



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

EFFECTO DE LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B (CCL-120) POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

AMAIRANI MORENO CARO

Hermosillo, Sonora, México

4 de diciembre de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Amairani Moreno Caro

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

EFFECTO DE LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B (CCL-120) POR MICROSCOPIA DE FUERZA
ATÓMICA

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

Presenta:

AMAIRANI MORENO CARO

Hermosillo, Sonora, México

4 de diciembre, 2019

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada "Efecto de la metilprednisolona sobre la morfología de células de leucemia linfoblástica aguda B (CCL-120) por microscopía de fuerza atómica" presentada por Amairani Moreno Caro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias con opción en Biociencias Moleculares.

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta



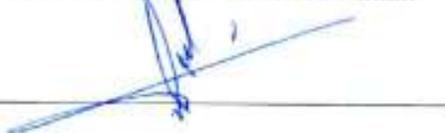
Directora y presidenta

Dr. Homero Rendón García



Codirector

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán



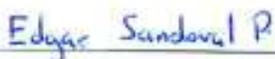
Sinodal interno y Secretario

Dra. Gloria Irma Ayala Astorga



Sinodal interno

M. C. Edgar Sandoval Petris



Sinodal interno

Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias



Sinodal externo

DEDICATORIA

A mis padres: Esperanza Caro el principal ejemplo de lucha y admiración, Cosme Moreno que siempre ha estado ahí para apoyarme en todas las situaciones por las que he pasado en esta vida, también a mis hermanos: Andy Moreno C. y Axel Moreno C. por brindarme sus experiencias de vida. Con especial dedicatoria a Daniel Macas por brindarme su compañía y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por los apoyos otorgados para poder realizar los estudios de Posgrado en Biociencias, al proyecto **CONACYT** número **241133**, bajo la responsabilidad técnica del Dr. Armando Burgos Hernández. Al Departamento de Investigaciones científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y al Posgrado en Biociencias.

Gracias a la **Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta**, por aceptarme dentro de su grupo de investigación a pesar de todos los contratiempos, al **M. C. Edgar Sandoval Petris** por molestarlo no importando la hora, siempre estuvo ahí para apoyarme; al **Dr. Josué Elías Juárez Onofre** por siempre estar ahí cuando tenía dudas y su amable disponibilidad por alguna duda o problema, al **Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias** por la disposición del Laboratorio de Fluidos Complejos, al **Dr. Homero Rendón García** por sus aportes en temas clínicos, a los doctores **Luis Enrique Gutierrez Millán** y **Gloria Irma Ayala Astorga** por ser parte de mi comité y orientarme en todos los sentidos, y por último, gracias en especial al **Dr. Leonardo Ibor Ruiz Ortega** apoyarme en la estancia de investigación y conocer nuevas tecnologías y especialmente al **Dr. Bin Tang** por aceptarme en su laboratorio y darme la oportunidad de conocer nuevos horizontes en los campos emergentes de la mecánica celular. **GRACIAS** a todos por haberlos conocido, siento que una parte de cada uno de ustedes ha influido para forjarme en mi futuro.

A todas las personas que hicieron posible este proyecto, en especial gracias a mis compañeras **Marielena Clark**, **Damaristelma De Jesús** por apoyarme moral y académicamente, por último, a **Sabrina Sotelo** por acompañarme en esos momentos divertidos en el laboratorio.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación en células de Leucemia Linfoblástica Aguda (CCL-120) analizando los cambios en la morfología celular por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Para ello, se estandarizaron las condiciones para el cultivo celular y se determinó la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de la línea celular expuesta al fármaco por medio de la técnica de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Después, se utilizó la dosis obtenida para probar el efecto del fármaco sobre la morfología celular. Previamente se estandarizó un protocolo para la adhesión de células no adherentes en sustrato vidrio y mica, se hicieron fijaciones como metanol y formaldehído, se estandarizaron las concentraciones celulares ideales para una mejor disponibilidad celular y separación de estas. Obtenida la estandarización, se procesaron las láminas para evaluar la morfología y las propiedades morfológicas como altura, diámetro, topografía y rugosidad por AFM. Se analizó el efecto del fármaco en la línea celular antes de la exposición y después de los tratamientos, obteniéndose diferencias morfológicas y de rugosidad entre los tratamientos.

ABSTRACT

In this work, the effect of methylprednisolone on morphological properties and proliferation in acute lymphoblastic leukemia cells (CCL-120) was studied. Moreover, we standardized the cell culture and obtained the half Inhibitory Concentration IC_{50} exposed to the drug, through MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), likewise we used the dose and testing the effect of the drug in cell morphology, previously we standardized a protocol for adhesion of non-adherent cells on different substrates as mica and glass, we evaluated the cellular fixation with methanol and formaldehyde, however, we examined the ideal cellular count for better distribution on the material. Meanwhile, we examined the slides with Atomic Force Microscopy (AFM), to evaluate morphology and morphological properties like height, diameter, topography, and rugosity. Finally, we analyzed the effect of the drug on the cell line before and after the exposition of the treatments, determining morphological differences and morphological properties, especially in rugosity between the treatments conditions.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1 Generalidades del Cáncer	3
I.2 Estadísticas del Cáncer a Nivel Mundial	4
I.3 Leucemia	5
I.3.1 Estadísticas LLA	5
I.3.2 Clasificación de las leucemias	6
I.3.2.1 Inmunológica	6
I.3.2.2 Morfológica	7
I.3.3 Tratamiento	8
I.3.4 Inducción a la remisión	9
I.3.5 Etapa del esteroide	9
I.3.6 Fármacos glucocorticoides	10
I.3.7 Mecanismo de acción	10
I.4 Importancia de la Biofísica Celular en el Cáncer	12
I.4.1 Propiedades biofísicas en el cáncer	13
I.4.2 Parámetros biofísicos	14
I.4.3 Parámetros morfológicos	14
I.5 Microscopía de Fuerza Atómica	16
I.5.1 Componentes AFM: cantilever, fotodiodo y piezoeléctrico o piezoescaner	17
I.5.2 Estudio de células adherentes por medio de AFM	21
I.5.3 Estudio de AFM enfocado a células no adherentes	23
II. HIPÓTESIS	27
III. OBJETIVOS	28
III.1 Objetivo General	28
III.2 Objetivos Particulares	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
IV.1 Cultivo Celular	29
IV.2 Obtención de IC ₅₀ por medio de MTT en CCL-120	30
IV.3 Protocolo de Fijación Celular	31
IV.4 Microscopía de Fuerza Atómica	31
IV.4.1 Montura de la muestra	31
IV.4.2 Ajuste y posicionamiento del láser	31

IV.4.3	Calibración en aire de la frecuencia resonancia del cantiléver ...	33
IV.4.4	Acercamiento de la muestra	34
IV.4.5	Obtención de datos	34
IV.5	Análisis Estadístico	35
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
V.1	Obtención IC ₅₀ Metilprednisolona	36
V.2	Morfología y ultraestructura celular de los linfoblastos (CCL-120)	38
V.3	Cambios en la morfología y ultraestructura celular en linfoblastos	39
V.4	Parámetros morfológicos cuantitativos: diámetro, altura y rugosidad ..	44
V.4.1	Altura y diámetro.....	44
V.4.2	Rugosidad	47
VI.	CONCLUSIÓN	52
VII.	LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Incidencia del cáncer a nivel mundial en el año 2018 (Globocan, 2018).	4
2	Clasificación morfológica de la FAB de LLA. 1) Morfología L1, 2) Morfología L2, 3) Morfología L3 (Conter <i>et al.</i> , 2004).	8
3	Mecanismo de acción de inducción a la apoptosis mediado por glucocorticoides en linfocitos. HSP90: Proteína de Choque Térmico 90, P23: Co-chaperona de HSP90, GR: Glucoreceptor, Bim: proteína proapoptótica, Bax/Bak: Proteínas proapoptóticas, VDAC: Canal de Aniones Independiente de Voltaje, Apaf1: Proteasa-Factor activador 1- de apoptosis, ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, Ca ²⁺ : Calcio (Barnes y Adcok, 2009).	11
4	Principio de operación AFM, indica principales componentes para su funcionamiento (Eaton y West, 2009).	20
5	Deflexión del cantilever y posicionamiento del láser. 1). Deflexión del cantilever, cuando este se encuentra centrado, la deflexión es cero, opción a). De lo contrario, si este se encuentra flexionado, la deflexión es mayor que cero y se ubica fuera del punto central, opción 1, inciso b). 2) Fotodetector y sus cuadrantes, opciones c d y f, diferente posicionamiento del láser (Eaton y West 2010). Defl: deflexión, Vsup: voltaje superior, Vfondo: voltaje del fondo	21
6	Micrografía de cultivo celular CCL-120 de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo B bajo el microscopio óptico (Tomado en Laboratorio de Células de Cáncer, DICTUS).	29
7	Fórmula para la obtención de la concentración inhibitoria media del fármaco.	30
8	Sistema cantilever punta. A y B) imagen de la punta obtenida por microscopio electrónico .C) proporciones del cantilever y punta (Mikromash, 2019).	32
9	Fotodetector y cuadrantes. 2) Haz centrado 3) C-D: Deflexión vertical 4) A-B Indica una deflexión del cantilever (Eaton y West, 2009).	33
10	IC ₅₀ de metilprednisolona de la línea celular CCL-120 de LLA-B, a partir de MTT.	37
11	Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 como grupo control. La primera columna corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de 3x5 μm y la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 1: Célula representativa del control, corresponden a los linfoblastos sin ningún tipo de tratamiento. 1.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 1.2: ultraestructura de citoplasma celular. 1.3: morfología celular en 3D. Célula 2: Célula representativa del control, 2.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 2.2: ultraestructura de citoplasma celular y 2.3: morfología en 3D de Linfoblasto 2.	41
12	Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 con un tiempo de exposición de 24 horas a Metilprednisolona. La primera columna	42

	<p>corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de 3x5 μm y la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 3: Célula representativa del grupo 24 horas.3.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, flecha rosa indica irregularidades en periferias membrana nuclear, 3.2: ultraestructura de citoplasma celular. 3.3: morfología celular en 3D, flecha azul, fragmentación nuclear temprana, flecha verde, hendiduras nucleares. Célula 4: Célula representativa del grupo 24 horas, 4.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 4.2: ultraestructura de citoplasma, con especial enfoque en poro citoplasmático de 0.8x0.8μm y 4.3: morfología en 3D de Linfoblasto 4, flecha negra, localización poro figura 4,2, flecha amarilla, invaginación temprana en citoplasma</p>	
13	<p>Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 con un tiempo de exposición de 48 horas a Metilprednisolona. La primera columna corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de 3x5 μm, la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 5: Célula representativa del grupo 48 horas.5.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, con largas líneas de fragmentación en las periferias del núcleo, 5.2: ultraestructura de citoplasma celular. 5.3: morfología celular en 3D, flecha blanca fragmentación citoplasmática avanzada, con ruptura celular. Célula 6: Célula representativa del grupo 48 horas, 6.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo con fragmentaciones nucleares 6.2: ultraestructura de citoplasma y 6.3: morfología en 3D de Linfoblasto 6, flecha roja, hendiduras en los inicios del citoplasma y periferias del núcleo, citoplasma periférico con microfragmentos.</p>	43
14	<p>Gráfica de caja para altura celular sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. No se obtuvieron diferencias significativas entre las alturas con los distintos tratamientos.</p>	45
15	<p>Gráfica de caja para diámetro celular sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. No se obtuvieron diferencias significativas entre los diámetros sometidos con los distintos tratamientos.</p>	46
16	<p>Gráfica de caja para Rugosidad celular R_q sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. Hubo diferencias significativas entre rugosidad del tratamiento control y el tiempo de exposición de 24 horas.</p>	48
17	<p>Gráfica de caja para Rugosidad celular R_a sometida a los tres tratamientos, grupo control^a, tratamiento con MP a las 24^b y 48^{ab} horas. Hubo diferencias significativas entre rugosidad del tratamiento control y el tiempo de exposición de 24 horas, así como también el de 48 horas.</p>	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Inmunofenotipo de Leucemia Linfoblástica Aguda (Rajkumar, 2017).	7
2	Características de la punta y cantilever suministrados por la marca Mikromash®.	32
3	Promedio de diámetros y alturas en cada tiempo de exposición. Cada grupo representa 4 células. DE: Desviación Estándar.	44
4	Promedio de rugosidad Ra y Rq, sometidos a distintas condiciones de tratamiento 24 y 48 horas con MP. Los * indican resultados estadísticamente significativos entre los diferentes tratamientos.	47

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por una proliferación excesiva de células, mayormente causada por alteraciones genéticas, debido a una carencia en los mecanismos de regulación del ciclo celular. Este proceso puede afectar a cualquier tejido del cuerpo, generando células anormales con tendencia hacia la invasión de órganos, siendo la metástasis la principal causa de muerte por cáncer (World Health Organization, 2018). Esta enfermedad es la segunda causa de muerte a nivel mundial, seguido de las enfermedades cardiovasculares. Las dificultades para un diagnóstico clínico y patológico certero y la disminuida cantidad de marcadores moleculares son los principales factores de la alta tasa de mortalidad (Yadav *et al.*, 2019). Por lo general el tratamiento del cáncer consiste en la quimioterapia, radioterapia, cirugía y trasplante de células madre, siendo una combinación de tratamientos o alternativas que hasta el momento se ofrecen para el tratamiento del cáncer (Miller *et al.*, 2016).

La leucemia es una patología que afecta directamente a las células sanguíneas, en especial a los glóbulos blancos “Granulocitos”, causando un aumento e invasión de células inmaduras en sangre. La clasificación de la leucemia viene dada en función de su rapidez de reproducción, como las leucemias agudas, caracterizadas por una alta tasa de replicación, mientras que en las leucemias crónicas su tasa de crecimiento es lenta. Otra clasificación es en la afectación al tipo de célula, como las células mieloides y linfoides (Ruiz-Argüelles, 2014). Las leucemias Linfoides Agudas o Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), son las más frecuentes en la población infantil, siendo un grupo de neoplasia con precursores de linaje B y T, por lo cual son morfológicamente e inmunotípicamente diferentes (Onciu, 2009). En cuanto al tratamiento de la LLA se opta por la quimioterapia, como tratamiento estándar, en caso de la existencia de factores de riesgo de mal pronóstico se recomienda un trasplante de células madre (Miller *et al.*, 2016). Por lo general al momento del tratamiento, la quimioterapia es dividida en tres etapas, inducción a la remisión, profilaxis al sistema nervioso central y la de mantenimiento; antes de la primera etapa se suministra un esteroide por 7 días, la principal función del fármaco es dar un factor pronóstico, clasificando a los pacientes por grupos de riesgo, con una buena, regular o mala respuesta al tratamiento (Tissing *et al.*, 2003).

Actualmente, la complementación de nuevas tecnologías para el diagnóstico clínico provee una mejor potencialización y un diagnóstico más certero del cáncer. El uso de la

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en combinación con otras técnicas histológicas, citológicas e inmunoquímicas, provee detalles finitos de la membrana celular, profundizando en el estudio de la dinámica y arquitectura de los tejidos, evidenciando características típicas de un tejido normal o canceroso. Uno de los principales marcadores morfológicos es la rugosidad la cual provee información de los eventos externos relacionados con el ambiente extracelular, por lo tanto, este parámetro podría ser usado como un nuevo biomarcador de la superficie celular, con el objetivo de caracterizar la función celular y comprender los procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Francis *et al.*, 2010).

El uso de AFM para la observación de la morfología celular presenta grandes ventajas sobre la microscopía óptica, siendo una técnica con resolución molecular capaz de apreciar la ultraestructura celular entre pacientes sanos y enfermos, debido a esas ventajas AFM es altamente aplicable en el campo biomédico (Jembrek *et al.*, 2018). Lo que es más importante, los métodos de diagnóstico actuales no son lo suficientemente sensibles como para ser utilizados en investigaciones dirigidas con el objetivo de proporcionar información a nivel de nanoescala y no pueden discriminar entre los microcambios de la membrana celular en respuesta a tratamientos farmacológicos (Wang *et al.*, 2009). Por ello, una de las aplicaciones de esta técnica sería una alternativa auxiliar en el diagnóstico diferencial enfocada en el laboratorio clínico o patológico, otra implementación sería para la evaluación del efecto nuevos fármacos anticancerígenos en la morfología celular (Deng *et al.*, 2018).

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar el efecto de la Metilprednisolona en células CCL-120 de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo B y proponer las propiedades morfológicas en este caso la rugosidad como parte de un biomarcador diagnóstico mediante el desarrollo de un protocolo experimental para la fijación de células en suspensión y su posterior observación a través de Microscopía de Fuerza Atómica.

I. ANTECEDENTES

I.1 Generalidades del Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por una proliferación excesiva de células, mayormente causada por alteraciones genéticas, debido a una carencia en los mecanismos de regulación del ciclo celular. Este proceso puede afectar a cualquier tejido del cuerpo, generando células anormales con tendencia hacia la invasión de órganos, siendo la metástasis la principal causa de muerte por cáncer (World Health Organization, 2018).

