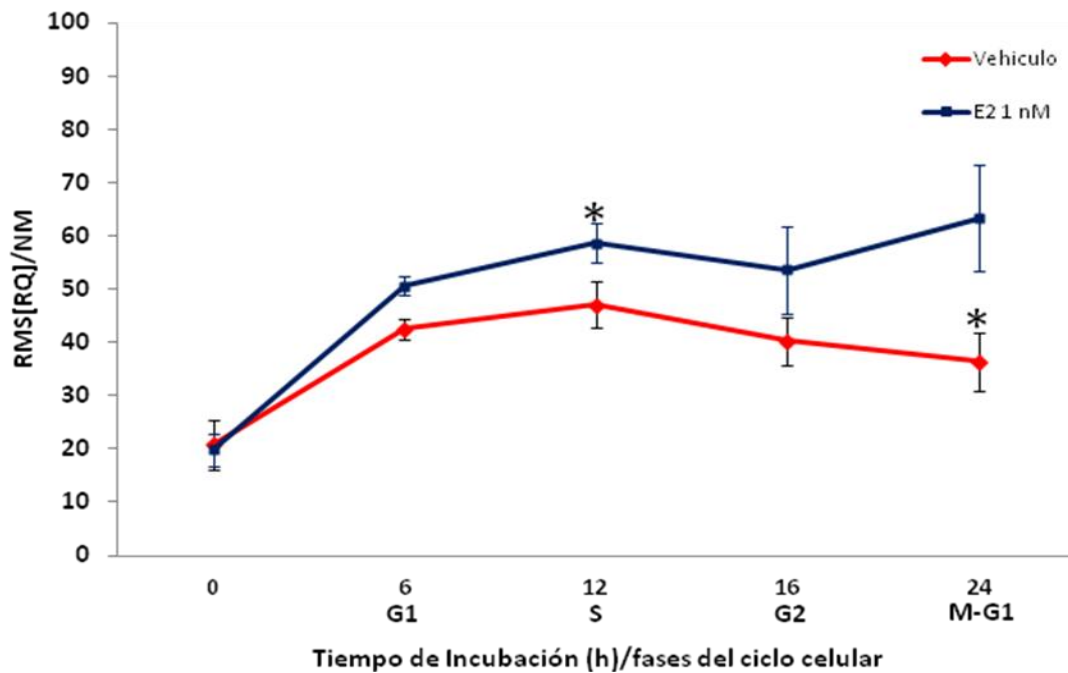


Figura 12. Análisis de las regiones membranales de la célula MCF-7 incubadas con E_2 por 12 h. las imágenes A, C y E corresponden a las imágenes de altura donde se pueden observar las diferencias en la rugosidad en tanto que las imágenes B, D y F muestran tridimensionalmente los detalles de la rugosidad.

La rugosidad, medida por el RMS[Rq], de las células MCF-7 incubadas con 1 nM de E₂ aumenta en función del tiempo. Como se puede observar en la gráfica 3, el valor de rugosidad más alto es de 63.2 nm que corresponde a la célula incubada por 24 h con la hormona. En los tiempos de incubación que corresponden a los tiempos 6, 12 y 16 h el promedio en el valor de rugosidad se encontro entre 50 y 59 nm mientras que al tiempo 0 el valor de rugosidad se encontro en los 20.8 nm.



Gráfica 3. Rugosidad de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratada con E₂. Los resultados muestran los cambios en la rugosidad de la membrana cuando las células fueron expuestas E₂ a diferentes tiempos de incubación. $a \neq 0$, $b \neq a$, $b \neq 0$, $a, b \neq a$ y $a, b \neq b$. $P < 0.05$.



Gráfica 4. Influencia del E_2 sobre la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 a diferentes tiempos de incubación. *= $P \leq 0.05$.

La gráfica 4 muestra la comparación del cambio en la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 cuando éstas fueron incubadas con E_2 a diferentes tiempos de incubación en comparación con el vehículo. Los resultados mostraron que el E_2 produce cambios en la rugosidad de la membrana de aproximadamente 63.2 nm a las 24 h en las células en comparación con 47.1 nm mostrados por la célula incubadas con el vehículo a las 12 h que representa el mayor cambio.

9.6 Efecto de la incubación con AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7.

En la figura 13 se muestra la presencia de las nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro depositados sobre la placa de oro donde se crecen las células MCF-7. Como se observa en la imagen, las AuNP se ven dispersas sobre el sustrato. En análisis se realizó por AFM utilizando el modo “tapping” en una superficie de $2.5 \mu\text{m}^2$.

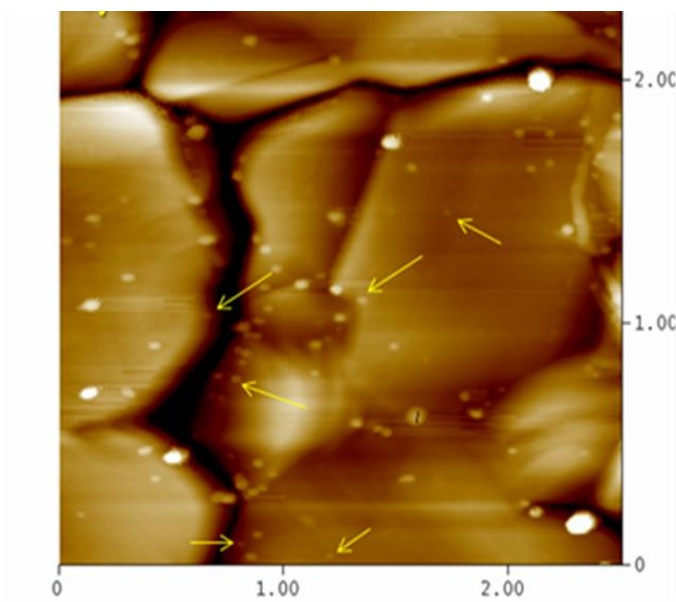


Figura 13. Imágenes de AuNP localizadas sobre la superficie del sustrato de oro utilizado para el crecimiento de las células. La imagen es un acercamiento a alta resolución de $2.5 \mu\text{m}^2$ y las flechas señalan la presencia de las AuNP.