Esta patología adquiere propiedades aberrantes, en consecuencia, les permite a las células anormales sobrevivir en ambientes adversos, debido a estas características, es posible identificarlo sobre el tejido normal. A continuación, se enlistan las características propias del cáncer como: 1) evasión de mecanismos genéticos, es decir, la célula desactiva procesos de regulación, por consiguiente, inactiva genes supresores de tumores (P53, APC, RB, BRACA, BCR, etc), encargados de procesos como división, ciclo y muerte celular, así como regulación de la expresión génica, e inhibe la regulación de oncogenes implicados en la mayoría de los cánceres (Ras, Myc, ABL, etc.). Otro mecanismo de evasión es el aumento en la cantidad de la enzima telomerasa, por lo general, se encuentra presente en células madre, germinales y cancerosas; esta enzima está encargada de añadir segmentos de ADN en los extremos cromosómicos, lo contrario a las células somáticas maduras donde se encuentra ausente habiendo un acortamiento telomérico y envejecimiento celular. 2) metabolismo alterado, conforme las mutaciones se van acumulando, las células optan por tomar otras vías energéticas alternas, por lo general, el proceso mayormente utilizado es a través de fosforilación oxidativa, no obstante, las células cancerosas desplazan este mecanismo y se adaptan a la vía glucolítica aeróbica, siendo ésta la principal para la obtención de energía. 3) angiogénesis, la demanda de nutrientes de las células cancerosas generan las condiciones necesarias para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, las células cancerosas tienen la capacidad de originar nuevas vías circulatorias con la principal función de obtener una mayor cantidad de nutrientes debido a la alta demanda nutricional de la sobrepoblación celular. 4) adhesión, esta característica se ve alterada, por lo tanto, las células se tornan más elásticas confiriéndole una mayor capacidad de

migración y, en consecuencia, hay una invasión hacia otros órganos y sistemas. 5) morfología, por lo general, el tejido normal tiene características definidas, como un núcleo, nucléolo, membrana definida, en el caso de las células neoplásicas presentan irregularidades en la forma, núcleo, etc. (Alberts, 2016).

I.2 Estadísticas del Cáncer a Nivel Mundial

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. La OMS reportó en el 2018 una incidencia de 18.1 millones de casos diagnosticados con cáncer, mientras que de esa cifra se registró una mortandad de 9.5 millones de personas debido a esta enfermedad (Figura 1). Para el año 2040 se estiman 29.5 millones de nuevos casos de cáncer, tanto el número de muertes será de 16.4 millones. Cabe recalcar que tanto las cifras de incidencia como mortandad muestran una tendencia de incremento conforme pasan los años, siendo el cáncer uno de las principales causas de muerte en el mundo y uno de los principales problemas de salud mundial a resolver (Globocan, 2018).

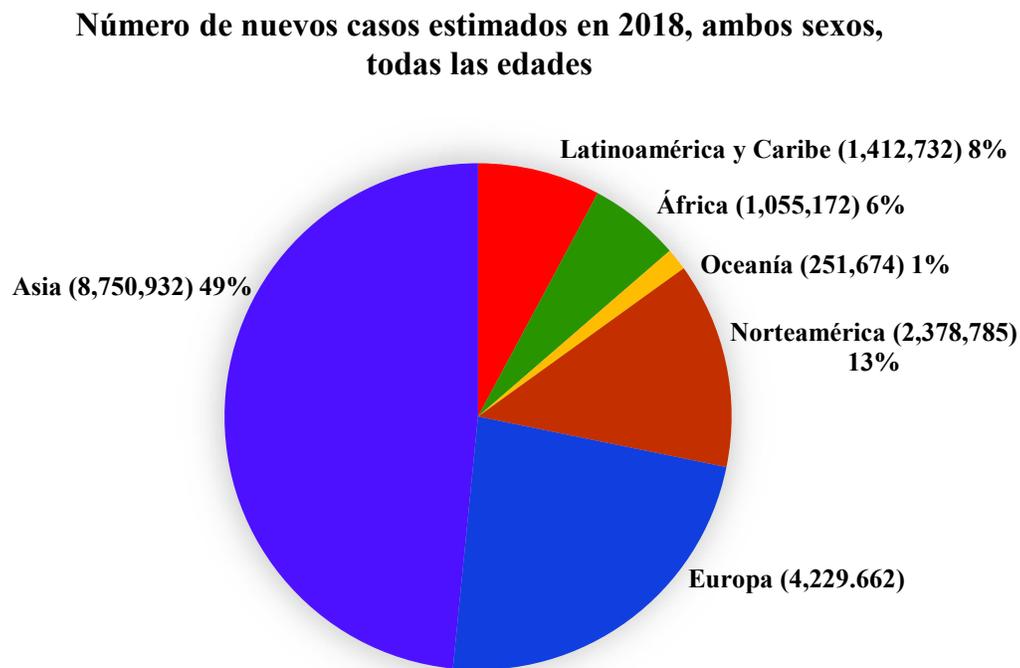


Figura 1. Incidencia del cáncer a nivel mundial en el año 2018 (Globocan, 2018).

I.3 Leucemia

Es una patología hematológica, con afectación directamente en las células sanguíneas, en especial las células blancas, teniendo origen en médula ósea donde las células oncogénicas emergen a partir de una clona germinal hematopoyética, en ese sentido, la célula adquiere una serie de mutaciones en el ADN, afectando la regulación del ciclo celular, proliferación y otros procesos. La clasificación de las leucemias viene dada por la línea celular a la cual afectan, siendo las células linfoides y mieloides; otra es por la tasa de crecimiento celular, clasificándose en agudas (crecimiento celular acelerado) caracterizada por una proliferación de células inmaduras llamadas blastos, mientras que en las leucemias crónicas (crecimiento celular lento) la principal característica es la afectación en células de mayor estadio de diferenciación. De este modo, el enfoque de las leucemias viene dado acorde a su clasificación, según la tasa de replicación y la línea celular afectada. Entre las leucemias más frecuentes, se encuentra la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), la cual tiene afectación directa en la línea linfóide, en particular la célula no madura en estadios posteriores a la linfopoyesis, conociéndose con el término de blastos (células inmaduras) y teniendo un tiempo de vida mayor al normal, sin cumplir las funciones especializadas, propias de las células diferenciadas (Ruiz-Argüelles, 2014).

I.3.1 Estadísticas de LLA

En términos generales para el año 2019, en Estados Unidos, las estimaciones de nuevos casos de leucemia fueron aproximadamente 61,780 casos, mientras la predicción fue de 22,840 casos, las tasas de incidencia, del año 2011 al 2015, fueron del 13.8, mientras que la tasa de muerte del 2012 al 2016 fue de 6.5%. Por otra parte, las incidencias de LLA son aproximadamente 5,930 nuevos casos, donde serán afectados 3,280 hombres y 2,650 mujeres; como resultado, 1500 personas, de las cuales 850 hombres y 650 mujeres, se predice que morirán a causa de esta enfermedad. Los riesgos de LLA son mayores en infantes, especialmente a la edad de 5 años, cuando el individuo llega a la edad de 20 años, el riesgo disminuye a la mitad, volviéndose a elevar después de los 50 años de edad. Frecuentemente, alrededor de 4 de cada 10 casos de LLA corresponden a adultos (American Cancer Society, 2019).

Es importante destacar que la probabilidad de padecer LLA durante toda una vida es de 1 entre 750, y los hombres tienen una mayor posibilidad de presentar esta enfermedad que las mujeres. En lo que respecta a las razas, investigaciones muestran una mayor incidencia en caucásicos, seguido de hispanos, indios americanos, negros y asiáticos. LLA representa la neoplasia infantil más incidente, representa el 40% de los nuevos casos diagnosticados y se puede detectar a una razón de 4 casos por cada 100,000 habitantes, por lo general es la leucemia de mayor frecuencia en la población infantil es la LLA de tipo B. (Morales-Peralta *et al.*, 2014; American Cancer Society, 2018).

Desde la perspectiva nacional, se llevó a cabo una investigación en la cual se estudió la población infantil afiliada al Seguro Popular en un rango de edades desde 0 a 18 años, donde se observaron tasas de incidencia, registrándose un total de 14,178 pacientes oncológicos en un lapso del 2007 al 2012, del cual resultó un porcentaje estimado del 49.8% de pacientes con leucemia y aproximadamente el 83% correspondientes a LLA. Con respecto a las estadísticas para el Estado de Sonora, se han realizado investigaciones procedentes del Hospital Infantil en un lapso del 1979 hasta el 2008, y se han reportado 882 casos de pacientes oncológicos, como resultado el número de casos de leucemias fueron de 351, correspondientes a un 39.7% con esta patología. En otro estudio se indica que la LLA contribuye a un 80% de las neoplasias de origen tumoral, afectando a niños entre edades de 2 a 5 años, mientras que la tasa de incidencia en menores de 15 años es de 120 nuevos casos por millón (Rivera-Luna *et al.*, 2015; Covarrubias-Espinoza *et al.*, 2008).

I.3.2 Clasificación de las leucemias

I.3.2.1 Inmunológica

Con respecto a su tipo celular LLA puede clasificarse en estirpe B o T, esto es debido a los grupos de diferenciación (CD “Cluster of Differentiation”) contenidos en la membrana del linfocito, por lo que genera una clasificación de tipo inmunológico (Tabla 1); el citoplasma y el núcleo de la célula inmadura serán una pieza clave para dilucidar el tipo de leucemia que presenta el paciente, por ello las clasificaciones de leucemia más comunes son pre B temprana, B transicional y B madura, aun cuando también hay otro tipo de categorización respecto a su

morfología regido por los criterios de la asociación Franco-Americana-Británica (FAB) (Rendón-García, 2011).

Tabla 1. Inmunofenotipo de Leucemia Linfoblástica Aguda (Rajkumar, 2017).

Comúnmente positivo	Expresión variable
CD19	CD20
cCD22	CD34
cCD79a	CD45
PAX5	CD13
CD10	CD33
CD22	sIgM
CD24	
TdT	

I.3.2.2 Morfológica

Según la Asociación FAB, la leucemia Linfoblástica Aguda está clasificada en tres tipos, L1, L2 y L3, acorde a cada una, se toman diferentes parámetros, como el radio del núcleo, citoplasma, tamaño celular, número de nucléolos, extensión del citoplasma, basofilia y vacuolización del mismo, así como otras características citoquímicas. El esquema se divide en la clasificación L1, donde las células tienen un tamaño menor de 12 micras, la forma del núcleo se presenta regular, pero este puede mostrar hendiduras y la relación núcleo citoplasma es elevada (Figura 2, opción 1). L2: los tamaños celulares van mayores a 12 micras con una heterogeneidad celular, la cromatina nuclear varía de difusa a condensación gruesa, la forma nuclear puede presentar hendiduras y muescas, los nucléolos a menudo están presentes y pueden ser grandes por lo general el citoplasma es abundante (Figura 2, opción 2). Por último, la clasificación L3: presenta tamaños celulares grandes, la cromatina densa, mientras que la forma nuclear es oval, o redonda, donde pueden presentarse uno o más nucléolos y la proporción citoplasma núcleo es moderadamente abundante rodeando completamente el núcleo (Figura 2, opción 3) (Hassan *et al.*, 1992; Morraja *et al.*, 1979).

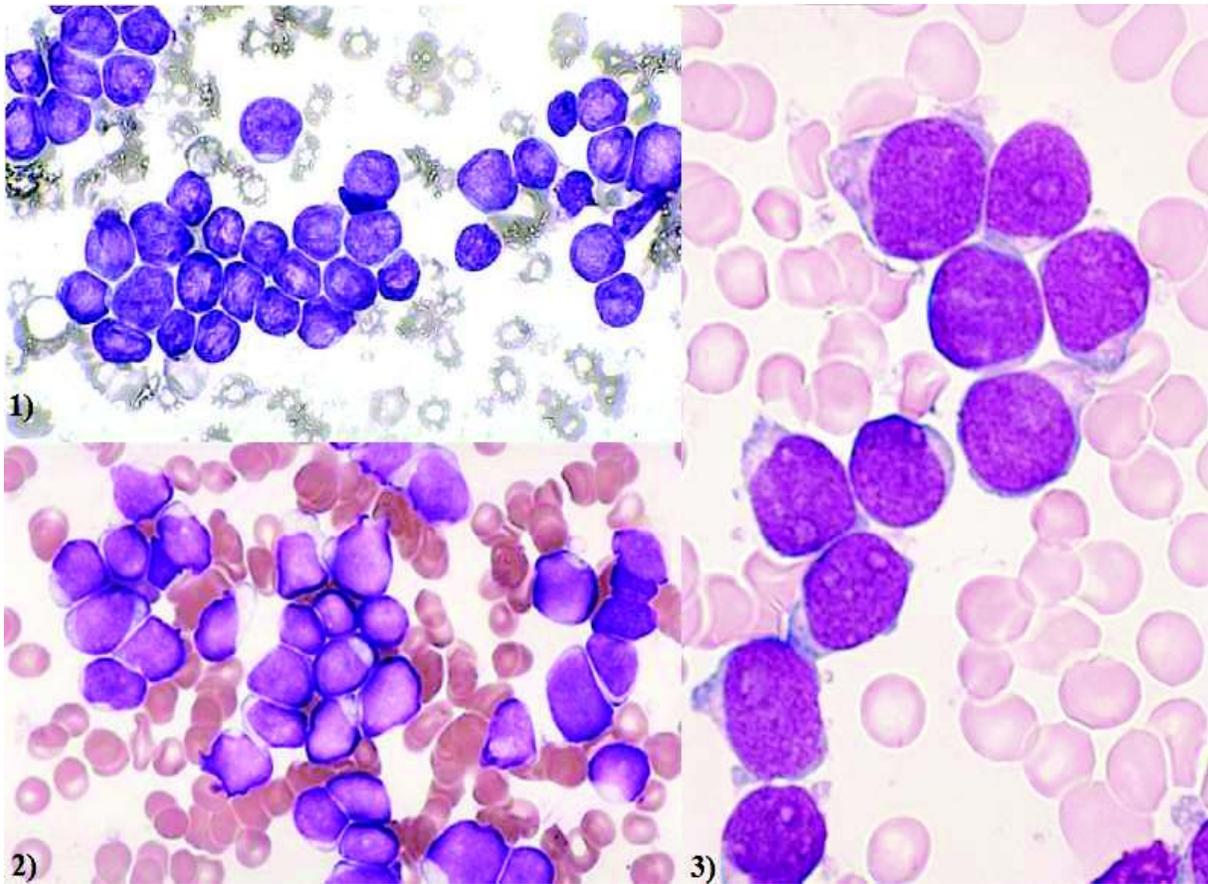


Figura 2. Clasificación morfológica de la FAB de LLA. 1) Morfología L1, 2) Morfología L2, 3) Morfología L3 (Conter *et al.*, 2004).

I.3.3 Tratamiento

La quimioterapia es el tratamiento principal de la LLA, el cual consta de un régimen de multifármacos, dividiéndose en tres etapas, con duraciones desde uno hasta tres meses; la primera de ellas es la de inducción a la remisión y su finalidad es descartar la mayoría de las células oncogénicas y eliminarlas de una forma rápida en el paciente, con el objetivo de entrar en remisión y lograr un 5% de blastos en médula y en sangre periférica; la siguiente fase es la de consolidación o también llamada terapia santuario, tratando de eliminar la leucemia albergada en el sistema nervioso central; la última etapa es la de continuación, manteniendo

la remisión y previendo la recaída, sirviendo como un paso directo a la reinducción; el tratamiento dura de 1 a 2 años, dependiendo de las condiciones del paciente y los criterios pronósticos identificados (Tatar *et al.*, 2016; Smith y Cidlowski, 2010).

I.3.4 Inducción a la remisión

Es la primera de las tres etapas del tratamiento en general, dura aproximadamente entre 4 y 6 semanas; el objetivo de esta etapa es la de eliminar hasta un 95% células inmaduras. Los fármacos utilizados son vincristina, antraciclinas (doxorubicina o daunorubicina), L-asparaginasa y glucocorticoide (prednisona, dexametasona o metilprednisolona). Después de haber completado esta etapa se toma una muestra de médula ósea para revisar los porcentajes de blastos y confirmar la remisión, a partir de ello, se estratifican los riesgos del paciente, intermedio, alto y los pacientes son sujetos a ajustes del protocolo, acorde a su nivel de riesgo y se procede a las siguientes etapas del tratamiento. Se ha reportado que el tratamiento inicial, es un pronóstico fuerte para definir la LLA, debido a que es bien sabido que a la terminación de esta etapa se sabe si el tratamiento inicial fue favorable o no para el paciente para después de ello adecuar protocolos para las siguientes etapas de la quimioterapia (Cooper y Brown 2015; Chang *et al.*, 2008; Dördelmann *et al.*, 1999).

I.3.5 Etapa del esteroide

Antes de la terapia de inducción a la remisión, los protocolos para el tratamiento de leucemia recomiendan el suministro de medicamento esteroide, a manera de una preinducción, donde se administra al paciente prednisona, dexametasona, hidrocortisona o metilprednisolona y se realiza un conteo de blastos al séptimo día de la primera dosis. La mayoría de las asociaciones para el cáncer como Childrens Oncology Group (COG), Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), y la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), proponen el uso del medicamento ya sea para la preinducción o durante las fases posteriores al tratamiento; en cuanto a los reportes estatales en el Hospital Infantil del Estado de Sonora lo utilizan durante la preinducción y durante otras demás fases del tratamiento (Dolai *et al.*, 2015; Larios-Farak, *et al.*, 2016). Este procedimiento, por lo general funciona como un indicador a la respuesta del

tratamiento, permitiendo orientar el protocolo para cada paciente clasificando en grupos de riesgo, ya sea bajo, intermedio y alto, por ello su importancia como indicador pronóstico. Durante la ventana del esteroide, se evalúa la respuesta al séptimo y octavo día por medio de un frotis de sangre periférica, a través del conteo de blastos, si el paciente tiene una buena respuesta a la preinducción, habrá una cantidad menor de un 5% de blastos (lo que correspondería a una cantidad de 1000 células/mm³), de lo contrario el paciente no responderá de manera normal a la terapia, e incluso predice la recaída en los pacientes. En cuanto al grupo BFM, éste se basa en una respuesta inicial a la prefase de inducción, así como también en la categorización de los pacientes acorde a la respuesta del esteroide y también se indica una modificación al tratamiento acorde al grupo de clasificación del paciente sometido a la prefase de inducción a la remisión (Rendón-García *et al.*, 2017; Protocolo LAL del Seguro Popular, 2011).

I.3.6 Fármacos glucocorticoides

Los esteroides son una familia de fármacos antiinflamatorios encargados del manejo de ciertas patologías inflamatorias, éstos se biosintetizan en las glándulas adrenales, siendo la molécula de colesterol la precursora de estructuras esteroideas. La prednisona es un corticoide sintético, caracterizado por ser un fármaco utilizado en diversas terapias para enfermedades relacionadas con el sistema inmune, ciertas neoplasias como leucemia, el asma, trasplantes de órganos, artritis, etc. (Barnes y Adcok, 2009; Löwenberg *et al.*, 2008).

I.3.7 Mecanismo de acción

La prednisona se convierte en el metabolito activo prednisolona en el hígado. La prednisolona suele difundirse pasivamente a través de la membrana celular, donde se une a los Receptores de Glucocorticoides (GR) en el citoplasma. Tras la unión, el receptor de GR, se disocia de la proteína de choque térmico 90 y se trasloca al núcleo. En el núcleo, los dímeros de GR pueden unirse a Elementos de Respuesta a Glucocorticoides (GRE) en la región promotora de los genes antiinflamatorios, lo que activa su transcripción. Es importante destacar que el mecanismo de acción de los corticoides puede tener diversas dianas como la activación del proteasoma, encargado de degradar proteínas encargadas de la regulación de procesos apoptóticos, así como

también inhibición de proteínas encargadas de la respuesta de muerte celular debido a la vía intrínseca de la apoptosis mediada por proteínas como Bim, Bax y Bak, formando un poro en membrana mitocondrial liberando contenido como Especies Reactivas de Oxígeno “ROS”, ceramidas, iones, etc. También se libera el citocromo C, siendo la base para desarrollar subunidades de Apaf1, formados a partir de caspasas iniciadoras y ejecutoras encargada de formar apoptosoma, liderando la degradación de proteínica, tanto del núcleo como citoplasma celular (Figura 3) (Smith y Cidlowski, 2010; Pujolsa *et al.*, 2009).

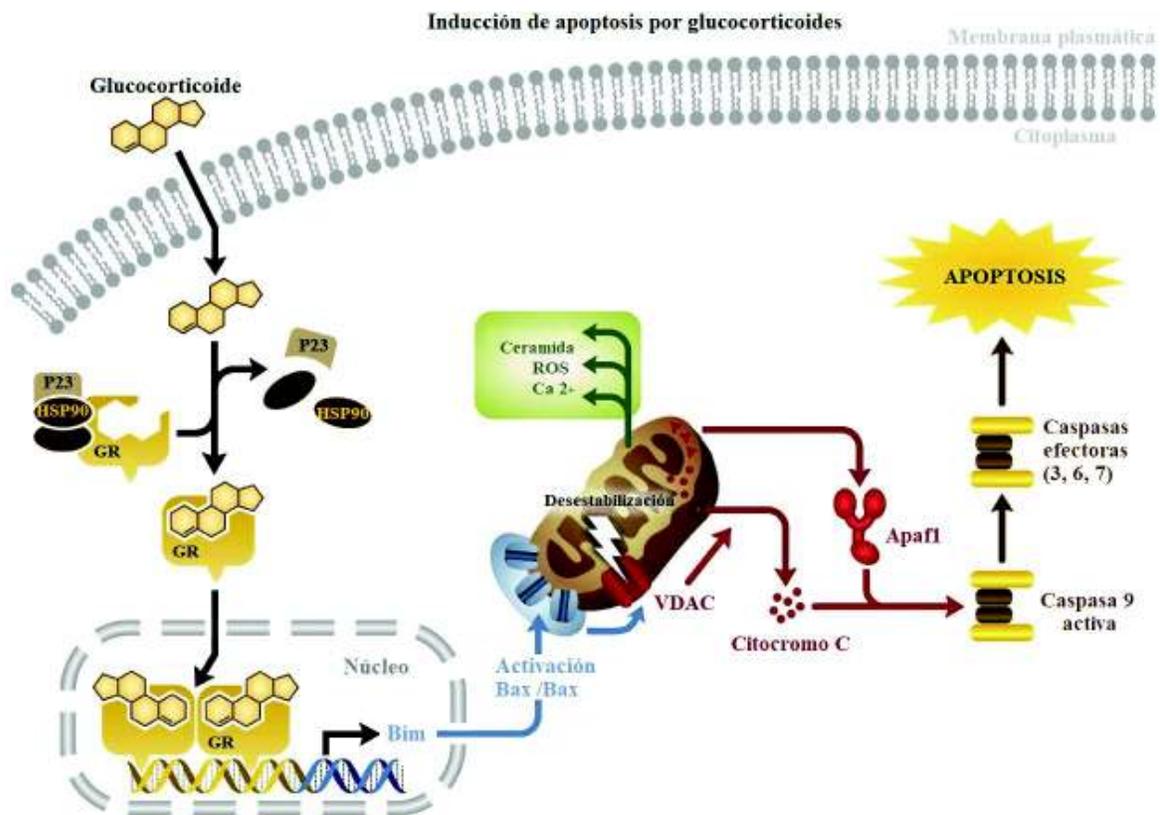


Figura 3. Mecanismo de acción de inducción a la apoptosis mediado por glucocorticoides en linfocitos. HSP90: Proteína de Choque Térmico 90, P23: Co-chaperona de HSP90, GR: Glucoreceptor, Bim: proteína proapoptótica, Bax/Bak: Proteínas proapoptóticas, VDAC: Canal de Aniones Independiente de Voltaje, Apaf1: Proteasa-Factor activador 1- de apoptosis, ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, Ca²⁺: Calcio (Barnes y Adcock, 2009).

I.4 Importancia de la Biofísica Celular en el Cáncer

La Biofísica celular está enfocada en el estudio de la célula por medio de fundamentos y principios fisicoquímicos, con el principal objetivo de dar explicación al comportamiento y desarrollo de los niveles celulares. Por ello es de gran importancia la organización de la estructura celular, enfocándose directamente en la célula y así, obtener información detallada sobre ella; por lo tanto, la microscopía ha tomado un auge para el entendimiento acerca de los detalles a nivel molecular y en lo que refiere a la organización de los diversos componentes celulares. Debido al estudio a nivel celular, se puede inferir el comportamiento en otros niveles más complejos, como es el caso de los tejidos (Horwitz, 2016). Esta ciencia ha tomado una gran relevancia para la explicación del comportamiento de los sistemas complejos en el cuerpo humano, por ello, se han desarrollado nuevas tecnologías para el estudio e investigación de problemas biológicos y fisiológicos en procesos celulares; gracias a la Nanotecnología se han creado nuevas técnicas a escala nanométrica acompañados con avances en bioimagen para la observación *in vivo* y a nivel molecular (Suresh, 2007). El propósito de la Biofísica en cuanto al cáncer, es intentar comprender procesos celulares, y discernir entre un tejido sano y canceroso, como en este caso, una de las aplicaciones prometedoras en un futuro es implementar técnicas relacionados con la detección, es decir, descubrir indicadores para la ayuda de nuevos diagnósticos médicos con parámetros como elasticidad, los cuales pueden ayudar a la comprensión de fenómenos como la metástasis, principal causa de muerte por cáncer y otro indicador sería la morfología, característica especial dado que se puede obtener una resolución de nivel molecular, por ende, se puede diferir entre una célula normal u oncogénica (Suresh 2007).

Las investigaciones biofísicas actuales de las células se han enfocado en las propiedades celulares y subcelulares, desde diversas perspectivas como la mecánica, midiendo elasticidad, viscosidad, fricción y velocidad de flujo en procesos celulares (Flenner *et al.*, 2008). Desde la perspectiva morfológica las investigaciones se enfocan en estudiar la estructura o ultraestructura celular, es decir, en el conjunto de biomoléculas y macromoléculas dispuestas en la superficie celular, tales como proteínas fibrosas, receptores, glicoproteínas, proteoglicanos, glucosaaminoglicanos, etc. (Ariza de Schellenberger, Bergs, Sack y Taupitz, 2018).

En términos generales, las células cancerosas presentan determinadas características, como cambios en la superficie celular, volumen, relación núcleo/citoplasma, distinta forma y densidad. Las características ultraestructurales están relacionadas con la segmentación del núcleo, invaginaciones, aumento de granulación en la cromatina e incremento de los poros en la membrana nuclear, así como la formación de inclusiones, etc. los cambios nucleares explican la presencia de diferentes clonas celulares y anomalías genéticas asociadas con estos cambios. Es importante destacar que, en el campo de la Farmacología y desarrollo de nuevos medicamentos, se opta por el estudio sobre los efectos de las drogas en la estructura y superficie celular, así como todos los efectos que engloban los fármacos sobre las células cancerosas, sobre este contexto, los parámetros biofísicos representan un importante campo para la investigación, acerca de la comprensión de los mecanismos de acción de medicamentos sobre la morfología celular y otras propiedades biofísicas (Alves *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2007; Suresh, 2007).

I.4.1 Propiedades biofísicas en el cáncer

Por lo general estas son utilizadas para definir alguna propiedad y se utilizan para la caracterización celular, ya sea relacionado con procesos subatómicos, atómicos y moleculares, hay propiedades cuantificables de los procesos a nivel celular que pueden estar relacionados como por ejemplo movimiento, cargas de atracción y de repulsión, fuerzas electrostáticas, de Van der Waals, hidrofóbicas, enlaces covalentes, etc. Una de las características para la designación de una propiedad biofísica celular es, primeramente, entender los niveles de complejidad en la célula, siendo de suma importancia, debido a que pueden regirse por principios físicos y, por lo tanto, asignarle escalas físicas. Un nivel de complejidad sería proteína, filamento, citoesqueleto, célula y tejido, donde se comienza por los niveles más bajos de organización, después niveles más altos y por lo general, se les asocia la asignación de escalas físicas a células, grupos de células y tejidos, es decir, a los niveles más altos en el nivel de organización (Kubitschke, Morawetz, Käs y Schnauß, 2017).

I.4.2 Parámetros biofísicos

Cabe resaltar, que la mayoría de los estudios relacionados con propiedades biofísicas, se han llevado a cabo en células cancerígenas y también con células normales, esto con la finalidad de proponer ya sea una caracterización de algunas propiedades, así también como un biomarcador diagnóstico, por lo general, las propiedades biofísicas mayormente estudiadas son, la velocidad de flujo sanguíneo, cinética celular, difusión, perfusión, rigidez, elasticidad, viscoelasticidad, así como propiedades de estructura, densidad celular, heterogeneidad, anisotropía, etc. (Sack y Schaeffter, 2018).

En este caso la principal característica mencionada es la medición del módulo elástico, éste representa el grado de deformabilidad celular, característica importante dado que la mayoría de los cánceres terminan en metástasis. Diversos autores han estudiado en su mayoría la elasticidad celular, ya sea con el fin de caracterizar esta propiedad, indagar acerca de un mayor conocimiento de la línea celular a investigar o proponer dicha característica como una medida para discernir entre tejido canceroso y sano, ya que provee información acertada acerca del estado de desarrollo y progresión del cáncer; en casos específicos, se busca llegar a entendimiento en procesos como la leucostasis, efecto adverso de la leucemia aguda, a causa de la obstrucción en el tejido endotelial ocasionada por el acumulamiento de células leucémicas. En menor medida se han propuesto otras propiedades como las de campo eléctrico y conductividad eléctrica en las membranas celulares mostrando diferencias entre células neoplásicas y de tejido normal, donde hay una diferente afectación en el movimiento de moléculas, tráfico celular, potencial de membrana (Liu *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2011; Rosenbluth *et al.*, 2008; Preetha *et al.*, 2005).

I.4.3 Parámetros morfológicos

Son aquellos que presentan la estructura y conformación celular, dentro de los parámetros morfológicos se encuentra la ultraestructura, definida como la morfología de la superficie celular a escala nano o micrométrica, por lo general se presenta en tres dimensiones, donde se aprecian pequeños detalles estructurales del citoplasma celular y organelos; también se pueden observar los componentes granulares uniformemente distribuidos a través de la superficie

granular; además, se pueden percibir estructuras similares a protusiones de membrana, lamelipodias, filopodias, poros de membrana y cualquier estructura presente en la célula (Pettmann *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009, Matsko y Mueller, 2004). De igual manera, la rugosidad es uno de los parámetros de superficie más utilizados para la caracterización celular, en términos generales, está relacionada con la textura de la superficie, es decir, mide las irregularidades, así como hendiduras y elevaciones de algún material o tejido celular; esta propiedad, es medida en nanómetros o micras y está asociada al comportamiento celular, en procesos como diferenciación, proliferación y expresión génica (Ross *et al.*, 2011).

La membrana celular es importante para varios procesos como adhesión, migración, transducción de señales, intercambio iónico, transporte y reconocimiento celular. Por ello es de gran importancia el enfoque del estudio de la morfología celular y las propiedades ultraestructurales en muestras biológicas, así mismo, la topografía de la superficie ayuda a la comprensión de la composición bioquímica y biofísica de la membrana celular. Por lo tanto, puede ser un indicador sensible para monitorear los cambios a nivel celular (Jin *et al.*, 2013).

Dado que las células cancerosas presentan un cambio interno dentro de la estructura celular, lo cual se refleja morfológicamente en la membrana citoesqueleto y sus propiedades biofísicas, por ello se requieren técnicas apropiadas para la visualización y obtención de estas propiedades a escala nanométrica (Li *et al.*, 2017). Los mecanismos de fármacos son evidenciados en las alteraciones a nivel proteína, causando alteraciones en niveles más complejos, y provocando cambios estructurales en otros niveles como células y tejidos, estos cambios se ven reflejados a nivel nanoestructura y es por esta razón que el entendimiento de los mecanismos de acción de fármacos en la membrana plasmática servirán como un importante problema experimental y clínico para el desarrollo de mejores medicamentos al verse el efecto en la membrana celular (Kozlova *et al.*, 2013). Por lo tanto, se deben utilizar técnicas con tales características mencionadas y la ideal es AFM mayormente utilizada para la visualización de la nanoescala topográfica y la morfología de los tejidos; esta técnica permite medir la nanoescala, rugosidad de superficie, textura y dimensiones de los objetos investigados (Canetta y Adya, 2011). Otra ventaja de esta tecnología es la alta resolución molecular, la cual le permite la observación detallada de la membrana, por ende, no pueden ser examinados con otras técnicas convencionales (Joshi *et al.*, 2000).

I.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía es la más importante para los estudios morfológicos en el campo de la Biomedicina; hace unos siglos solo era utilizado el microscopio óptico convencional para apreciar la morfología celular, a través solo de un haz de luz y lentes; no obstante hace casi un siglo, hubo nuevos descubrimientos en cuanto a novedosos microscopios con una alta resolución, los cuales implicaban mecanismos con electrones y difracción de luz, entre ellos el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y Microscopio electrónico de Barrido (SEM), los que incrementaron significativamente la calidad de resolución, proveyendo los detalles a niveles menores a los micrométricos, los cuales sentaron las bases para la invención para la Microscopía de efecto túnel (STM), dando origen al AFM (Marrese *et al.*, 2017). STM presenta un sistema de vacío, la punta utilizada produce un voltaje entre la sonda y la muestra, que deben estar relativamente cercanos, solo a escasos angstroms y ambos materiales deben conducir la electricidad (Binnig y Rohrer, 1983). Mientras que STM con ligeras modificaciones se convirtió en una variante de microscopía, en el cual podían medirse fuerzas inferiores a los attonewtons (10^{-18}N), y pasó a ser Microscopía de Fuerza Atómica, esta nació a partir de la combinación de la técnica anterior, agregando como sonda un perfilómetro de lápiz, donde la punta no daña a la superficie de la muestra y no se requiere que sea superficie conductora (Binnig, *et al.*, 1986).