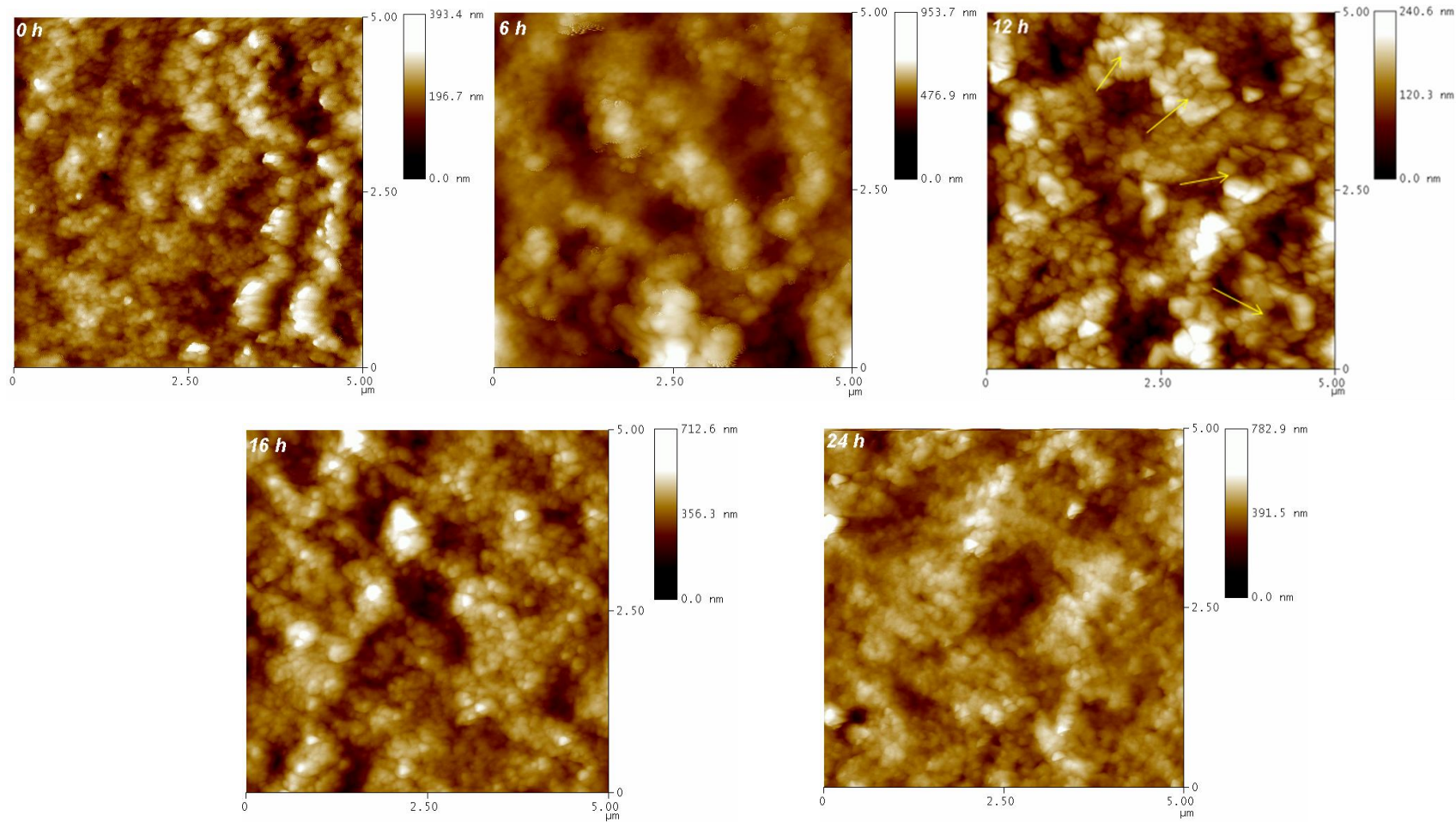
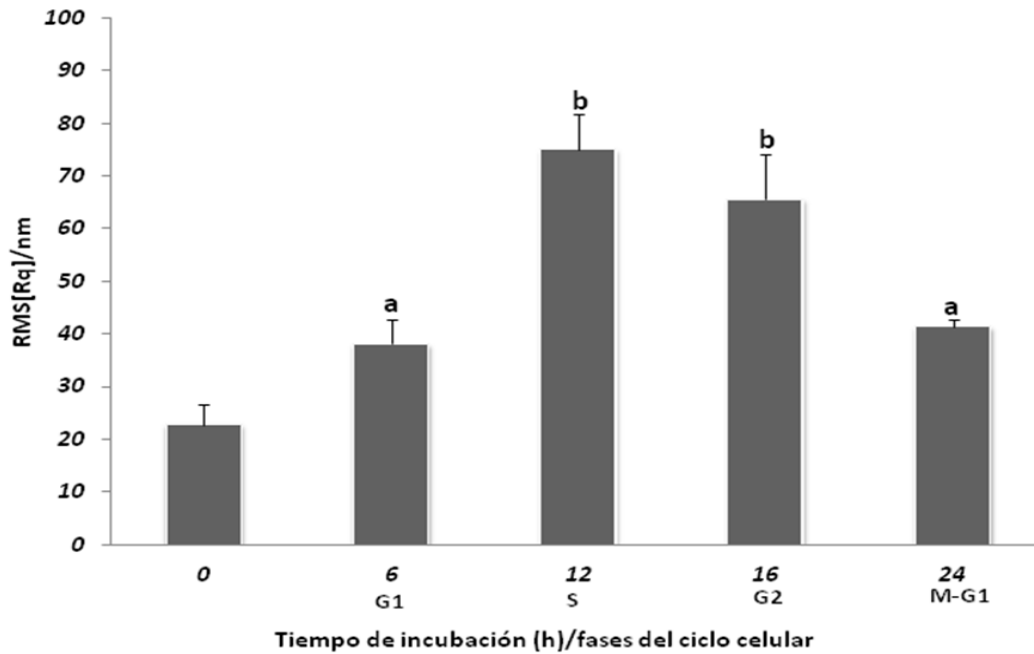


Figura 14. Efectos de la incubación con AuNP sobre la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7. Se observa que la rugosidad de la membrana cambia con respecto al tiempo de exposición a las AuNP. Los cambios más notables se detectaron a las 12 h (fases S) donde la imagen que corresponde a dicho tiempo muestra ciertas subestructuras con figuras geométricas parecidas a rosetas (flechas amarillas) y que no se presentaron en las otras imágenes.

Los resultados de los valores de rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 que fueron incubadas con AuNP mostraron cambios significativos con respecto a las células incubadas con el vehículo, particularmente en aquellas que estuvieron expuestas al tratamiento por 12 h donde la rugosidad es mayor (gráfica 5). Las imágenes de la figura 14 muestran las características topográficas de la superficie de las regiones membranales analizadas en cada tiempo de incubación, las cuales muestran cambio de la rugosidad el avance del fases del ciclo celular como se muestra en la tabla 4. La imagen que corresponde al tiempo de 12 h se observan pequeñas estructuras en la superficie que no se detectaron en los análisis de las células incubadas a las 0, 6, 16 y 24 h, relacionando el efecto de las nanopartículas con la fase síntesis del ciclo celular donde hay mayor actividad en la síntesis de proteínas, algunas de ellas de la membrana plasmática.

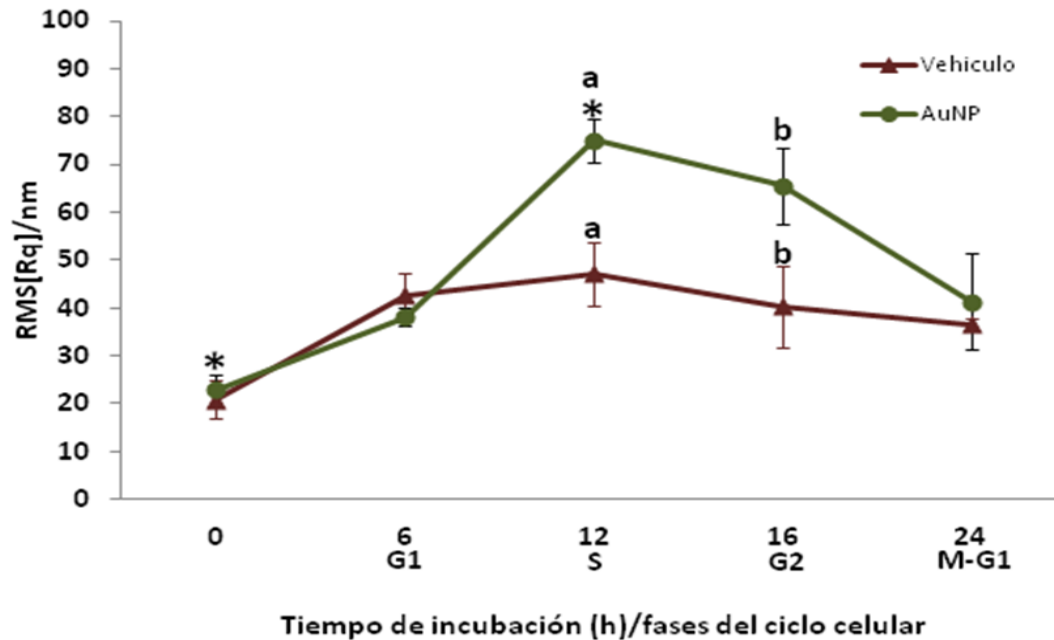
Tabla 4. Valores de rugosidad de la superficie de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratadas con AuNP a diferentes tiempos.