AFM es considerada la mejor técnica para la caracterización morfológica, en especial para el estudio de biomateriales y polímeros, en virtud de imágenes a gran resolución capaces de reproducir texturas en escala nanométrica y superficie en tres dimensiones. El entendimiento de las propiedades de superficie es de gran importancia al explorar las principales formas en la escala nanométrica. En lo que respecta al área biomédica, se han enfocado estudios en el campo de los biopolímeros, se ha optado por el uso del AFM para la caracterización de propiedades morfológicas en diversos biomateriales, donde, establecen que las propiedades biofísicas son aquellas como el tamaño celular, altura dinámica, rugosidad de la superficie, fuerza de adhesión y la rigidez (Marrese *et al.*, 2017; Dumman *et al.*, 2013). Las propiedades celulares, dado que ofrecen la cuantificación de parámetros exclusivos, desde la imagen obtenida de la superficie celular, hasta las fuerzas de interacción, siendo propiedades y características importantes de ciertas enfermedades como el cáncer; esta tecnología es ideal para estudiar los procesos y mecanismos relacionados con el cáncer, por lo cual, podría utilizarse para diseñar ensayos

clínicos acerca de nuevos medicamentos probados en células cancerosas para evaluar su efecto, también se podría utilizar como apoyo en diagnóstico rutinario de la enfermedad de importancia (Zemła *et al.*, 2018).

Una de las principales ventajas de esta técnica, sobre otras microscopías electrónicas, es la observación de la ultraestructura a escasos nanómetros de la superficie celular, la cual se puede apreciar en condiciones fisiológicas, debido a que la preparación de la muestra no requiere gran tratamiento como en las otras microscopías, como vacío y baño de electrones con metales, etc., por lo cual se puede observar el cultivo bajo las condiciones más estándares, de esta manera, AFM es una de las técnicas capaces de explorar en pequeñas escalas, la topografía de superficie a una gran resolución, nano y micrométrica (Joshi *et al.*, 2000).

Los principales componentes del AFM son cantilever o viga voladiza, encargada de escanear la superficie del material en estudio, al punto que ésta se desplaza a través de la muestra por medio de atracciones electrostáticas, otra pieza clave es el piezoescaner o también llamado piezoeléctrico, encargado de controlar el direccionamiento en los planos X, Y y Z. Para el desplazamiento de la viga voladiza sobre la muestra se requiere de la ayuda de un haz incidente para mover el cantilever, el láser se encarga directamente de posicionarse encima de la punta y que la viga recorra la superficie de la muestra (Daza-García, 2014; Cohen y Bitler 2008). Mientras que todas las señales del láser llegan hasta el fotodetector, siendo este la pieza clave para la traducción de la señal en voltios a bits en la imagen (Zemła *et al.*, 2018; Hansma *et al.*, 1994).

I.5.1 Componentes AFM: cantilever, fotodiodo y piezoeléctrico o piezoescaner

Cantilever o viga voladiza

Es una pieza clave para la microscopia de fuerza atómica, típicamente consta de una punta hecha a partir de silicón o nitruro de Silicio que va entre 5 a 10 nm de grosor (Figura 4, opción 4). Sobre la viga se incide el haz de luz (Figura 4, opción 5), éste debe colocarse en el extremo de la punta, una vez colocado el láser, éste promueve el movimiento e interacción de la punta con la muestra, la mayoría de las veces a escasos nanómetros, estando encargado de sondear la superficie de la muestra por medio de fuerzas tipo Van der Waals, magnéticas, fuerzas

magnéticas, térmicas etc., dependiendo del modo, como se indica a continuación, será la interacción entre la punta y la muestra (Zemła *et al.*, 2018; Daza-García, 2014; Tortonese *et al.*, 1997).

- **Modo contacto**

La punta toca la superficie de la muestra ejerciendo presión y las interacciones entre la muestra y la punta son de tipo repulsivas. Por lo general maneja altas velocidades de escaneo y presenta alta resolución, si la muestra es de carácter blando tiene a dañarse por el contacto.

- **Modo no contacto**

También es llamado, modo de Frecuencia de Modulación, la punta y la muestra están muy cercanas, pero no hacen contacto, las oscilaciones de la punta son bajas y no dañan la muestra estas fuerzas se consideran atractivas y por lo general son fuerzas de tipo Van der Waals.

- **Modo intermitente o Tapping**

Mayormente conocido como amplitud de modulación, la punta toca la muestra, pero se aleja completamente en cada ciclo de oscilación, ocasionalmente genera un contacto con la muestra y el daño es minúsculo. Se ha empleado principalmente para la caracterización topográfica de superficies celulares, debido a la aplicación de bajas velocidad de escaneo y una alta resolución de imagen.

Principio de deflexión

Debido a que la interacción entre la punta y la muestra es el principio básico del AFM, la medición de fuerzas se mide con base en la deflexión de la punta y el desplazamiento de la misma, esto siguiendo los principios de la ley de Hooke, donde F es la fuerza, k la rigidez de la palanca y z es la distancia a la que se dobla la palanca.

$$F = -kz$$

Conociendo la fuerza aplicada se puede obtener la relación entre la rigidez de la punta y el desplazamiento en el eje Z, entre mayor contacto tenga la punta con la muestra, mayores serán

las fuerzas repulsivas, mientras que entre mayor distancia entre la punta y la muestra se generan fuerzas atractivas (Daza-García, 2014).

Fotodiodo o fotodetector

Es el encargado de recibir las señales emitidas por el láser, después de haber incidido en la punta, dependiendo del ángulo de ésta, el detector tendrá diferentes posiciones las cuales se reflejarán en el fotodiodo. Consta de un circuito de retroalimentación conectado al piezoescaner y a la señal de transmisión electrónica (Figura 4, opción 4, 6 y 7). La interacción entre el movimiento de la punta, que a la vez se refleja en el detector a través del láser, incide directamente en la interacción entre el piezo, debido a que la viga se comporta como un resorte, tiende a mostrar desviaciones captadas por este dispositivo (Figura 5, opción 1 y 2). El movimiento entre la punta y la muestra en el eje z corresponde a la topografía de la muestra, el dispositivo se encarga de transformar la señal eléctrica en Volts para la transformación a nanómetros, durante la calibración mediante curvas de fuerza distancia. Consta de cuatro cuadrantes A, B, C y D, los cuadrantes A+B son la señal total del fotodiodo, la cual debe de estar en - 2 V y C+ D la señal de retroalimentación, como se muestra en la figura 4. Total, del fotodiodo, la cual debe de estar en - 2 V y C+ D la señal de retroalimentación, como se muestra en la imagen 9 (Eaton y West, 2009).

Piezoeléctrico o piezoescáner

Es una pieza clave para el funcionamiento del AFM, hecho de un material con propiedades especiales, debido a que es capaz de modificar sus proporciones al momento de suministrar voltajes, dependiendo de la polaridad proporcionada, por ejemplo, positiva, el material tiende a expandirse, y si es negativa, éste se contrae. Por lo general, el material es colocado en un tubo, donde encima se coloca la muestra (Figura 4, 1 y 2). La pieza permite movimiento en ángulos de direccionamiento X, Y, ocasionando el escaneo en movimiento perpendicular al eje del tubo, mientras que el ángulo en Z, permite interacciones con la punta, dando lugar a movimientos como arriba y abajo interaccionando con la punta (Eaton y West, 2009).

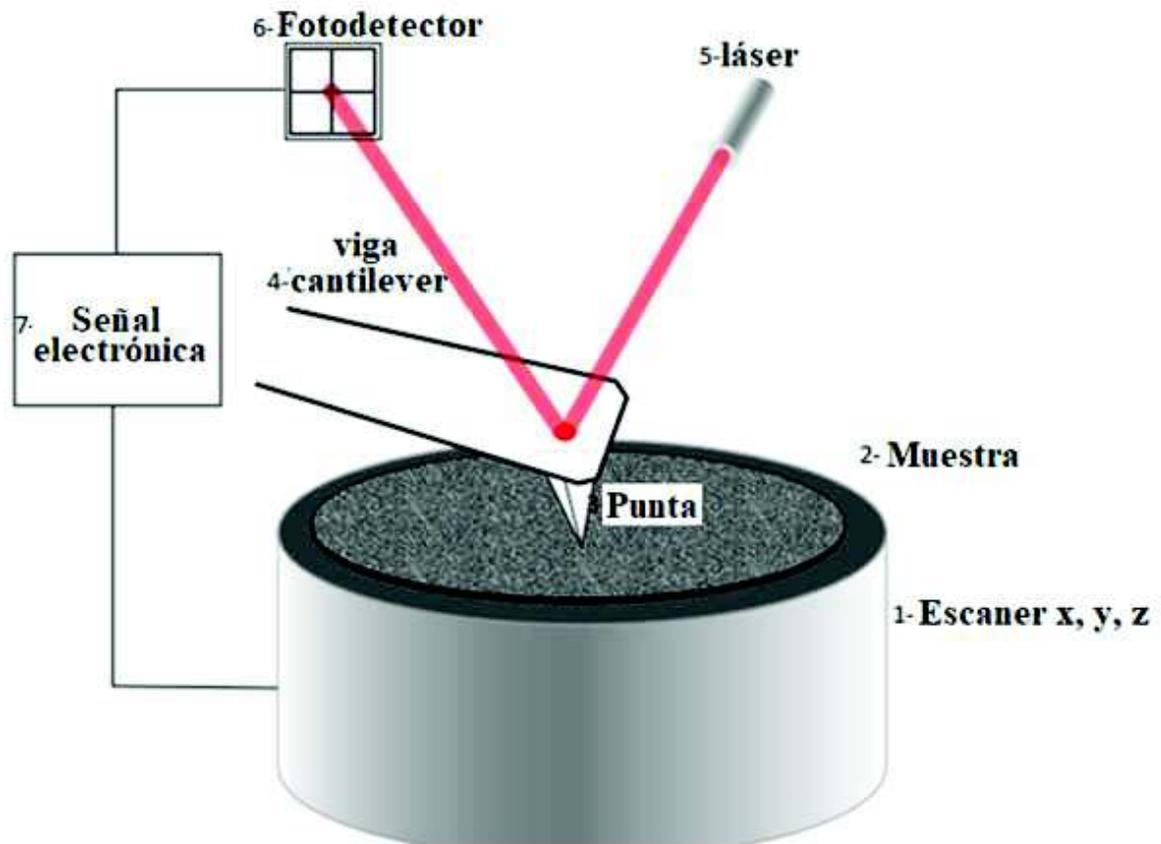


Figura 4. Principio de operación AFM, indica principales componentes para su funcionamiento (Eaton y West, 2009).

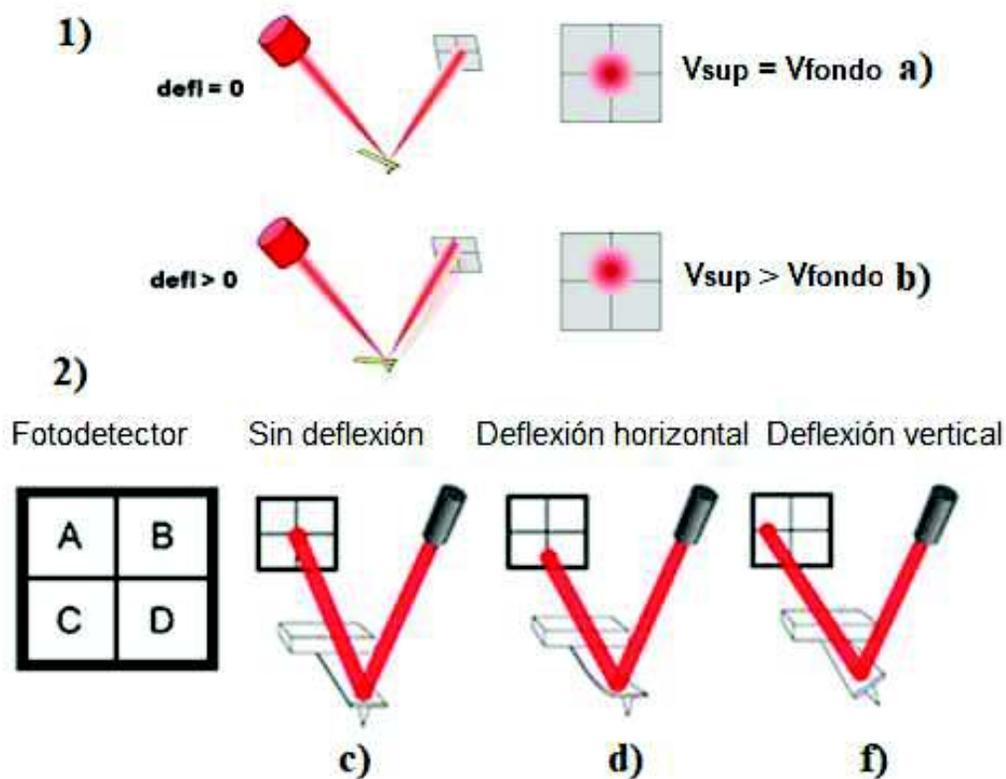


Figura 5. Deflexión del cantilever y posicionamiento del láser. 1) Deflexión del cantilever, cuando este se encuentra centrado, la deflexión es cero, opción a) De lo contrario, si este se encuentra flexionado, la deflexión es mayor que cero y se ubica fuera del punto central, opción 1, inciso b) 2) Fotodetector y sus cuadrantes, opciones c d y f, diferente posicionamiento del láser (Eaton y West 2010). Defl: deflexión, V_{sup} : voltaje superior, V_{fondo} : voltaje del fondo

I.5.2 Estudio de células adherentes por medio de AFM

Por lo general los estudios llevados a cabo con los tejidos celulares, se enfocan en las propiedades biofísicas y morfológicas ya sea de un tejido normal o canceroso, con exposición a agentes farmacológicos. En el trabajo Liu y colaboradores en 2018 se estudiaron mediante AFM las propiedades morfológicas como la altura, longitud, rugosidad de las células de cáncer de colon SW480 (mono y multinucleares), con el objetivo de comprender su resistencia a los medicamentos. Se incubaron con fullerenol en concentraciones de 2 mg/mL. De las células

mononucleares se obtuvieron los siguientes resultados, primero se mencionan los controles y después el tratamiento de 2 mg/mL de fullerenol, la primera característica es la altura: $2.16 \pm 0.29 \mu\text{m}$ la cual incrementó a $3.32 \pm 0.15 \mu\text{m}$, longitud celular disminuyó de $41.78 \pm 1.90 \mu\text{m}$, hasta $10.13 \pm 1.02 \mu\text{m}$, la rugosidad aumentó de $0.42 \pm 0.10 \mu\text{m}$ a $0.74 \pm 0.07 \mu\text{m}$. Mientras que, las células multinucleares tuvieron un aumento en la altura de 1.74 ± 0.20 hasta $2.47 \pm 0.38 \mu\text{m}$, también una disminuyó la longitud celular de $46.82 \pm 3.68 \mu\text{m}$ hasta un $30.32 \pm 6.36 \mu\text{m}$ y por último la rugosidad de $0.30 \pm 0.02 \mu\text{m}$ a $0.49 \pm 0.15 \mu\text{m}$. Los resultados indicaron que las células SW40 mononucleares eran más sensibles con el tratamiento que las multinucleares, teniendo estas una mayor resistencia al tratamiento, por lo tanto, en ésta investigación se proporciona una guía para los tratamientos de células cancerosas multi y mononucleares con fármacos.

Por otra parte, en la investigación de Lastella y colaboradores en 2007, se estudió mediante AFM las modificaciones morfológicas de la membrana celular de queratinocitos humanos tratados con distintas concentraciones yendo de 10^{-6} hasta 10^{-4} M de cloruro de mercurio. El estudio se enfocó en el efecto del mercurio, el cual produce asperezas y depresiones en forma de poros, especialmente a la concentración citotóxica, donde dichas características superficiales se localizaron principalmente en zonas periféricas de las células. Los hallazgos mostrados en el experimento mostraron que AFM puede ser una herramienta válida y útil para estudiar los cambios en la morfología de las células cuando se exponen a estrés químico. No obstante, otros estudios de AFM, en células de adenocarcinoma de cérvix (Hela) y adenocarcinoma endometrial (Ishikawa) se estudiaron propiedades celulares importantes incluidas la morfología, la rugosidad de la superficie y la rigidez, con medicamentos como paclitaxel. Durante este estudio se analizó la relación entre los cambios en la morfología y las propiedades biofísicas y la apoptosis. Después del tratamiento con paclitaxel, la membrana celular se fragmentó, la rugosidad de la superficie aumentó. Fueron dos tipos de rugosidad medida, la Ra y Rq, primero se menciona el control y después, el tratamiento con paclitaxel a las 24 horas, la rugosidad Ra en las células Hela fue de 92.2 ± 26.7 nm, aumentó a 97.9 ± 20.6 nm, mientras que la Rq se mantuvo igual de 118.5 ± 34.5 nm a 118.5 ± 28.7 nm, así mismo, las células Ishikawa presentaron Ra de 116 ± 20.4 nm a 193.9 ± 102.9 nm la cual presentó un aumento conforme al tiempo de exposición y la Rq casi se triplicó yendo de 90.8 ± 25.4 nm hasta 247.7 ± 122.4 nm. También en este estudio cuantificaron las alturas y como éstas se veían

afectadas a través del tiempo de exposición con paclitaxel, en las células Ishikawa la altura sin tratamiento fue de $4.11 \pm 0.85 \mu\text{m}$, para el tiempo de 24 horas disminuyó $0.3 \mu\text{m}$, $3.81 \pm 0.87 \mu\text{m}$ y por último aumentando a $5.24 \pm 1.22 \mu\text{m}$, en las células Hela ocurre casi la misma tendencia, teniendo una altura de $4.15 \pm 0.70 \mu\text{m}$, pero disminuyendo un poco más a $3.34 \pm 0.50 \mu\text{m}$ y por último aumentando más allá de una micra $4.46 \pm 1.07 \mu\text{m}$. Estos cambios se observaron más aparentemente después de un tratamiento de 24 horas, por lo tanto, la investigación sobre los cambios morfológicos y biofísicos por AFM en células cancerosas ayudó a evaluar las actividades anticancerígenas de los fármacos (Kim *et al.*, 2012).

En otras investigaciones referentes a AFM, se estudiaron las células de carcinoma de vejiga (MGH-U) y células de tejido normal urotelial (SV-HUC-1), donde se estudió el tamaño, los perfiles nanoestructurales, como la longitud $71.32 \pm 5.03 \mu\text{m}$, con una anchura de $17.45 \pm 0.58 \mu\text{m}$ y rugosidad de $271.65 \pm 18.9 \text{ nm}$, mientras que las células MGH-U1, mostró una longitud de $35.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$, una anchura de $24.55 \pm 2.98 \mu\text{m}$ y una rugosidad de $210.61 \pm 15.25 \text{ nm}$. Propiedades como la morfología de la superficie celular como rugosidad, longitud y grosor pueden servir como marcadores nanométricos, no solo para identificar células cancerosas sino también para distinguir entre diferentes fenotipos existentes en células normales y células cancerosa (Canetta *et al.*, 2014).

Otro tipo de enfoque que ha tomado AFM es el estudio del proceso y desarrollo de las células tumorales y la interacción con sustratos, ésto se llevó a cabo con el estudio sencillo a través de la morfología de células de carcinoma de pulmón A549 (Tomankova *et al.*, 2007).

I.5.3 Estudio de AFM enfocados a células no adherentes

Los principales enfoques de las células no adherentes han sido en su mayoría linfocitos y distintos tipos de leucemia. Por lo general los parámetros medidos son las propiedades viscoelásticas, morfología y nanoestructura de la superficie celular, ya sea en la exposición a algún medicamento u otro agente de exposición. Wu en el 2009 estudió los procesos en estados de reposo y activación de los linfocitos, donde los describió con una forma redonda a esférica, mientras que las microvellosidades y pseudopodos pueden verse claramente en las periferias de la célula. En el proceso de reposo el diámetro celular fue de $4.5 \mu\text{m}$, la altura de $1.87 \mu\text{m}$. Las

características de los linfocitos en proceso de activación fueron las lamelipodios similares a protusiones con una altura en promedio de 310 nm. En la superficie de membrana se detectaron poros de membrana cóncavos donde el promedio del diámetro de estos fue de 40.73 ± 10.95 nm, el diámetro de los linfocitos en activación fue de $5.47 \mu\text{m}$ y 2.34 altura μm , el volumen fue de $42.87 \pm 0.84 \mu\text{m}^3$, aumentando el doble $94.24 \pm 8.81 \mu\text{m}^3$. El aporte de esta investigación fue obtener las superficies celulares de los linfocitos en reposo y en activación, por lo cual se analizaron características que le confieren importancia durante esos procesos, mientras que los resultados más contundentes fueron el incremento del volumen aunado al tiempo de activación.

Podríamos destacar el trabajo en Huang y colaboradores en 2014, el cual se encargó de explicar el proceso de oncosis en linfocitos, por medio de la exposición con aminofenilina, donde explicó por medio de la nanoestructura el proceso de daño celular a distintos niveles y con diferentes tiempos de exposición, desde cero hasta 96 horas, dando seguimiento a la modificación de las propiedades y características celulares, las cuales fueron altura, diámetro, rugosidad y morfología a nivel nanoestructural. Las características mencionadas de los linfocitos fueron una estructura regularmente esférica, la altura correspondió a $0.8 \mu\text{m}$, el diámetro a $5.5 \mu\text{m}$, el diámetro de las partículas fue entre 40 a 120 nm. Con los tiempos de exposición de 48, 72 y 96 horas de aminofenilina hubo cambios notorios en los parámetros mencionados anteriormente. A las 48 horas, la estructura pasó a ser más irregular y lisa, las pseudopodias y filopodias desaparecieron, la nanoestructura presentó cambios y comenzaron a aparecer poros en la membrana, el diámetro de las partículas de membrana fue de 100 hasta 300 nm, mientras que la altura tuvo un cambio a $1.5 \mu\text{m} \pm 0.2 \mu\text{m}$, un diámetro $5.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$, pasando a $7 \pm 1 \mu\text{m}$, el volumen celular incrementó el doble $45 \pm 5 \mu\text{m}^3$ a $84 \pm 10 \mu\text{m}^3$. En el tratamiento de 72 horas la célula se muestra completamente irregular, con fragmentos celulares de entre 100 hasta 1200 nm, la altura fue de $0.4 \mu\text{m}$. De lo contrario en el tratamiento de 96 horas, donde la superficie celular fue completamente destruida y la altura celular llegó a escasos $0.15 \mu\text{m}$. El conjunto de todas estas propiedades biofísicas sugirió que el fármaco aminofenilina influyó en el proceso de oncosis celular.

Mientras que, en otro estudio con linfocitos, se midieron las propiedades ultraestructurales durante el proceso de activación expuesto a concavalina A y apoptosis con dexametasona. Las características morfológicas del linfocito en estado de reposo fueron una

forma de esfera con una altura de 1 a 1.5 μm , diámetro entre 6 a 8 μm , la rugosidad de superficie fue de $2.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ indicó una superficie lisa y las partículas de la superficie fueron alrededor de 40 nm. De otra manera, durante el proceso de activación con concavalina, la célula incrementó la altura, de 1.5 a 2 μm , el diámetro celular pasó entre 8 y 10 μm , y las partículas de superficie fueron hasta de 80 nm, la rugosidad pasó a $5.3 \pm 0.2 \text{ nm}$. Durante el proceso de apoptosis con dexametasona, la morfología fue elíptica, la altura disminuyó a entre 1 y 0.8 μm , la rugosidad aumentó tres veces más, $16.3 \pm 0.4 \text{ nm}$, el diámetro de las partículas fue 113 nm, es decir hubo una mayor fragmentación celular. Las morfologías de los tres diferentes estados no fueron idénticas, por lo tanto, se sugiere que nanoestructura en cada estado se encarga de la arquitectura de la membrana celular y juegan un rol importante durante los procesos en la membrana celular, ya sea adhesión celular, motilidad o muerte celular (Hu *et al.*, 2009). Las células k-562 presentaron características de muerte celular como apoptosis, donde las células mostraron formación de ampollas y cuerpos apoptóticos, mientras que en necrosis hubo una contracción celular y poros en la superficie celular. La rugosidad del linfocito antes del cocultivo fue de 300 nm, después de la exposición con las células leucémicas fue de 100 nm, volviéndose una superficie más lisa. Mientras tanto, la rugosidad de la superficie de la célula K-562 fue de 800 nm pasando hasta 100 nm, después de la exposición con el linfocito. La arquitectura de la superficie celular normal de las células k-562 fue una superficie granular homogénea que después del co-cultivo se volvió más lisa, por lo tanto, la pérdida de rugosidad después del co-cultivo está asociada a los cambios en la composición de la membrana celular después del tratamiento. en esta investigación, se estudió el proceso de co-cultivo de células leucémicas K-562 junto con linfocitos T, donde el estudio morfológico indicó que los linfocitos inducen citotoxicidad y daños morfológicos en las células leucémicas, tomándose como una alternativa para los tratamientos de las leucemias como una inmunoterapia antitumoral (Jin *et al.*, 2013).

En cuanto a otros estudios con células leucémicas obtenidas a través de pacientes, donde se comparó la morfología de las células de Leucemia Mieloide Crónica con técnicas de AFM y microscopía óptica normal y no se encontraron diferencias significativas con respecto a esas características, mientras que en la fase acelerada de la enfermedad no se detectó una diferencia significativa en términos de rugosidad comparada con sujetos sanos (Găman *et al.*, 2013).

Investigaciones más actuales han tomado las propiedades biofísicas como el tamaño, formas, relación núcleo/citoplasma para discernir entre células neoplásicas y normales, así como también poder identificar esas células en lo referente a su estadio de maduración o de diferente estirpe celular. Por lo general estas propiedades biofísicas van marcando una pauta entre la medicina actual y la del futuro, debido a que la tecnología va mejorando las técnicas de diagnóstico y con la ayuda de ellas existe la posibilidad de comprender todos los procesos implicados en un diagnóstico (Dannhauser *et al.*, 2017).

II. HIPÓTESIS

Dado que se sabe que fármacos del tipo corticoides inducen cambios a nivel celular, debido a que producen un efecto interno a nivel molecular, por lo cual se puede esperar que la Metilprednisolona cause un efecto externo provocando un cambio en la integridad celular sobre la morfología y la antiproliferación de las células leucémicas (CCL-120).

III OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la Metilprednisolona sobre los cambios morfológicos y antiproliferativos mediante AFM y MTT en células de Leucemia Linfoblástica Aguda B (CCL-120).

III.2 Objetivos Particulares

- Determinar el efecto antiproliferativo de la Metilprednisolona en la línea celular CCL-120.
- Implementar protocolo experimental para adhesión de células en suspensión por medio de AFM.
- Caracterizar las propiedades morfológicas de las células leucémicas tratadas con Metilprednisolona.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Cultivo Celular

La Línea celular CCRF-SB [CCRF SB] (ATCC ®CCL-120™) fue aislada de un paciente con Leucemia Linfoblástica Aguda Tipo B, obtenida a partir de American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivó en una caja de cultivo, con atmósfera humidificada entre el 80 y 100%, con temperatura de 37 °C, al 5% de CO₂. El cultivo se resuspendió en medio RPMI 1640, suplementado con el 10% de Suero Fetal Bovino, administrando con antibióticos Anfotericina B 250 µg/mL, Penicilina-Estreptomicina 10,000 IU/mL-10,000 µg/mL, Gentamicina 50 mg/mL. El recambio del medio de cultivo fresco se hizo cada dos a tres días, centrifugando las células a 2500g durante 5 minutos, se mantuvo una distribución celular en el medio de cultivo entre el 80 y 100% (Figura 6), se realizó un conteo con azul de tripan para el posterior cultivo en placa de 96 pozos y por último se estandarizaron las densidades celulares por cada pozo.

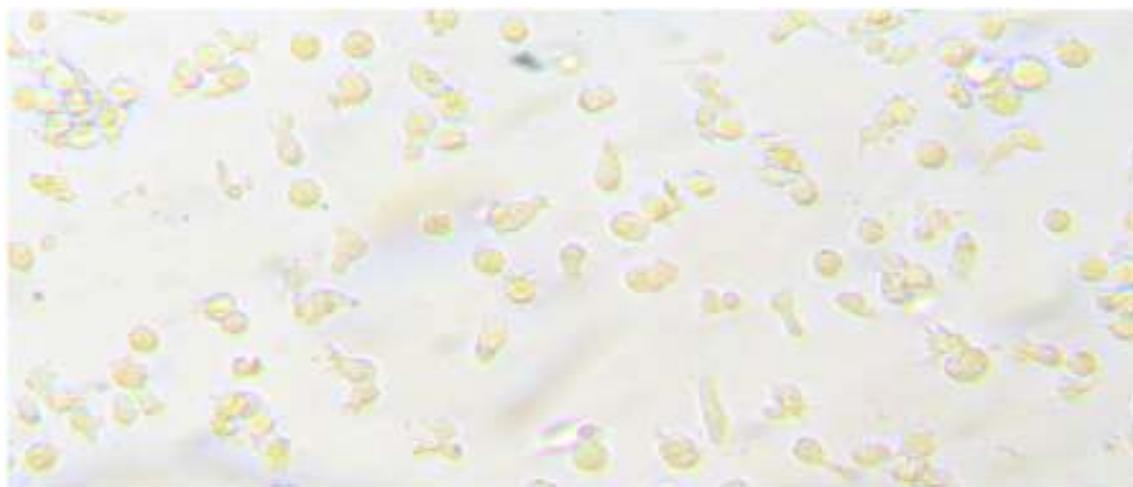


Figura 6. Micrografía de cultivo celular CCL-120 de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo B bajo el microscopio óptico (Tomado en Laboratorio de Células de Cáncer, DICTUS).

IV.2 Obtención de la IC₅₀ por medio de MTT en CCL-120

Para el ensayo de antiproliferación celular se llevaron a cabo ensayos con distintas densidades celulares colocando 90 µL de la suspensión celular con una cantidad desde 1×10^4 a 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 células por cada pozo (Guzmán-Ortiz *et al.*, 2017). El fármaco utilizado fue succinato sódico de metilprednisolona, siendo el ingrediente activo la Metilprednisolona, las concentraciones utilizadas fueron las recomendadas por Lambrou y colaboradores en 2009, debido a que estas dosis caen dentro de la clasificación en edades de 1 mes hasta 12 años en pacientes de LLA, las concentraciones utilizadas fueron de 10 nM, 1 µM, 11 µM, 44 µM, 88 µM, 175 µM, 700 µM y 1400 µM de prednisolona. Con base en ello, fueron utilizadas para empezar un barrido e idear las concentraciones iniciales de la exposición. Después de agregar las dosis necesarias, se colocaron 10 µL de MTT (bromuro de 3 (4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico). y se incubaron a 37°C al 5% CO₂, 4 horas después se agregaron 100 µL de solución con 10% SDS y 0.01 M de HCL, con el fin de solubilizar los cristales formados por las células viables. Se incubaron durante 12 horas y después se tomó absorbancia a 570 nm en lector de microplacas. Para la obtención de la concentración inhibitoria media, el experimento se hizo por triplicado por cada dosis en días independientes, la fórmula utilizada para la obtención de viabilidad es la que se muestra en la figura 7. Una vez obtenidos los datos de viabilidad celular, se graficó contra concentración y a través del método regresión lineal simple se obtuvo la IC₅₀ de Metilprednisolona, a través del programa minitab.

$$\% \text{ viabilidad celular: } \frac{(\text{Promedio absorbancias tratamiento} - \text{Promedio absorbancias blanco}) * 100}{\text{Promedio absorbancias tratamiento} - \text{Promedio absorbancias control negativo}}$$

Figura 7. Fórmula para la obtención de la concentración inhibitoria media del fármaco.

IV.3 Protocolo de Fijación Celular

Se colocó sobre una placa de 12 pozos una mica de silicato de alúmina con dimensiones de 1x1cm, después se colocó una cantidad de 40 μL de poli-Lisina 0.01% (P.M: 150,000-300,000 Sigma Aldrich), extendiéndose con la punta de micropipeta a través de la superficie de la mica y por último se dejó incubar a 37°C por dos horas, se recubrió con el sustrato y se retiró el excedente con micropipeta y por último se dejó secar; después de ello, se agregaron 50 μL de la densidad celular y se dejó sedimentar por 30 minutos en incubadora; enseguida se agregaron 900 μL del medio RPMI 1640 y 100 μL del IC_{50} (845 μM) del fármaco metilprednisolona; se dejaron incubar en los respectivos tiempos de 24 y 48 horas. Después de la incubación se fijaron las células con 200 μL de solución de formaldehído (4% disuelto en PBS), durante 5 minutos. Después se realizaron 3 lavados con 200 μL de PBS (Bufer Salino de Fosfatos), se retiró el sobrenadante, y por último, 3 lavados con agua desionizada; se dejaron secar al aire libre, y fueron guardados a temperatura de 4°C (Abcam, 2012; Ries *et al.*, 2012). En lo que respecta a la cantidad de células por mililitro, para el cultivo en placas de 12 pozos, las estandarizaciones con concentraciones celulares fueron desde 1×10^6 , 5×10^5 , 3×10^5 , 2.5×10^5 y 1×10^5 células/mL, la más adecuada fue 2.5×10^5 células/mL (Canetta *et al.*, 2014).

IV.4 Microscopía de Fuerza Atómica AFM

IV.4.1 Montura de la muestra

Las imágenes topográficas fueron tomadas con el microscopio AFM JEOL JSPM 4210, Japan, en modo no contacto. La mica fue fijada sobre un portamuestra con esmalte, se colocó sobre el piezoeléctrico, se montó el portacantilever y enseguida se posicionó el láser sobre la punta, centrándose en el fotodiodo.

IV.4.2 Ajuste del cantilever y posicionamiento del laser

El cantilever utilizado (Nitrato de silicio NSC15/NO AL, de la marca Mikromash® serie 15) con las siguientes características: con una frecuencia de resonancia de 325 kHz, constante de fuerza

de 40 Nm^{-1} , las dimensiones del cantilever y punta se muestran a continuación (Tabla 2 y Figura 8).

Tabla 2. Características de la punta y cantilever suministrados por la marca Mikromash®.