		<i>G1</i>	<i>S</i>	<i>G2</i>	<i>M-G1</i>
Tiempo de incubación	0	6	12	16	24
RMS[Rq]/nm	22.8 ± 3.9 nm	38.0 ± 4.7 nm	75.0 ± 6.6 nm	65.5 ± 8.5 nm	41.3 ± 1.2 nm



Gráfica 5. Rugosidad de la membrana plasmática de una célula MCF-7 tratada con AuNP. Los resultados muestran los cambios en la rugosidad de la membrana al ser incubadas con AuNP (20 $\mu\text{g/ml}$) donde los cambios significativos se dieron a las 12 h y disminuye gradualmente hasta las 24 h. con respecto a al vehículo. Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. $a \neq 0$, $b \neq a$, $b \neq 0$ $P \leq 0.05$.

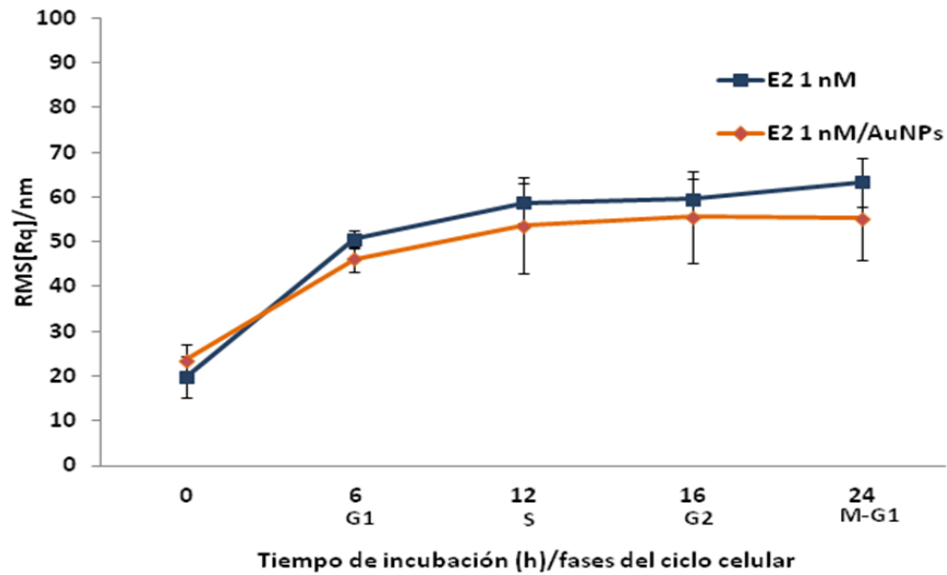
La grafica 6 muestra la comparación de los resultados obtenidos por el tratamiento con AuNP. Se observa el efecto va disminuyendo gradualmente conforme avanza el tiempo. El patrón de variación de la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 es semejante en ausencia y presencia de AuNP; sin embargo, estas incrementan su rugosidad a las 12 h de incubación.



Gráfica 6. Comparación de la rugosidad en la membrana plasmática de células MCF-7 que estuvieron expuestas a las AuNP con respecto al vehículo. *, a ,b= $P \leq 0.05$

9.7 Efecto de las AuNP sobre la rugosidad de la membrana plasmática de las células MCF-7 incubadas con E_2 a diferentes tiempos.

Cuando las células MCF-7 fueron incubadas con AuNP y E_2 al mismo tiempo, el comportamiento de la membrana plasmática sobre la rugosidad cambió en comparación con aquellas que sólo fueron incubadas en presencia de E_2 . Como se muestra en la grafica 7, la incubación de las células con los tratamientos correspondientes a E_2 y E_2 +AuNP en los diferentes tiempos analizados, mostró pequeñas diferencias en los valores de RMS[Rq] en la rugosidad de la membrana.



Gráfica 7. Comparación de la rugosidad en la membrana plasmática las células MCF-7 que fueron expuestas al E_2 y a $E_2 + AuNP$ a diferentes tiempos. $P > 0.05$.

En la gráfica 7 se ve como el E_2 aumenta gradualmente la rugosidad de la membrana, sin embargo la incubación con la mezcla de E_2 y AuNP disminuye el efecto ocasionado solo por E_2 disminuyendo los valores de RMS[Rq] de la membrana plasmática.