Cantilever		
Longitud μm	Anchura μm	Espesor nm
125	30	4
Punta		
Forma	Altura μm	Radio nm
Piramidal	18-18	8

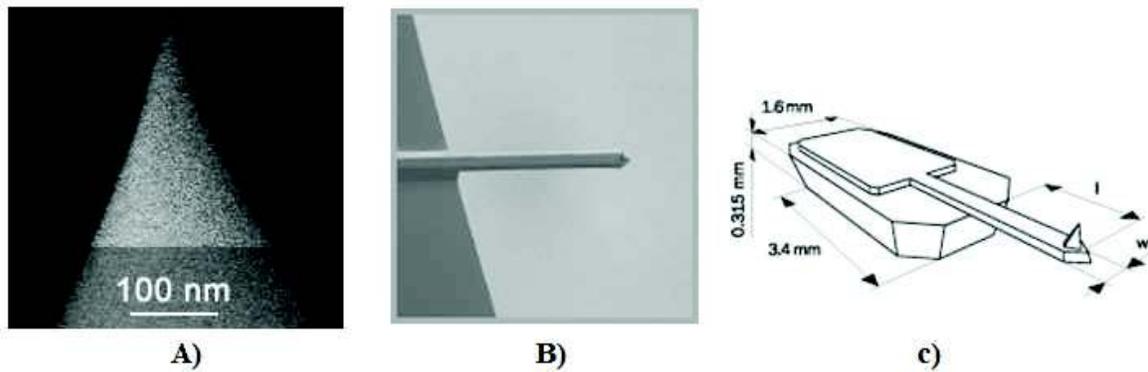


Figura 8. Sistema cantilever punta. A y B) imagen de la punta obtenida por microscopio electrónico. C) proporciones del cantilever y punta (Mikromash, 2019).

Después se insertó la muestra, se colocó la punta por el extremo inferior y se insertó la viga en la funda del cantilever. Después de ello se posicionó el láser con el ajuste correcto como lo muestra la Figura 9, opción 2.

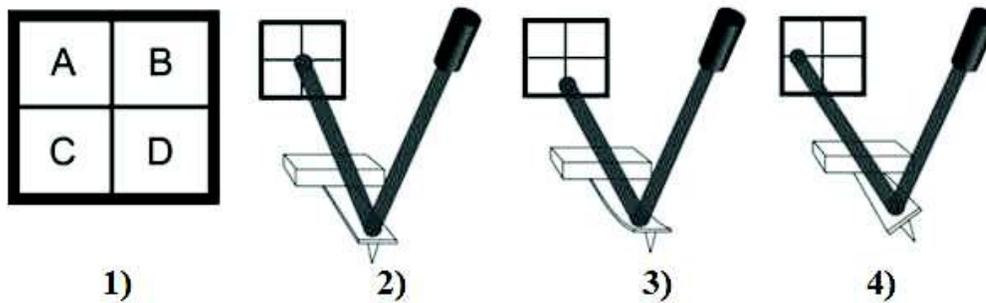


Figura 9. 1) Fotodetector y cuadrantes. 2) Haz centrado 3) C-D: Deflexión vertical 4) A-B Indica una deflexión del cantilever (Eaton y West, 2009).

IV.4.3 Calibración en aire de la frecuencia de resonancia del cantilever

Se ajustó el fotodiodo, después de ello se calibró el cantilever encontrando la frecuencia de resonancia con el botón Autotune, el instrumento realizó una serie de tres barridos de frecuencia, obteniéndose frecuencia de resonancia, el factor de calidad Q y pico de frecuencia.

En dado caso que el cantilever no corresponda a las señales dadas por el fabricante, se debe de encontrar la correcta sintonización del cantilever, esto se lleva a cabo presionando el botón VCO “Voltage Controlled Oscillator” después de ello, mover el botón amplificador del AFM a modo RMS, este mostrará la amplitud RMS del movimiento del cantilever. Ajuste la frecuencia y amplitud del variador. Se debe ajustar la frecuencia, para observar un aumento y luego disminución de la amplitud de la unidad observada en el medidor del amplificador del AFM. Se debe establecer la frecuencia de activación a modo que la amplitud sea aproximadamente 90 % de la amplitud máxima (es decir, por ejemplo, si la amplitud máxima es de -5 V, entonces la amplitud será aproximadamente de -4.5 V). La amplitud del variador puede reducirse o aumentarse con los controles de amplitud del variador que se encuentran justo debajo de los controles de frecuencia del variador en la ventana de VCO. Se debe establecer la amplitud del variador (ventana VCO) de tal manera que la amplitud máxima en voladizo (medidor RMS) sea de -4 V y la amplitud a la frecuencia de excitación operativa sea de -3.6 V. Si la lectura del medidor RMS es superior a -5V (es decir, -6V), el instrumento no funcionará

correctamente. El cambio en la amplitud del movimiento del voladizo es evidente si la oscilación cambia de una onda sinusoidal a una onda de diente de sierra, el voladizo se está sobrepasando y la amplitud de la unidad debería disminuir. Para ello se debe configurar en la sección de escaneo o Referencia = 70% del medidor RMS (para -3.6 V a -2.5). El signo menos es de vital importancia en la ganancia de la referencia.

IV.4.4 Acercamiento de la muestra

Se seleccionaron los parámetros, modo AC (no contacto), área de escaneo de 70×70 micras, también se tomó en cuenta otro parámetro como la velocidad de escaneo de la punta, este parámetro es el tiempo de muestreo por cada punto (μ s) para la imagen, el escaneo es más rápido cuanto menor sea el valor destinado en micras, entre mayor sea el número la velocidad del barrido es más lenta. La velocidad utilizada fue de 333.33 micras por segundo. La ganancia utilizada fue alta, para obtener imágenes de mejor calidad.

IV.4.5 Obtención de datos

Los datos obtenidos fueron archivos en formato tipo Tiff de 16 bits en color gris, con una resolución de 216×216 píxeles. Las imágenes se podrían guardar como Tiff o BPM. Sin embargo, las imágenes en formato de mapa de bits no se pueden procesar utilizando las funciones de procesamiento de WinSPM (procesamiento de filtros, procesamiento de imágenes en tres dimensiones y medición de perfil de línea). Esto se debe a que los mapas de bits tienen solo 8 bits de profundidad. En cuanto a los parámetros de morfología y topografía se utilizó el programa Gwyddion (Nečas y Klapetek, 2012), mientras que, para el parámetro altura, diámetro y rugosidad se utilizó el software WsxM 5.0 (Horcas *et al.*, 2007).

IV.5 Análisis Estadístico

Regresión lineal simple para determinación de la IC_{50} , y ANOVA no paramétrico de una vía (Kruskal-Wallis) para todos los demás parámetros morfológicos como rugosidad (R_a y R_q), altura y diámetro, tomándose en cuenta diferencias significativas con $p < 0.05$. Después de ello se sometió a prueba Post-Hoc con el análisis de Tukey. Los datos se procesaron en el software minitab 18.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1 Obtención de IC₅₀ Metilprednisolona

Para el ensayo de viabilidad celular se realizaron diferentes estandarizaciones tanto para la densidad celular por cada pozo y el barrido de dosis del fármaco utilizado, siendo la cantidad ideal por cada pozo la de 90 μ L de medio de cultivo con una densidad celular de 7×10^4 células, mientras que las dosis del fármaco metilprednisolona fueron de 175 μ M hasta 1400 μ M debido a dosis menores por debajo de 88 μ M no tenían efectos antiproliferativos y la viabilidad celular estaba por arriba del 100% a estas concentraciones, por ello se acotó a utilizar las dosis desde 1400 μ M hasta 175 μ M y a partir de ahí se determinó la concentración inhibitoria media IC₅₀ al tiempo de 48 horas expuesto al tratamiento. A medida del aumento de la dosis de Metilprednisolona se obtuvo un decremento a la proliferación. Se obtuvo la IC₅₀ de la línea celular, siendo 844 μ M del fármaco Metilprednisolona a partir del barrido de concentraciones propuestas durante este trabajo (Figura 10). Se logró determinar la concentración inhibitoria media de la línea celular CCL-120 de Leucemia Linfoblástica Aguda, siendo de 844 μ M de MP, en relación al trabajo de Kaymaz *et al.*, 2012, donde señala que la IC₅₀ es de 0.4 mM con metilprednisolona para las células K-562 de Leucemia Mieloide Crónica.

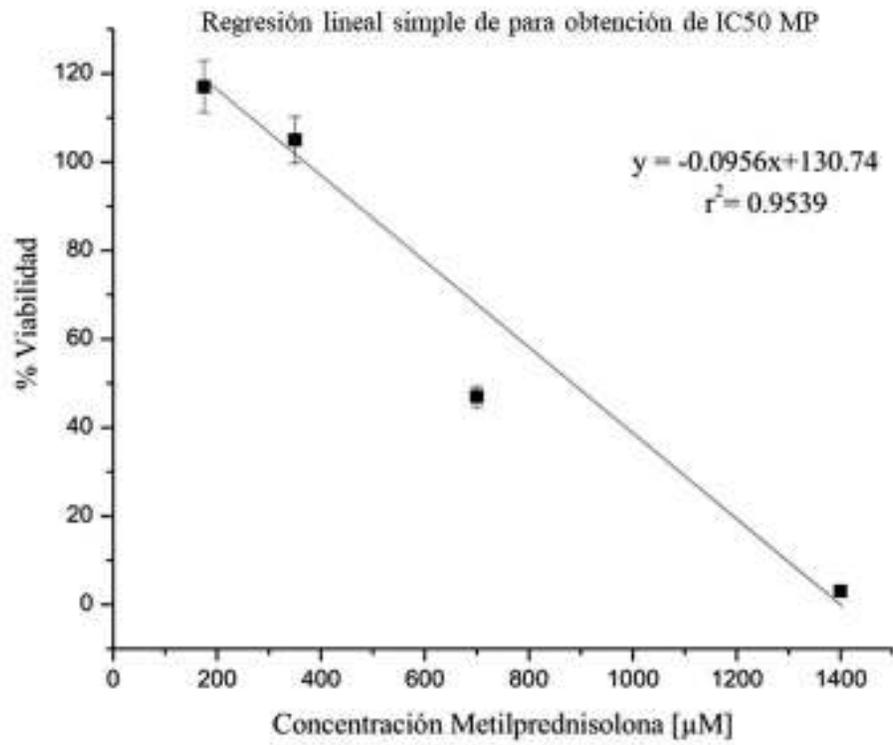


Figura 10. IC₅₀ de metilprednisolona de la línea celular CCL-120 de LLA-B, a partir de MTT.

V.2 Morfología y ultraestructura celular de los linfoblastos (CCL-120)

Por lo general, sobre la morfología celular, recae el efecto de procesos como exposiciones a daños con fármacos, virus, bacterias, señalización, comunicación celular, etc., por ello, los estudios *in vitro* acerca de la morfología celular se llevan a cabo con la finalidad de estudiar los efectos, en este caso de fármacos con la intención de idear el tipo de muerte celular causado por el medicamento (Huang *et al.*, 2014).

Las características generales de los linfoblastos son células no adherentes, por lo regular con formas redondas a ovoides; cabe mencionar que estos linfoblastos son células más grandes que los linfocitos, con características como una mayor proporción de núcleo y escaso citoplasma, a menudo puede haber entre 1 y 2 nucléolos, así como también puede haber presencia de vacuolas en el citoplasma. Se estudiaron los cambios en la morfología y ultraestructura de las células CCL-120, antes de ello se observaron sin exposición al medicamento para apreciar las características comunes de la forma celular (Figura 11). Después de ello se tomaron imágenes con el tiempo de exposición 24 (Figura 12) y 48 horas (Figura 13). En la Figura 11, se muestra una representación de las células estudiadas, las imágenes 1 y 2 y las subclasificaciones representan a las células leucémicas sin ningún tratamiento, las características principales son la forma oval redondeada, membrana celular se aprecia íntegra, pero con protrusiones en los márgenes de la membrana plasmática. Investigaciones enfocadas al estudio de linfocitos, concuerdan con las características de los linfoblastos mencionadas anteriormente, como una estructura detallada de la membrana celular compuesta por pseudópodos, microvellosidades, la célula tiene una forma esférica tendiendo a ovoide con alturas entre 1-1.5 micras y diámetros entre 6 y 8 micras, características como membrana lisa e íntegra. Mientras, la nanoestructura (columna 2 subclasificaciones 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) la definen como componentes distribuidos uniformemente a lo largo de la membrana plasmática que en gran parte son carbohidratos y proteínas las encargadas de proporcionarle estructura a la membrana celular (Huang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2009). La tercera columna de la figura 1 corresponde a la célula en 3 dimensiones, aquí se tiene una mejor apreciación de la estructura celular como protusiones en la periferia de la membrana celular y una mayor proporción de núcleo en comparación con el citoplasma. En esta investigación, las comparaciones de altura, diámetro y nanoestructura de linfoblastos (CCL-

120), células no maduras, fueron llevadas a cabo con linfocitos, células maduras de tipo no adherente.

V.3 Cambios en la morfología y ultraestructura celular en linfoblastos

Como se observa en las Figuras 12 y 13, hubo cambios en la morfología y ultraestructura de los linfoblastos con la dosis de 845 μM de MP en los tratamientos de 24 y 48 horas. Estudios con linfocitos y el glucocorticoide dexametasona mostraron cambios notorios, después del tratamiento, como la disminución de altura entre 1 a 0.1 micra y de 5 a 7 micras de diámetro; en cuanto a la forma se mostró más elíptica y la superficie más rugosa. Las imágenes 3 y 4 corresponde a las células expuestas al tratamiento con MP a las 24 horas, los cambios fueron menores en este tiempo de exposición al tratamiento, y en esta fase se observaron cambios como invaginaciones en los extremos de la membrana (flecha amarilla Figura 4.3), también hinchamiento; cabe mencionar que en esta etapa hubo un mayor incremento de la altura, presencia de cuerpos apoptóticos y aparición de poros macroscópicos en la membrana (flecha negra Figura 4.3, ver ampliación de poro macroscópico en escala de 0.8 μm en Figura 4.2), mientras que en la ultraestructura se apreciaron irregularidades, brechas (flecha rosa Figura 3.1) y hundimiento en la membrana (flecha verde Figura 3.3).

Los cambios más notorios se observaron en la exposición de 48 horas de las células con el fármaco; aquí se distinguió una fragmentación entre el núcleo y el citoplasma (flecha blanca Figura 5.3) así como también una contracción celular. En el segmento de ultraestructura, las secciones 6.1 y 6.2, se observó una mayor irregularidad en núcleo y citoplasma; y por último, la fragmentación en la Figura 6.3 mostró contracción celular y hundimientos profundos en la membrana (flecha roja Figura 6.3) que son características similares a la necrosis celular. En el estudio de Hu y colaboradores en 2009, se estudiaron células de leucemia mieloide k-562, donde estas fueron expuestas a linfocitos y se apreciaron cambios en la estructura de membrana celular, pareciéndose a vacuolas citoplasmáticas, poros de membrana, encogimiento, protusiones en los extremos de las membranas, membrana lisa, nanoestructura irregular después de la exposición, la descripción de estas morfologías encuadra en la descripción de procesos apoptótico, necrótico y necroptóticos.

Por otra parte, para el estudio de procesos como la muerte celular, es importante conocer las características morfológicas y bioquímicas, en este caso, los procesos más comunes son apoptosis, necrosis y necroptosis, por lo general, la apoptosis presenta características como, pérdida de volumen, contracción celular, cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN, por otra parte, la necrosis evidencia una inflamación citosólica, así como también una pérdida de la integridad en la membrana plasmática, hinchazón de la célula desencadenando un aumento en el tamaño celular. El proceso de necroptosis es una combinación entre apoptosis y necrosis, las cuales requieren de un sistema llamado autofagia el cual utiliza lisosomas para envolver el citoplasma y los orgánulos para procesos como renovación celular y homeostasis, se presentan organelos inflamados, citosol traslucido etc. La necroptosis adquiere características diferentes, como estructuras tipo ampollas en las membranas celulares, contracción celular, condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos sin la ruptura de la membrana. Asimismo, los fármacos de la familia de los glucocorticoides pueden activar la vía intrínseca de la apoptosis, así como también, otro de los mecanismos es activar el reclutamiento de los canales iónicos de Ca^{++} y Na^{+} favoreciendo el desarrollo de poros en las membranas, apoyando la teoría de los poros en membrana, los autores Schwartman y Cidlowski, 1994 donde mencionan los mecanismos de acción de los glucocorticoides los cuales desestabilizan la membrana plasmática por medio de lisis a través de los poros de membrana, debido al aumento de calcio en los procesos celulares, causando una diferencia de concentración a través de la membrana (Pan *et al.*, 2016).