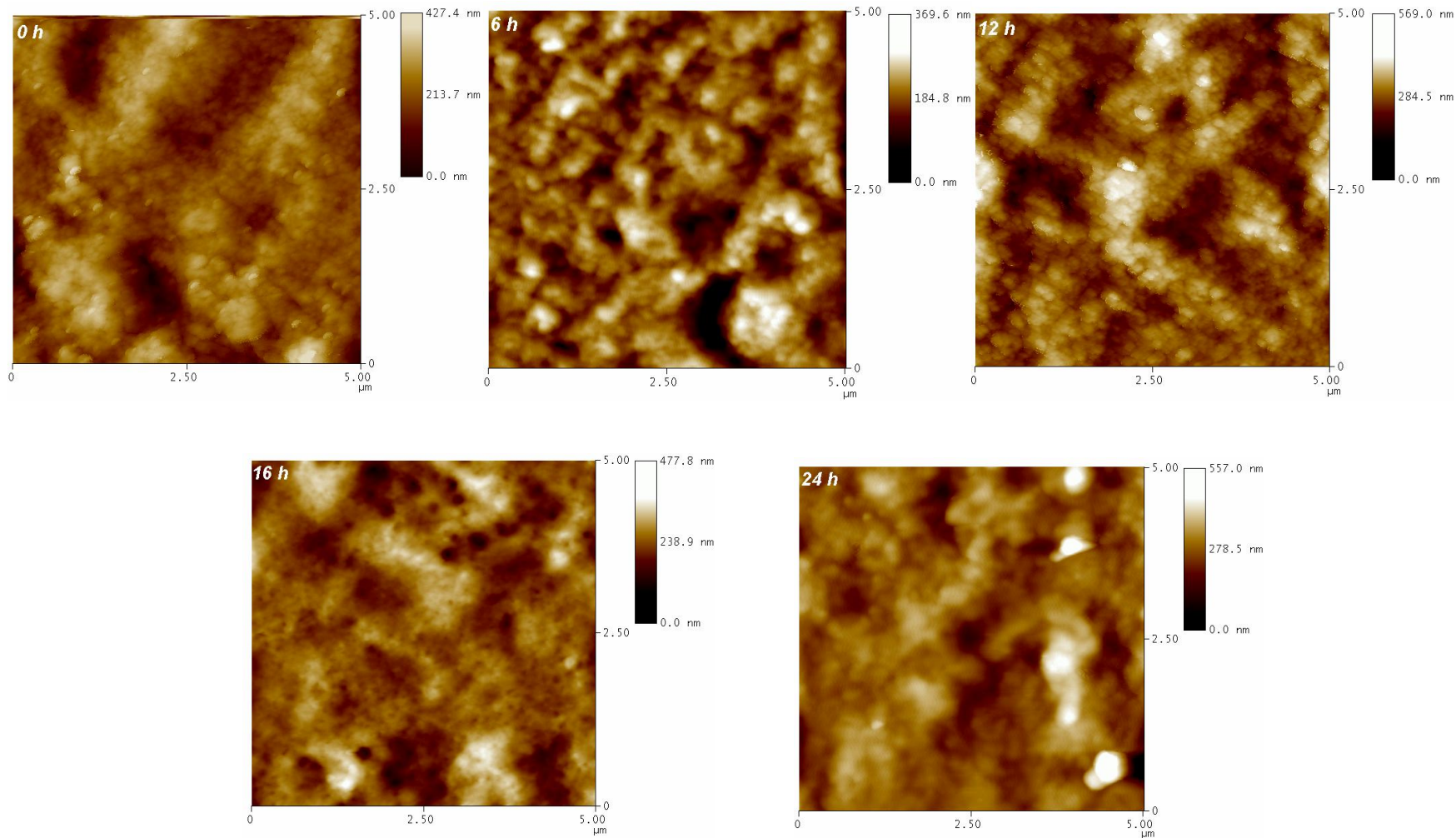
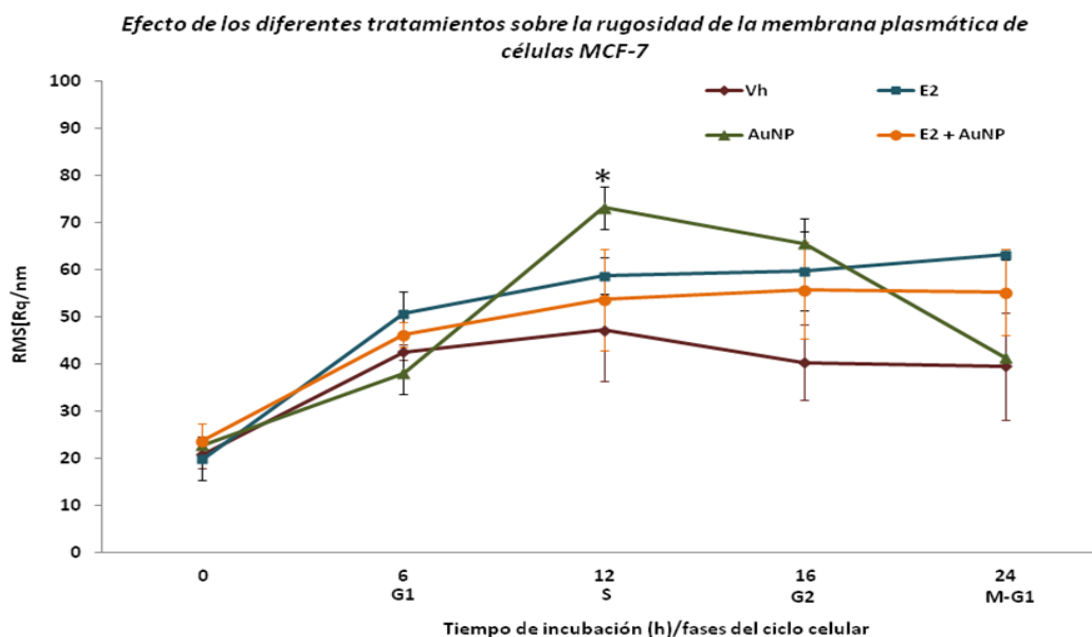


Figura 15. Imágenes de la rugosidad en la membrana de células MCF-7 con AuNP y E_2 a diferentes tiempos de incubación. Los valores de altura indican que las estructuras más elevadas redundan los 600 nm según datos del eje z (barra lateral derecha) y de acuerdo con el avance del ciclo celular.

La figura 15 muestra las imágenes de las regiones citoplasmáticas de la membrana plasmática de las células MCF-7 que fueron incubadas con E₂ y AuNP.



Gráfica 8. Comparación de los valores de RMS[Rq] en la rugosidad de la membrana plasmática de células MCF-7 con los diferentes tratamientos (Vh, E₂, E₂ + AuNP y AuNP + AuNP) incubadas a diferentes tiempos. En la grafica se muestra el incremento de la rugosidad en las células que fueron expuestas a las AuNP por 12 h (fase S) en comparación con los diferentes tratamientos. * = P ≤ 0.05

La gráfica 8 muestra los resultados del comportamiento de la rugosidad de la membrana plasmática de las células que estuvieron expuestas a los diferentes tratamientos y a los diferentes tiempos. La línea verde indica el comportamiento de la superficie de la membrana de las células MCF-7 cuando fueron expuestas al tratamiento de AuNP donde se observó un incremento sustancial en la rugosidad cuando éstas fueron incubadas por 12 h con las AuNP indicando que estos nanomateriales produjeron un efecto sobre la estructura de la membrana plasmática el cual va disminuyendo conforme avanza el tiempo y a las 24 h alcanza una condición parecida al t=0 h. Estos resultados sugieren que la membrana de la célula alcanza una normalización en su rugosidad después de la captación de las nanopartículas.

Tabla 5. Valores promedio de rugosidad de la superficie de la membrana plasmática del efecto generado por los diferentes tratamientos en células MCF-7.

Horas	0	6	12	16	24
TESTIGO	20.8±3.1 nm n=9	42.5±1.7 nm n=9	47.1±10.8 nm n=6	40.3±8.1 nm n=6	39.5±11.4 nm n=9
E ₂	19.8±4.6 nm n=9	50.6±4.7 nm n=6	58.7±3.8 nm n=9	59.7±8.4 nm n=9	63.2±1.2 nm n=9
AuNP	22.8±3.9 nm n=9	38.0±1.8 nm n=9	73.1±4.4 nm n=9	65.5±8.4 nm n=6	41.3±5.4 nm n=9
AuNP+E ₂	23.6±3.6 nm n=9	46.2±2.7 nm n=9	53.6±10.8 nm n=9	55.6±10.2 nm n=9	55.2±9.1 nm n=9
FASE	G0	G1	S	G2	M-G1

10. Discusión.

El empleo de la nanotecnología en la lucha contra el cáncer de mama se ha extendido en la última década, incluyendo el uso de técnicas que permiten su diagnóstico y tratamiento [Kong *et al.*, 2008]. En ambos casos se han empleado diversos tipos de nanopartículas, incluyendo las de oro que aquí se estudiaron [Yezhelyev *et al.*, 2006]. A pesar de que ya se han utilizado las AuNP en sistemas vivos [Sokolov *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004], aún faltan estudios para entender la forma en la cual se realiza la interacción de estas estructuras con la membrana plasmática de las células eucariontes, incluyendo los efectos que desencadenan en éstas.

En el presente trabajo de investigación primero se estandarizaron las condiciones del cultivo celular. Debido a que se han reportado variaciones de la rugosidad de la membrana plasmática de células eucariontes asociadas al ciclo celular, se procedió a tener cultivos en los cuales la mayoría de las células se encontraran en la misma fase del ciclo (cultivos celulares sincronizados), para lo cual las células MCF-7 se crecieron en medio de cultivo en el cual se fue bajando gradualmente la concentración del SFB hasta alcanzar 0.625% y de esta manera se obtuvieron cultivos con más del 90% de células sincronizadas. Es importante recordar que en las células MCF-7 sincrónicas, la fase celular tiene 21.8 h de duración [Wang *et al.*, 1998], por lo que a las 6 h se presenta la fase G1, a las 12 h la fase S, a las 18 horas la fase G2 y a las 24 h nuevamente en la fase G1.

Posteriormente se analizaron por AFM las variaciones de la rugosidad en diferentes regiones de la membrana plasmática de células de carcinoma mamario humano MCF-7. Estudios previos con células HeLa, de carcinoma cervical, demuestran que hay variaciones importantes cuando el análisis se hace en la membrana plasmática que se encuentra exactamente sobre el núcleo en comparación con las regiones perinucleares e inclusive con respecto a la membrana que se encuentra en el borde que limita a la célula al adherirse al sustrato de la placa de oro [Tapia *et al.*, 2008]. En el presente estudio todo el análisis se realizó en la membrana plasmática de las regiones intermedias entre el núcleo y el borde, como se señala en las figuras 7 y 8, donde se observó mayor homogeneidad de los valores de RMS[Rq], como parámetro de la rugosidad de la superficie de la membrana (Tabla 1). En la gráfica 2 se observan los cambios de la rugosidad de la membrana de células MCF-7 utilizadas como testigo en los diferentes estadios del ciclo celular. Cabe señalar que éste es el primer reporte de investigación donde se toman en cuenta estos parámetros, ya que los estudios reportados por Wang y por Guduru fueron realizados en cultivos no sincronizados

y se analizaron porciones de la membrana plasmática de células tanto de carcinoma cervico-uterino (HeLa) como de cáncer hepático (HepG2) sin tomar en cuenta las variaciones de las distintas regiones estudiadas [Wang *et al.*, 2009; Guduru R, 2011].

La siguiente pregunta que se respondió fue si es posible cuantificar los cambios inducidos por un factor que genera modificaciones en el citoesqueleto y la membrana plasmática de las células MCF-7. Para lo cual, cultivos celulares sincronizados se incubaron con 1 nM de estradiol, agente mitogénico, y se analizó la rugosidad de membrana en las diferentes fases del ciclo celular. Como se observa en las gráficas 3 y 4, el estradiol incrementa la rugosidad de la membrana de células MCF-7 que se mantiene alta hasta las 48 horas de incubación, a diferencia de las células testigo donde la rugosidad disminuye.

Se ha demostrado que el estradiol estimula la síntesis de diversas proteínas que se anclan en la membrana plasmática y genera la modificación de algunos fosfolípidos que componen la bicapa lipídica, aumentando la rugosidad de la membrana [Takabe *et al.*, 2010]. También se ha determinado que el estradiol produce modificaciones en la estructura de la membrana por la interacción con sus receptores anclados en la superficie, asociados con otras estructuras provocando modificaciones en la rugosidad [Peetla *et al.*, 2009]. Otro posible factor que debe ser tomado en cuenta es el hecho de que algunas glicoproteínas de alto peso molecular de la membrana plasmática de estas células, como las mucinas, pueden ser reguladas por hormonas esteroideas y esto ocasionar cambios en la rugosidad de la membrana de células cancerosas (Francis *et al.*, 2009).

Después de haber estandarizado las condiciones de incubación y medición de la rugosidad por AFM, se realizaron los experimentos donde se incubaron las células MCF-7 con AuNP de 20 nm de diámetro y en concentración de 20 µg/ml. Como se observa en la

gráfica 6, la AuNP induce el aumento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) de la rugosidad de la membrana a las 12 y 16 horas de incubación con respecto a las células testigo. Se ha reportado que el contacto de las AuNP con la superficie de la membrana plasmática ocasiona cambios cinéticos y mecánicos de las estructuras que la componen, especialmente de los lípidos, proteínas y estructuras glicosiladas, generando modificaciones en su rugosidad lo que a su vez aumenta la velocidad de captación hacia el interior de la célula [Nel *et al.*, 2009].

Chithrani y colaboradores (2005) demostraron que a las 6 h de incubación con AuNP de 14 nm de diámetro en la línea celular HeLa incrementa 90% la tasa de captación superior, mientras, Tapia y Batina (2008) observaron que la rugosidad de la superficie de la membrana plasmática incrementa notablemente al incubar las células HeLa con AuNP de 30 nm durante diferentes tiempos. A pesar de que las células MCF-7 son las más empleadas en estudios *in vitro* de cáncer de mama humano, no se han realizado a la fecha estudios utilizando AuNP y analizar sus efectos sobre la rugosidad en regiones específicas de la membrana plasmática.

Finalmente se realizaron experimentos donde se incubaron simultáneamente las células MCF-7 con estradiol y AuNP. Cuando se realizaron los experimentos por separado, en ambos casos se incrementa la rugosidad con respecto a las células testigo, aunque los patrones con respecto al tiempo de incubación son distintos. Cuando se adiciona la combinación, el efecto predominante sobre el incremento de la rugosidad de la membrana plasmática es el ocasionado por el estradiol. Como se observa en las gráficas 7 y 8, el incremento inducido por la combinación AuNP y estradiol es menor al observado por la inducción con estradiol solo, sin embargo no es estadísticamente significativo.

Este proceso puede ser debido a efectos mecánicos por la interacción de las AuNP con la membrana, ya que se ha demostrado que las AuNP se distribuyen sobre la superficie y forman capas uniformes sobre la membrana, modificando la capacidad del estradiol de atravesar la bicapa lipídica, así como se ha demostrado que las mismas AuNP pueden regular la velocidad de su incorporación hacia el interior de la célula [Nel *et al.*, 2009; Ando *et al.*, 2011].

II. CONCLUSIONES

En el presente estudio, la microscopía de fuerza atómica (AFM) permitió el análisis de la superficie de membrana de células MCF-7 de carcinoma mamario humano en muy alta resolución (500-100 nm), permitiendo la medición de su rugosidad mediante el análisis tridimensional y a través del parámetro $RMS_{[Rq]}$. Este análisis se realizó durante las diferentes fases del ciclo celular de MCF-7, en presencia de estradiol, AuNP y la combinación estradiol-AuNP.

Si bien el objetivo planteado inicialmente fue el determinar la cinética de incorporación de la AuNP, los resultados que se presentan sientan las bases para poder hacer el análisis posteriormente, de manera sistemática. Una forma en la cual se puede realizar el análisis de la captación de las AuNP y su internalización es por la técnica de espectroscopia Raman, lo cual se realizará en breve. Aunque se sabe que el estradiol ocasiona cambios en la estructura del citoesqueleto [Flamini *et al.*, 2009] y de la membrana plasmática [Azios y Dharmawardhane, 2005], efecto similar al demostrado por la hormona progesterona en células endometriales [Francis *et al.*, 2009], no hay reportes del análisis de los cambios ocasionados por el estradiol en la ultraestructura de células cancerosas.

Un aspecto importante del presente estudio es que se estandarizaron las condiciones en las cuales se realizan las mediciones de rugosidad de la membrana plasmática de las células cancerosas. A partir del análisis de la rugosidad de las diferentes regiones en una misma célula se puede concluir que las zona de la membrana que se encuentran sobre el núcleo y en los bordes son altamente heterogéneas y, por tanto, presenta gran variación de valores; por tal motivo se sugiere que los estudios se realicen en las porciones de membrana que se encuentran entre estas zonas.

Además se demostró que el punto máximo de modificaciones en el cambio de rugosidad se observa en la fase de síntesis, es decir a las 12 h de reactivación del ciclo celular, en comparación con los valores que presentan en las fases G1 y G2. La rugosidad en esta fase del ciclo aumenta 80% cuando se incuban las AuNP, lo que sugiere que su interacción con la membrana plasmática ocasiona cambios que facilitan su incorporación (Ando *et al.*, 2011).

Los resultados descritos en este trabajo proporcionan información importante para comprender la dinámica de los cambios presentes en la membrana de las células de carcinoma mamario cuando éstas son incubadas con AuNP, en ausencia y presencia de estradiol. Los resultados obtenidos presentan datos relevantes para entender las interacciones y la eficiencia de las AuNP con la superficie de la membrana plasmática al generar cambios significativos en la rugosidad analizados por AFM. Como las AuNP juegan un papel crucial en la terapia contra el cáncer de mama, es importante comprender sus interacciones y procesos de internalización a fin de orientar de manera eficiente los sitios específicos en las células.