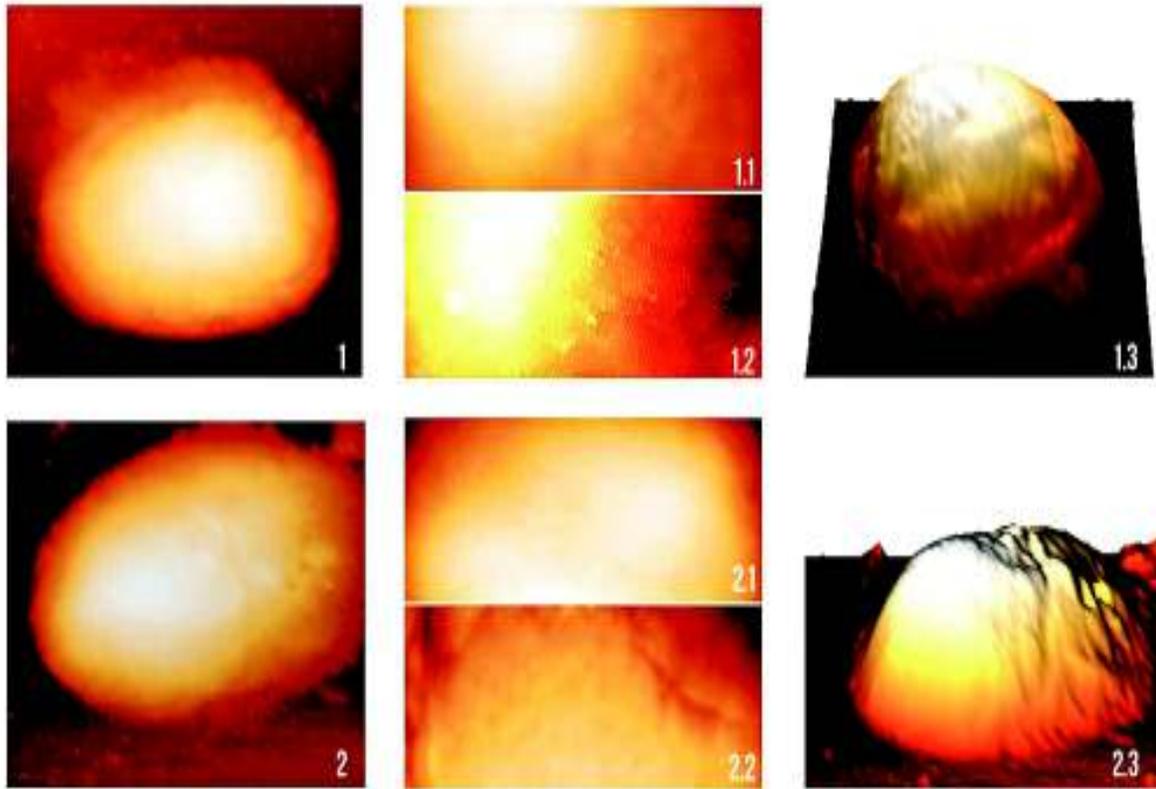


Figura 11. Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 como grupo control. La primera columna corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de $3 \times 5 \mu\text{m}$ y la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 1: Célula representativa del control, corresponden a los linfoblastos sin ningún tipo de tratamiento. 1.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 1.2: ultraestructura de citoplasma celular. 1.3: morfología celular en 3D. Célula 2: Célula representativa del control, 2.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 2.2: ultraestructura de citoplasma celular y 2.3: morfología en 3D de Linfoblasto 2.

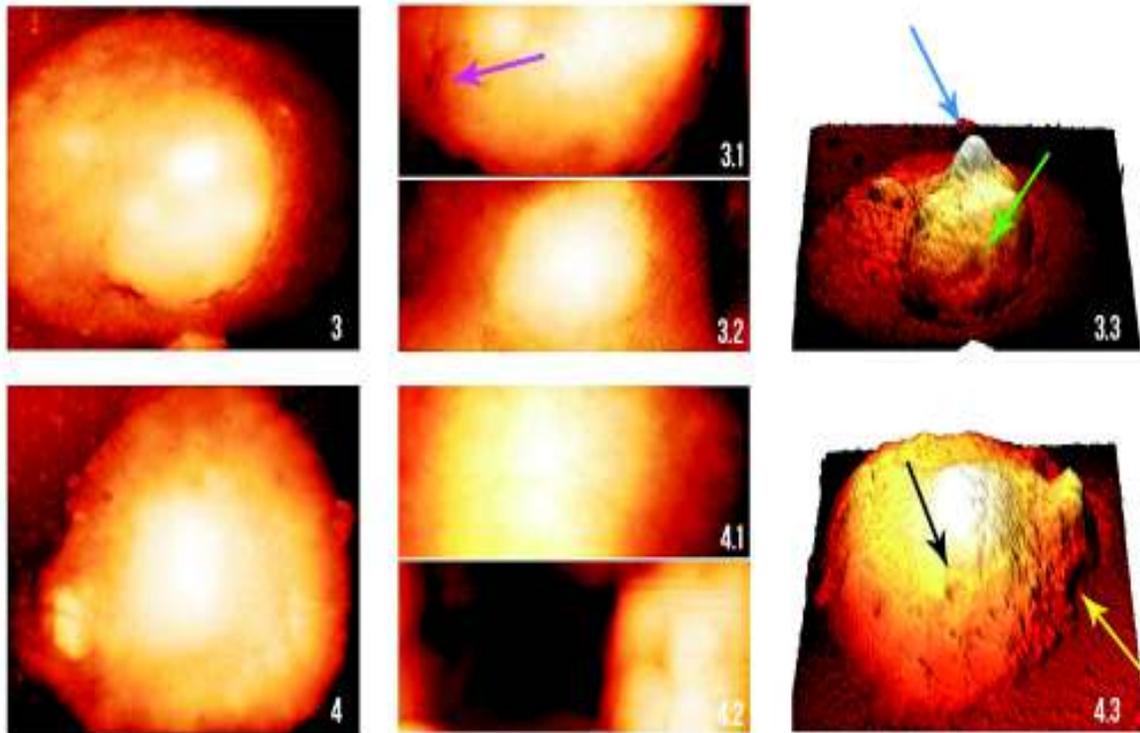


Figura 12. Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 con un tiempo de exposición de 24 horas a Metilprednisolona. La primera columna corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de $3 \times 5 \mu\text{m}$ y la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 3: Célula representativa del grupo 24 horas. 3.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, flecha rosa indica irregularidades en periferia membrana nuclear, 3.2: ultraestructura de citoplasma celular. 3.3: morfología celular en 3D, flecha azul, fragmentación nuclear temprana, flecha verde, hendiduras nucleares. Célula 4: Célula representativa del grupo 24 horas, 4.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, 4.2: ultraestructura de citoplasma, con especial enfoque en poro citoplasmático de $0.8 \times 0.8 \mu\text{m}$ y 4.3: morfología en 3D de Linfoblasto 4, flecha negra, localización poro figura 4.2, flecha amarilla, invaginación temprana en citoplasma.

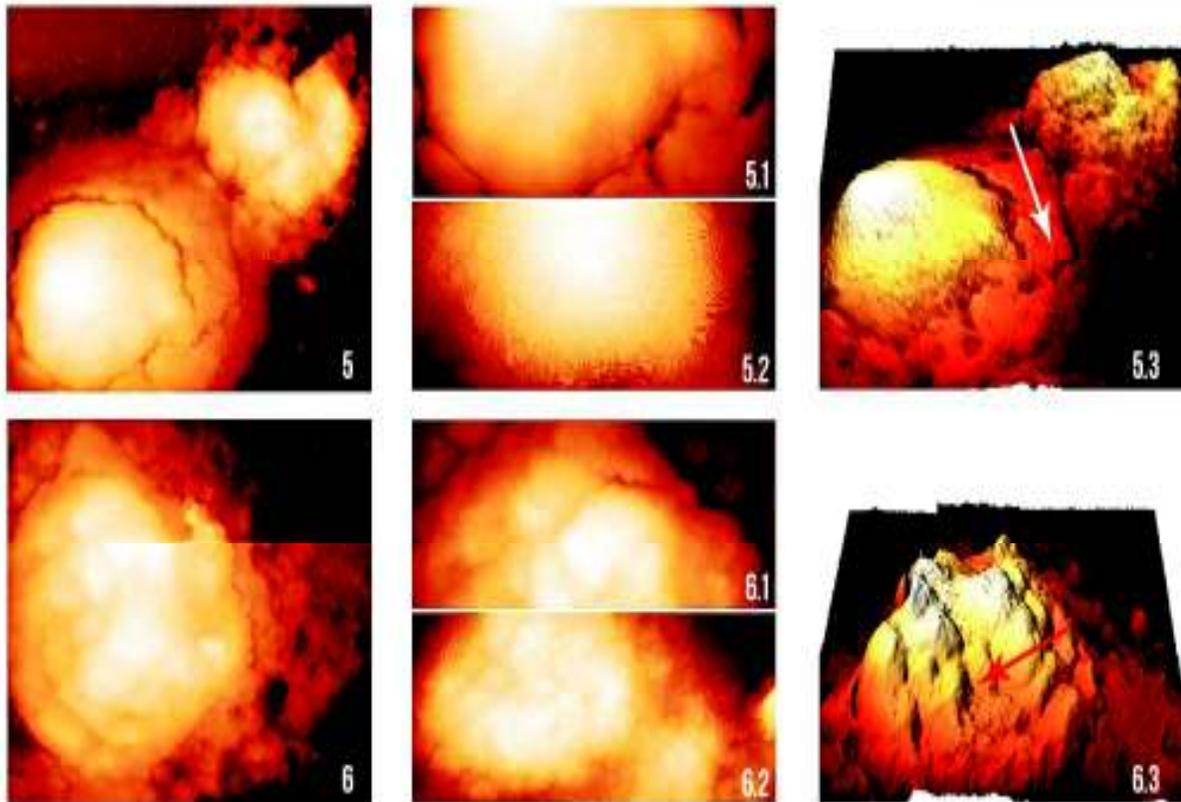


Figura 13. Imágenes representativas de la línea celular CCL-120 con un tiempo de exposición de 48 horas a Metilprednisolona. La primera columna corresponde a las topografías de las células control, segunda acercamiento de $3 \times 5 \mu\text{m}$, la tercera representa la estructura celular en 3D. Célula 5: Célula representativa del grupo 48 horas. 5.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo, con largas líneas de fragmentación en las periferias del núcleo, 5.2: ultraestructura de citoplasma celular. 5.3: morfología celular en 3D, flecha blanca fragmentación citoplasmática avanzada, con ruptura celular. Célula 6: Célula representativa del grupo 48 horas, 6.1: acercamiento en la ultraestructura del núcleo con fragmentaciones nucleares 6.2: ultraestructura de citoplasma y 6.3: morfología en 3D de Linfoblasto 6, flecha roja, hendiduras en los inicios del citoplasma y periferias del núcleo, citoplasma periférico con microfragmentos.

V.4 Parámetros morfológicos cuantitativos: diámetro, altura y rugosidad

V.4.1 Altura y diámetro

Estos parámetros fueron sometidos a un ANOVA no paramétrico y no hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos con Metilprednisolona a las 24 y 48 horas de exposición (Figura 14 y 15). La Tabla 3, enlista los promedios de alturas y diámetros de las células CCL-120, por lo cual muestra las medias de cada tratamiento determinados a partir de 4 células por cada grupo. El perfil de la altura celular fue definido como la diferencia entre el punto más alto de la célula y el fondo. En lo referente a las alturas en la investigación de Huang *et al.*, 2014, las alturas de los linfocitos fueron de 0.85 micras antes del tratamiento y aumentó a 1.5 micras a las 48 h de tratamiento, y en esta investigación la altura promedio fue de 0.88 micras en la célula control (sin tratamiento), y una altura de 1.46 micras con exposición de metilprednisolona por 24 horas y 1.01 micras en una exposición de 48 h. Mientras que los diámetros celulares obtenidos en esta investigación fueron de entre 19 a 30 micras, en la investigación de Huang y colaboradores (2014) el diámetro de la célula control fue de 5.5 micras y el diámetro de la célula expuesta aminofenilina por 48 horas fue de 7 μ m.

Tabla 3. Promedio de diámetros y alturas en cada tiempo de exposición. Cada grupo representa 4 células. DE: Desviación Estándar.

Tiempo de exposición (h)	Diámetro (μ m)+DE	Altura (μ m)+DE
0	19 \pm 3	0.88 \pm 0.07
24	22 \pm 6	1.46 \pm 0.70
48	30 \pm 6	1.01 \pm 0.22

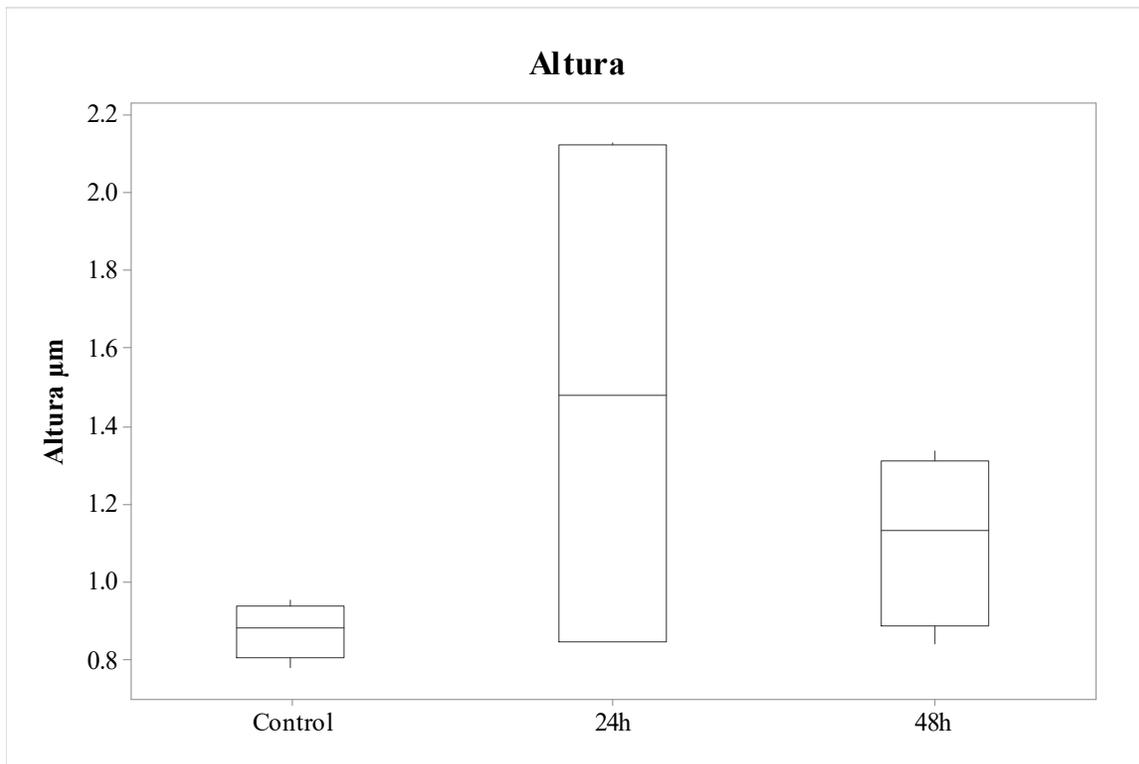


Figura 14. Gráfica de caja para altura celular sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. No se obtuvieron diferencias significativas entre las alturas con los distintos tratamientos.

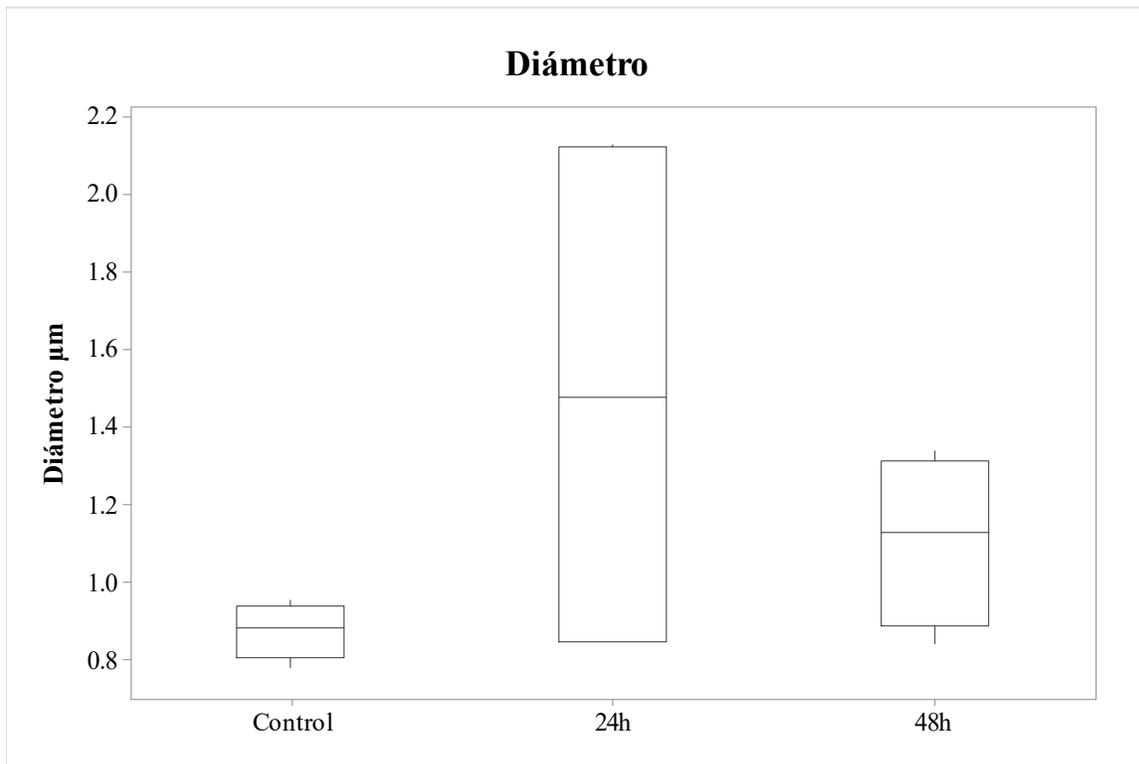


Figura 15. Gráfica de caja para diámetro celular sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. No se obtuvieron diferencias significativas entre los diámetros sometidos con los distintos tratamientos.