Estos resultados sientan las bases para estudios posteriores en la administración de agentes con función de transportadores de fármacos y como marcadores para el diagnóstico temprano.

12. PERSPECTIVAS

Estudiar las modificaciones de la membrana plasmática cuando las células están interactuando unas con otras, ya que los análisis presentados en este trabajo fueron en células individuales, y correlacionar la incorporación de AuNP con las propiedades biomecánicas (fuerzas de interacción sonda-membrana) de la superficie membranal.

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ahidouch H and Ahidouch A. (2008), *K⁺ Channel Expression in Human Breast Cancer Cells: Involvement in Cell Cycle Regulation and Carcinogenesis*. J Membrane Biol. 221:1-6.
- 2) Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F and Weisz A. (1996), *17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells*. Oncogene, 12:2315-2324.
- 3) Ando J, Fujita K, Smith N and Kawata S. (2011), *Dynamic SERS Imaging of Cellular Transport Pathways with Endocytosed Gold Nanoparticles*. Nano Lett. 10:1010.1021
- 4) Azios N and Dharmawardhane S. (2005), *Resveratrol and estradiol exert disparate effects on cell migration, cell surface actin structures, and focal adhesion assembly in MDA-MB-231 human breast cancer cells*. Neoplasia. 7:128-140.
- 5) Bergen J, Recum H, Goodman T, Massey A and Pun S. (2006), *Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery*. Macromol. Biosci., 6:506–516.
- 6) Bhattacharya R, Ranjan-Patra C, Verma R, Kumar S, Greipp P and Mukherjee P. (2007), *Gold Nanoparticles Inhibit the Proliferation of Multiple Myeloma*. Adv. Mater. 19:711–716.
- 7) Binning G, Quate F and Gerber C. (1986), *Atomic Force Microscopy*. Physical Review Letters, 56:930-933.

- 8) Caralero V. (2008), *Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro*. Tesis Doctoral. Univerdiad Complutence de Madrid (TESIS).
- 9) Cardoso F, Bedard P, Winer E, Pagani O, Senkus E, Fallowfield L, Kyriakides S, Costa A, Cufer T and Albain K. (2009), *International Guidelines for Management of Metastatic Breast*. J Natl Cancer Inst. 101:1174–1181.
- 10) Chari R. (2007), *Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs*. Acc. Chem. Res. 41: 98-107.
- 11) Chithrani B, Ghazani A and Cha C. (2005), *Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells*. Nano-letters, 6:662-668.
- 12) Flamini MI, Sanchez AM, Goglia L, Tosi V, Genazzani AR, Simoncini T, (2009). *Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells*. Mol Hum Reprod. 15:675-685.
- 13) Francis W, Lewis P, Gonzalez D, Ryder A, Webb G, Joels A, White J, Wright C and Conlan R. (2009), *Progesterone induces nano-scale molecular modifications on endometrial epithelial cell surfaces*. Biol Cell. 101:481-493.
- 14) Gao X, Cui Y, Levenson R, Chung L and Nie S. (2004), *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. Nature Biotechnology, 22:969-976.
- 15) Guduru R. (2011), *In situ AFM Imaging of Nanoparticle- Cellular Membrane Interaction for a Drug Delivery Study*. FIU. Electronic Theses and Dissertations. Paper 422. <http://digitalcommons.fiu.edu/etd/422>.
- 16) Hainfeld F, Slatkin N, Focella M and Smilowitz M. (2006), *Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent*. Brit Radiol, 79:248–253.

- 17) Hall R, Lee S, Alexander E, Shine J, Clarke C and Sutherland L. (1990), *Steroid hormone receptor gene expression in human breast cancer cells: inverse relationship between oestrogen and glucocorticoid receptor messenger RNA levels*. Int J Cancer, 46:1081-1087.
- 18) Han Y, Li S, Wang X and Wang Y. (2006), *Influence of apatitic Nanoparticles on cancer cells*. Nanoscience, 11:102-106.
- 19) Hanahan D and Weinberg R. (2000), *The hallmarks of cancer*. Cell., 100;57-70.
- 20) Hansma P, Cleveland P, Radmacher M, Walters A, Hillner E, Bezanilla M, Fritz M, Vie D, Hansma G, Prater B, Massie J, Fukunaga L, Gurley J and Elings V. (1994), *Tapping mode atomic force microscopy in liquids*. Ap. Phys. Let., 64:1738-1740.
- 21) Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, Graff J, Collins C, Shayesteh L, Doggett N, Johnson K, Wheelock M, Herman J, Baylin S, Pinkel D and Gray J. (1998), *Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines*. Cancer Res., 58:1972-1977.
- 22) Hong S, Bielinska A, Mecke A, Keszler B, Beals J, Shi X, Balogh L, Orr B, Bker J and Holl M. (2004), *Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport*. Bioconjugate chemistry, 15:774-782.
- 23) Hong S, Leroueil R, Janus E, Peters J, Kober M, Islam M, Orr B, Baker J and Holl M. (2006), *Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability*. Bioconjugate chemistry, 17:728-734.

- 24) Hu M, Chen J, Li Z, Au L, Hartland G, Li X, Marquese M and Xia Y. (2006), *Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications*. Chem. Soc. Rev., 35:1084–1094.
- 25) Jakowlew B, Moody W and Mariano M. (1997), *Transforming growth factor-beta receptors in human cancer cell lines: analysis of transcript, protein and proliferation*. Anticancer Res., 17:1849-1860.
- 26) Karp, G: *Biología Celular*, 2a Edición, Editorial McGraw Hill, México, 1987.
- 27) Kong T, Zeng J, Wang X, Yang X, Yang J, McQuarrie S, McEwan A, Roa W, Chen J and Xing J. (2008), *Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles*. Small, 4:1537–1543.
- 28) Lavi Y and Liscovitch M. (2001), *Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences*. Glycoconj J., 17:253-259.
- 29) Leroueil P, Hong S, Almut M, Baker J, Orr B and Holl M. (2007), *Nanoparticle Interaction with Biological Membranes: Does Nanotechnology Present a Janus Face?* Acc. Chem. Res., 40:335–342.
- 30) Levin E. (2002), *Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors*. Steroids 67:471–475.
- 31) Lewis J, Thomas T, Klinge M, Gallo M and Thomas T. (2001), *Regulation of cell cycle and cyclins by 16-hydroxyestrone in MCF-7 breast cancer cells*. Mol. Endo. J., 27:293–307.
- 32) Maemura M, Akiyama K, Woods J and Dickson R. (1995), *Expression and ligand binding of alpha 2 beta 1 integrin on breast carcinoma cells*. Clin Exp Metastasis., 13:223-235.

- 33) Mozafari R, Pardakhty A, Azarmi S, Jazayeri J, Nokhodchi A and Omri A. (2009), ***Role of nanocarrier systems in cancer nanotherapy***. Liposome Res. J., 19:310-321.
- 34) Mukhopadhyay R, Theriault R and Price J. (1999), ***Increased levels of alpha-6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells***. Clin Exp Metastasis., 17:325-332.
- 35) Nel A, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek E, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V and Thompson M. (2009), ***Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface***. Nature Materials, 8:543-557.
- 36) Nichols B. (2003), ***Caveosomes and endocytosis of lipid rafts***. J Cell Sci., 116:4707-4714.
- 37) Nisha M and Pramod K. (2008), ***Nanoparticle: Drug delivery system for cancer therapy***. Asian Journal of Pharmaceutics, 2:139-140.
- 38) Paull R, Wolfe J, Hebert P and Sinkula M. (2003), ***Investing in nanotechnology*** Nat Biotechnol., 21:1134-1147.
- 39) Peetla C, Bhave R, Vijayaraghavalu S, Stine A, Kooijman E and Labhasetwar V. (2010), ***Drug Resistance in Breast Cancer Cells: Biophysical Characterization of and Doxorubicin Interactions with Membrane Lipids***. Mol. Pharm., 7:2334-2348.
- 40) Pierceall W, Woodard S, Morrow J, Rimm D and Fearon R. (1995), ***Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines***. Oncogene, 11:1319-1326.
- 41) Punnonen K, Hietanen E, Auvinen O and Punnonen R. (1989), ***Phospholipids and fatty acids in breast cancer tissue***. J Cancer Res Clin Oncol. 115:575-578.

- 42) Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J and Levis R. (2002), *ERs Associated with and Regulate the Production of Caveolin: Implications for Signaling and Cellular Actions*. Mol. Endo., 16:100-115.
- 43) Resnitzky D, Gossen M, Bujard H and Reed S. (1994), *Acceleration of the G1/S Phase Transition by Expression of Cyclins D1 and E with an Inducible System*. Mol Cell Biol., 14:1669-1679.
- 44) Roetger A, Merschjann A, Dittmar T, Jackisch C, Barnekow A and Brandt B. (1998), *Selection of potentially metastatic subpopulations expressing c-erbB-2 from breast cancer tissue by use of an extravasation model*. Am J Pathol., 153:1797-1806.
- 45) Sagvolden G, Giaever I, Pettersen O and Feder J. (1999), *Cell adhesion force microscopy*, Biophysics, 96:471-476.
- 46) Schmitz I, Schreiner M, Friedbacher G and Grasserbauer M. (1997), *Tapping-Mode AFM in Comparison to Contact-Mode AFM as a Tool for in Situ Investigations of Surface Reactions with Reference to Glass Corrosion*. Anal. Chem. 69:1012-1018.
- 47) Shapiro C and Recht A. (2001), *Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer*. N Engl J Med., 344:1997-2008.
- 48) Sheikh M, Shao M, Clemmons R, LeRoith D, Roberts J and Fontana J. (1992), *Identification of the insulin-like growth factor binding proteins 5 and 6 (IGFBP-5 and 6) in human breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun., 183:1003-1010.
- 49) Silva G. (2004), *Introduction to nanotechnology and its applications to medicine*. Surg Neurol., 61:216-220.
- 50) Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R and Richards-Kortum R. (2003), *Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth*

- Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles*. Cancer Research, 6:1999–2004.
- 51) Szollosi J, Balazs M, Feuerstein G, Benz C and Waldman M. (1995), *ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer*. Cancer Res., 55:5400-5407.
- 52) Takabe K, Kim R, Allegood J, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, Harikumar K, Hait N, Milstien S and Spiegel S. (2010), *Estradiol Induces Export of Sphingosine 1-Phosphate from Breast Cancer Cells via ABCG2*. Biol. Chem. J., 285:10477–10486.
- 53) Tapia M, Maldonado E, Tanori J, Ramón E and Batina N. (2008), *Nanosopic characterization of the membrane surface of the HeLa cancer cells in the presence of the gold nanoparticles: an AFM study*. Revista Mexicana de física, 55:64-67.
- 54) Uboldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns M, Pohl C, Giovanni B, Unger R and Kirkpatrick C. (2009), *Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441*. Particle and Fibre Toxicology, 6:1186-1743.
- 55) Unfried K, Albrecht C, Klotz L, Mikecz A, Grether-Beck S and Schins R. (2007), *Cellular response to nanoparticles: Target structures and mechanisms*. Nanotoxicology, 1:52-71.
- 56) Vic P, Vignon F, Derocq D and Rochefort H. (1982), *Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF-7 huma breast cancer cell in cultura*. Cancer Res., 42:667-6673.
- 57) Wang S, Melkounian Z, Woodfork K, Cather Carrie, Davidson A, Wonderlin W and Strobl J. (1998), *Evidence for an Early G1 Ionic Event Necessary for Cell Cycle*

- Progression and Survival in the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line.* Journal of Cellular Physiology, 176:456–464.
- 58) Wanga J, Wana Z, Liua W, Lia L, Rena L, Wanga X, Sunb P, Renc L, Zhaoa H, Qin T, Zhangb Z, Songb N and Zhangb L. (2009), *Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs.* Biosensors and Bioelectronics, 25:721–727.
- 59) Yezhelyev M, Gao X and Xing Y. (2006), *Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer.* The Lancet Oncology, 7:657-667.
- 60) Zharov V, Kim J, Curiel D and Everts M. (2005), *Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy.* Nanomedicine, 1:326–345.

14. ANEXOS

Anexo 1. Microscopía de fuerza atómica (AFM).

La AFM es una forma especializada de microscopía para el barrido de muestras, inventada por Binnig en 1986 [Binnig *et al.*, 1986]. Su principal objetivo es la obtención de imágenes topográficas de alta definición y la medición de fuerzas a nivel atómico entre la sonda y la superficie de la muestra sin dañarla.

La imagen de AFM es un mapa de la superficie de la muestra, generado a partir de los datos detectados por la sonda en cada punto de la muestra tales como dureza, rugosidad y altura gracias a la presencia del plano Z, asociados a coordenadas en los tres planos cartesianos.

La imagen generada se interpreta a partir de una barra de tonalidades que asigna el software para cada punto registrado durante la medición. Los cambios en la tonalidad son proporcionales a los cambios en las características de la superficie que están siendo analizadas, ya sea altura o densidad una tonalidad, tomando como referencia el valor mínimo y máximo obtenido durante el análisis. La capacidad de variar el modo de retroalimentación del microscopio da la oportunidad de generar diversos modos de adquisición de imagen, por lo que se han desarrollado varias modalidades de trabajo; el modo contacto, el modo no-contacto y el modo intermitente [Figura 16].

Modo Contacto (Medición de fuerzas).- En este modo la sonda está en contacto todo el tiempo con la superficie de la muestra donde actúan fuerzas de repulsión iónica lo que se quiere decir es que se está en el régimen repulsivo de las fuerzas interatómicas [Schmitz *et al.*, 1997]. Este modo permite identificar las diferencias de fricción en la superficie y variaciones en las propiedades de la muestra.

Modo no-contacto.- El brazo de palanca desciende lentamente, cerca de la superficie a una separación en la cual nos encontramos en la zona atractiva de la fuerza intermolecular sobre la punta. Este modo es un tanto complicado de operar en condiciones de medio ambiente, ya que siempre tendremos una pequeña capa de contaminación de agua sobre la superficie, formando un pequeño puente de capilaridad entre la superficie y la punta, provocando que la punta toque a la muestra [Schmitz *et al.*, 1997]. Este modo es la base de la medición de las propiedades mecánicas y de fuerzas de enlace intercelulares [Figura 23].

Modo Intermitente, (“tapping”).- En este modo la punta de la sonda oscila rápidamente mientras desciende hacia la superficie de la muestra, conforme la punta se acerca a la muestra, la amplitud de la oscilación disminuye hasta detectar la superficie. La punta al estar vibrando toca intermitentemente la superficie, es decir, entra a la parte repulsiva del potencial intermolecular y de este modo la punta está en contacto con la superficie sólo por un tiempo corto, reduciendo la fuerza lateral sobre la punta y el riesgo de producir un daño a la superficie se ve reducido [Schmitz *et al.*, 1997]. Este modo permite que las muestras no conductivas puedan ser analizadas y sin que sufran ningún daño [Figura 16].

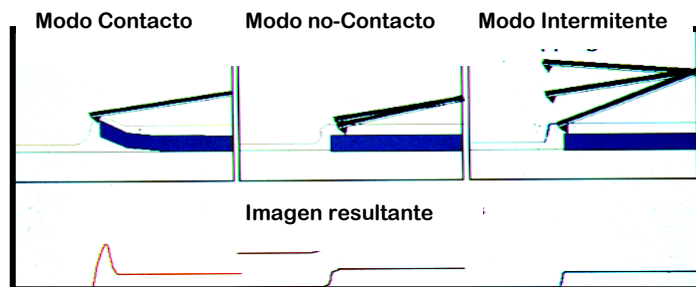


Figura 16. Esquema de los modos de operación del AFM. Comparación esquemática de la imagen resultante empleando los distintos modos de trabajo de AFM; contacto, no-contacto e intermitente.

Anexo 2. Rugosidad

La rugosidad es un concepto que se usa en topografía para describir la irregularidad de las superficies. El análisis de la rugosidad permite encontrar parámetros de desigualdad (rugosidad) en toda la imagen (superficie) y evalúa variaciones en la altura “Z” (figura 17). El método para la estimación de la rugosidad se basa en el siguiente planteamiento: en un terreno uniforme (poco rugoso), los vectores perpendiculares a la superficie del mismo serán aproximadamente paralelos y, en consecuencia, presentarán una dispersión baja (mide variaciones en la dimensión Z). Al contrario, en un terreno rugoso, los cambios de pendiente y orientación harán que dichos vectores presenten una dispersión mayor [Sagvolden *et al.*, 1999].

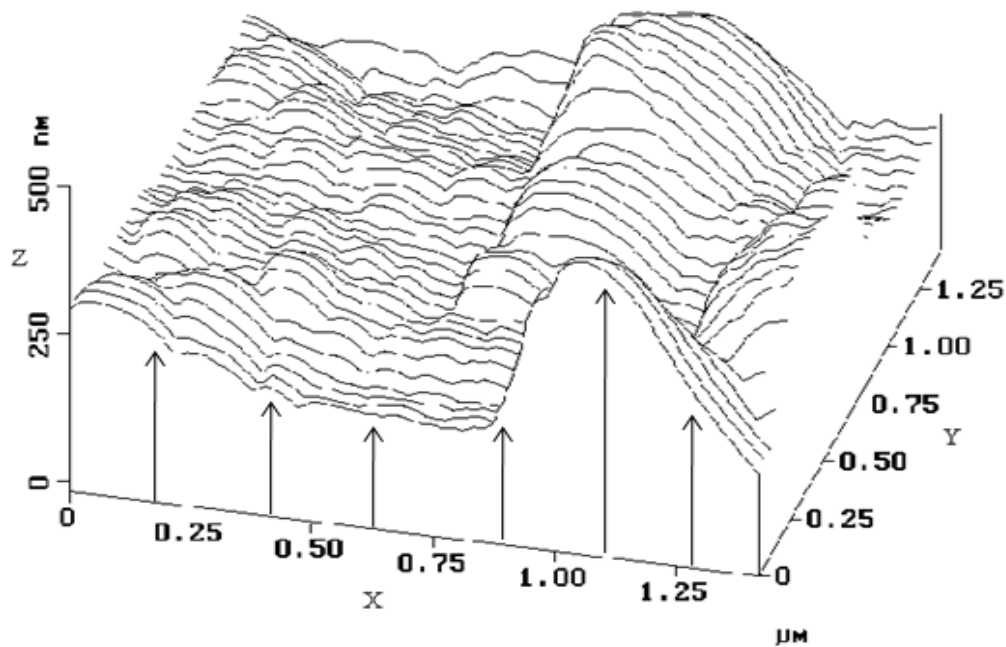


Figura 17. Análisis de rugosidad. Evaluación de las variaciones en la altura medida (vector Z)

La rugosidad esta representara por R_q (RMS) (root-mean-square), que es la desviación estándar del total de las alturas medidas, dada por la siguiente ecuación [41]:

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum (Z_i)^2}{n}}$$

Donde Z_i es el valor corriente de la Altura medida Z , y n es el número de puntos dentro de la imagen.

Anexo 3. Diseño de nanopartículas de oro.

Se preparó una suspensión con nanopartículas 2:10 (9.5 μ l de nanoartículas en 2 ml de medio de cultivo suplementado) de la cual se adicionó 350 μ l a cada uno de los pozos donde se encontraban las placas. Durante el cultivo se realizó la incorporación de las nanopartículas de oro con un diámetro de 20 nm, las cuales fueron sintetizadas a partir de una solución de HAuCl_4 en una solución acuosa, empleando ácido ascórbico como agente reductor y N-vinyl-2-pyrrolidone, a temperatura ambiente [BBI International, reino unido]. Las nanopartículas se incorporación en distintos tiempos (0, 6, 12, 16 y 24 horas). Al término, las células fueron fijadas en una serie de alcoholes graduales, para proceder a visualizar las placas por AFM.

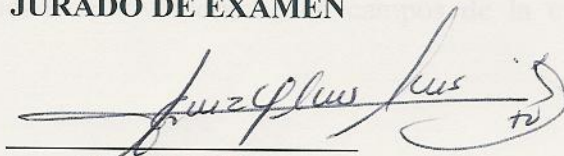
La generación de imágenes se realizó en un microscopio de fuerza atómica, modelo Nanoscope IIIa MultiModeTM, (SPM, Digital Instrument) en modo “tapping”, empleando puntas de silicio. Se realizaron barridos en alta resolución de 10, 5, 2.5, 1 μm^2 y 500 nm^2 para análisis topográfico en la superficie de membrana plasmática.

Las imágenes se analizaron con el software del equipo y se obtuvieron perspectivas tridimensionales para medir los valores de alturas en el eje z y se empleo la medición de

rugosidad para determinar la presencia de cambios en la membrana por efecto de la incorporación de las nanopartículas de oro.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**Estudio topológico de la incorporación de nanoesferas de oro sobre la superficie de la membrana plasmática de células de cáncer de mama**”. El examen se realizó el día 02 del mes de diciembre de 2011.

JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
gool@xanum.uam.mx



SECRETARIO

Dra. Eva Ramón Gallegos.

Profesora-Investigadora, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Unidad Zacatenco. ramon68@hotmail.com.



VOCAL

Dr. Armando Luna López

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Investigación Básica. Instituto Nacional de Geriátria. allbioexp@yahoo.com



VOCAL

M. en B.E. Leticia Gonzales Núñez.

Profesor Asociado Nivel D. Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. gnleti@yahoo.com.es.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

El Comité Académico del **Posgrado en Biología Experimental** de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, otorga el presente reconocimiento y felicita orgullosamente a:

M. en B.E. CARLOS LARA CRUZ

En virtud de haber aprobado el examen de grado de **Maestría en Biología Experimental**, presentando y defendiendo el tema:

“Estudio topológico de la incorporación de nanoesferas de oro sobre la superficie de la membrana plasmática de células de cáncer de mama”

llevado a cabo el día 2 de diciembre de 2011.

Dr. Nicola Batina
Dr. Pablo Damián Matsumura
Co-Directores de Tesis

Dr. José Luis Gómez Olivares
Presidente del Jurado

Dr. Francisco Javier Alarcón A.
Coordinador del Posgrado



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 30/11/2011

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno CARLOS LARA CRUZ, matrícula 209381691, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha dos de diciembre del 2011 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

ESTUDIO TOPOLOGICO DE LA INCORPORACION DE NANOESFERAS DE ORO SOBRE LA SUPERFICIE DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE CELULAS DE CANCER DE MAMA

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

Secretaria

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

DRA. EVA RAMON GALLEGOS

Vocal

Vocal

M. EN B.E. LETICIA GONZALEZ NUÑEZ

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000, Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876