V.4.2 Rugosidad

El parámetro indica el grado de irregularidad en la ultraestructura de la membrana celular, este se clasifica en dos: la rugosidad media denominada comúnmente como Ra y la raíz cuadrada de la rugosidad media Rq (Hu *et al* 2014). Los resultados de este parámetro fueron sometidos a ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) con un $p < 0.05$, posteriormente se sometió a una prueba de Tukey para encontrar diferencias entre los mismos promedios de cada variable, en cada tratamiento, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos Ra y Rq. Los valores P corresponden a los resultados estadísticos entre el control y las células tratadas con MP, ya sea con el tiempo de 24 horas y 48 horas respectivamente (Tabla 4). Para la obtención de la rugosidad se tomaron al azar pequeñas áreas de $2 \times 2 \mu\text{m}$ evadiendo cualquier tipo de artefactos celulares, donde todas las muestras tomadas fueron dentro de la superficie celular. En la Figura 16 los resultados de la rugosidad Ra entre el tratamiento control y el tratamiento con tiempo de exposición de 24 horas con MP tuvo diferencias significativas en este parámetro. Mientras que en la rugosidad Rq, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los dos grupos de exposición al fármaco 24 y 48 horas, como se indica en la Tabla 4 y Figura 16.

Tabla 4. Promedio de rugosidad Ra y Rq, sometidos a distintas condiciones de tratamiento 24 y 48 horas con MP. Los * indican resultados estadísticamente significativos entre los diferentes tratamientos.

Área (μm^2)	Tratamiento MP (t h)	Ra (p-valor)	Rq (p-valor)
2x2	0 ^a	*78.5 \pm 15.0(<0.023)	*92.5 \pm 16.5(<0.021)
2x2	24 ^b	*133.4 \pm 29.4(<0.023)	*159.3 \pm 34.3(<0.021)
2x2	48 ^{ab}	122.3 \pm 16.7	*141.4 \pm 15.4(<0.021)

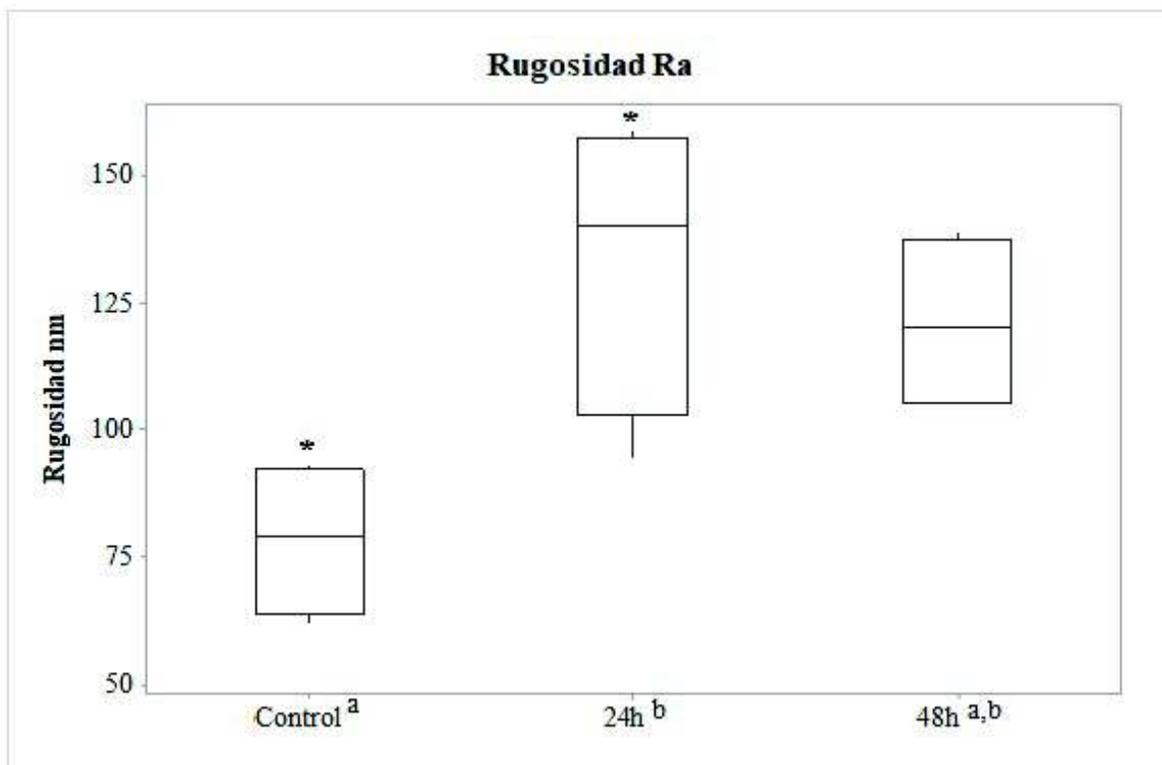


Figura 16. Gráfica de caja para Rugosidad celular Ra sometida a los tres tratamientos, grupo control, tratamiento con MP a las 24 y 48 horas. Hubo diferencias significativas entre rugosidad del tratamiento control y el tiempo de exposición de 24 horas.

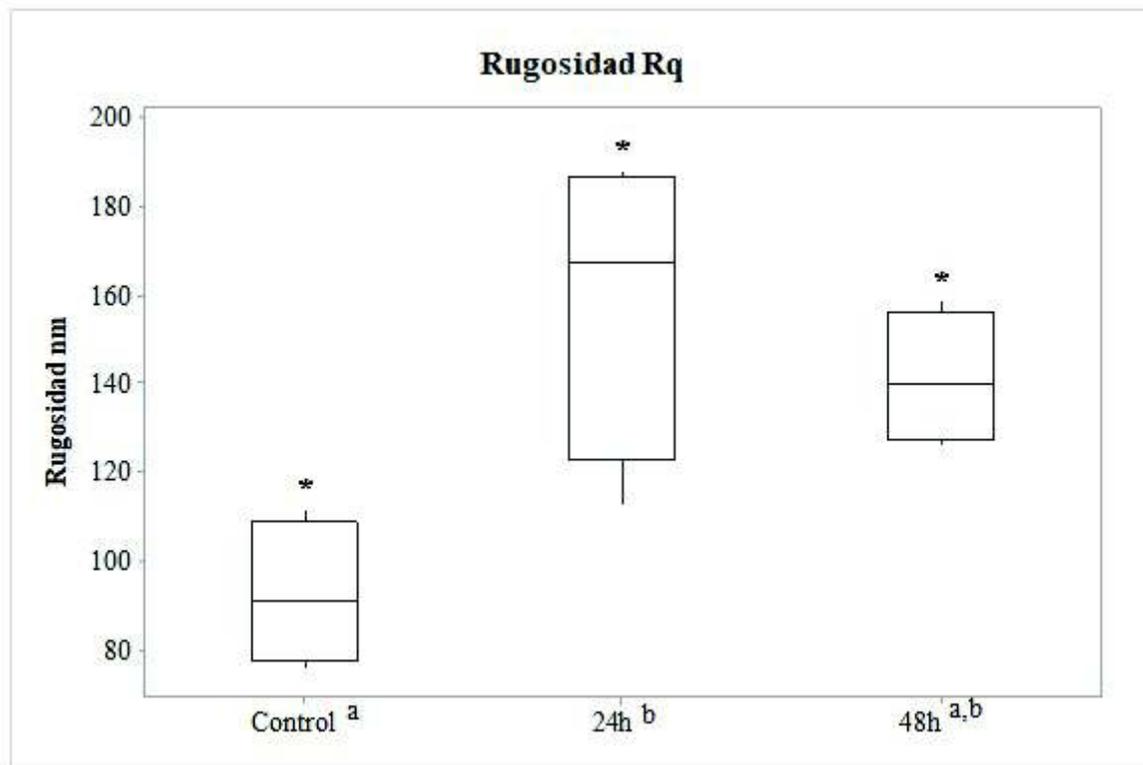


Figura 17. Gráfica de caja para Rugosidad celular Rq sometida a los tres tratamientos, grupo control ^a, tratamiento con MP a las 24 ^b y 48 ^{a,b} horas. Hubo diferencias significativas entre rugosidad del tratamiento control y el tiempo de exposición de 24 horas, así como también el de 48 horas.

Este parámetro es un indicador citológico, debido a que está relacionado con procesos como la mecánica celular, a la vez asociada con la adhesión y motilidad, por lo cual es un indicador sensible para la caracterización del estadio celular, debido a que está íntimamente ligada con la integridad del citoesqueleto, y los procesos que conlleven dichos cambios en la estructura. La rugosidad puede ser utilizada como un indicador del daño en la membrana celular sometida a procesos como apoptosis, necrosis y necroptosis (Liu *et al.*, 2018; Antonio *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron un Ra de 79 ± 15 nm para el grupo control, para el tratamiento de exposición de 24 horas de las células CCL-120 con prednisolona

aumentó a 133.4 ± 29.4 nm, y para el tiempo de exposición de 48 horas fue de 122.3 ± 16.7 nm. Para Rq fueron de 93 ± 17 nm, 159.3 ± 34.5 nm y 141.4 ± 15.4 nm, respectivamente para el control y los dos tratamientos. En contraste con otros estudios con células leucémicas, como es el caso de Jin *et al.*, en 2013, estos autores utilizaron células de leucemia mieloide crónica K-562, expuestas a linfocitos citotóxicos como tratamiento, donde el Ra inicial fue de 800 nm, mientras que después del tratamiento pasó a ser de 180nm. En otra investigación se aislaron células de un paciente con leucemia linfóide crónica tipo B, se indujo la activación de éstas con *Staphylococcus aureus*, donde la rugosidad Ra del control fue de 1.77 ± 15 nm, a las 24 h de exposición con la bacteria fue 3.18 ± 0.35 nm, y a las 72h de tratamiento fue 3.07 ± 0.18 nm; en cuanto a la rugosidad Rq se obtuvieron los siguientes resultados: control 2.00 ± 0.31 nm, 24h 3.93 ± 0.08 nm, y a las 72h 3.47 ± 0.31 nm. Cabe recalcar que aquí las rugosidades fueron menores, debido a que éstas tienen una superficie más lisa (Dong *et al.*, 2013). También se han realizado estudios con células maduras como lo son los linfocitos, donde el tratamiento a analizar fue aminofenilina, el rango de rugosidad y el diámetro de los fragmentos celulares encontrados en las células fueron entre 40-120 nm, y con una exposición de 48 horas a este fármaco oscilaron entre 100 y 300 nm, mientras que al tiempo de exposición de 72 horas los fragmentos fueron de 100 hasta 1200nm (Huang *et al.*, 2014).

En comparación con otros tipos celulares, estudios en células Hela e Ishikawa expuestas a tratamiento con paclitaxel; las células control tuvieron un Ra de 79.9 ± 23 nm, y Rq de 103 ± 31.8 nm, a las 24 horas de exposición al fármaco se obtuvo un Ra de 88.2 ± 36.8 nm, Rq 131.9 ± 80.4 nm, y por último a las 48 horas de exposición al medicamento se obtuvo Ra 168.3 ± 39.5 nm, Rq 216.1 ± 50.5 nm. Se observó que la rugosidad aumentó cuando era un mayor tiempo de exposición al fármaco, lo que indica una superficie más irregular y el aumento de rugosidad puede explicarse por la membrana dañada y no por contracción celular; se detectaron poros macroscópicos en la membrana celular, esto puede ser debido a los indicios de apoptosis, pero podría indicar también necrosis (Kim *et al.*, 2012). Mientras tanto, otros estudios fueron enfocados en discernir las propiedades biofísicas de la línea celular de mama MCF-10A, comparado con un grupo control no displásico; la rugosidad Ra fue 21.34 ± 6.59 y Rq 26.10 ± 7.76 (Wang *et al.*, 2016). También se han probado extractos de plantas como ginseng sobre células de hepatocarcinoma (SMMC-7721), el grupo control mostró un Ra de 214 ± 29 nm, Rq 280 ± 39

nm, a las 24 horas de tratamiento Ra 297 ± 79 y Rq 386 ± 97 y a las 36 horas de tratamiento Ra 480 ± 45 y Rq 609 ± 65 (Qu *et al.*, 2018). Como puede observarse, en las diferentes investigaciones, el parámetro rugosidad variará dependiendo del cultivo celular, fármaco: su concentración y el tiempo de exposición al mismo.

VI. CONCLUSIÓN

Se logró evaluar el efecto de la Metilprednisolona en las propiedades morfológicas en células de Leucemia Linfoblástica Aguda B (CCL-120). Las propiedades morfológicas se describieron como el diámetro, altura, ultraestructura, morfología y rugosidad, siendo la rugosidad y ultraestructura los mejores indicadores para la evaluación de la caracterización del efecto de la metilprednisolona sobre las células CCL-120.

Asimismo, también se logró obtener el efecto antiproliferativo o IC_{50} del fármaco, siendo la dosis a la cual se expusieron las células leucémicas para realizar esta investigación.

Se estandarizó e implementó el desarrollo de un protocolo experimental para la adhesión de células en suspensión en una mica y su posterior observación a través de Microscopía de Fuerza Atómica.

En este trabajo se demostró que los cambios en las propiedades morfológicas y antiproliferativas mostraron el efecto del fármaco sobre las células de leucemia, en particular, los resultados sugirieron que la rugosidad tiene potencial como un buen marcador para indicar si hubo un daño morfológico con la exposición a algún fármaco.

El uso de AFM para la medición de estas propiedades biofísicas es una herramienta útil para comprender los mecanismos de muerte celular ya que muestra detalles a resolución molecular del proceso que complementando con otros tipos de técnicas bioquímicas y moleculares se lograría un estudio más sólido acerca de la explicación de este tipo de procesos.

VII. LITERATURA CITADA

- Abcam. 2019. Immunocytochemistry and immunofluorescence protocol. Report update June 16, 2019. (<https://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol>)
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2016. Cancer, 1091-1140 p. En: Christians, L., Wolfe N. (Eds.), *Molecular biology of the cell*. Garland Science Publishers. New York, United States of America.
- Alves, A. C., D. Ribeiro, C. Nunes y S. Reis. 2016. Biophysics in cancer: the relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858(9): 2231-2244. doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025
- American Cancer Society. 2018. Cancer Facts and Statistic. Report update May 26, 2018. (<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/cancer-site/Leukemia>)
- American Cancer Society. 2019. Key statistics for Acute Lymphoblastic Leukemia. Report update June 09, 2019. (<https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>)
- Ariza de Schellenberger, A., J. Bergs, S. Ingolf y M. Taupitz. 2018. The extracellular Matrix as a Target for Biophysical and Molecular Margnetic Resonance Imaging, 123-150 p. En: Schaeffter, T., Sack I. (Eds.), *Quantification of Biophysical Parameters in Medical Imaging*. Springer International Publishing AG. Berlín, Germany.
- Baba, A. I. y C. Cătoi. 2007. Tumor cell morphology. *Tumor cell morphology*, 37-65 p. *Comparative Oncology*, The publish House of the Romanian Academy. Bucharest, Romania.
- Barnes, P.J. y I. Adcok. 2009. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *The Lancet* 373(9678): 1905-1917. doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60326-3
- Binnig, G. y H. Rohrer. 1983. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science* 126(1-3): 236-244. doi: 10.1016/0039-6028(83)90716-1
- Binnig, G., C. Quate y C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56(9): 930-933. doi: 10.1103/physrevlett.56.930
- Cai, X., X. Xing, J. Cai, Q. Chen, S. Wu y F. Huang. 2010. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study. *Micron*, 41(3): 257-262. doi: 10.1016/j.micron.2009.08.011
- Canetta, E. y A. K. Adya. 2011. Nano-imaging and its applications to biomedicine, 423-432 p. En: Maino G, Foresti G. L. (Eds). In *International Conference on Image Analysis and Processing*. Springer. Berlin, Germany. doi.org/10.1007/978-3-642-24085-0_44
- Canetta, E., A. Riches, E. Borger, S. Herrington, K. Dholakia y A. K. Adya. 2014. Discrimination of bladder cancer cells from normal urothelial cells with high specificity and sensitivity: combined application of atomic force microscopy and modulated Raman spectroscopy. *Acta biomaterialia* 10(5): 2043-2055. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.057
- Chang, J. E., S. C. Medlin, B. S. Kahl, W. L. Longo, E. C. Williams, J. Lionberger y M. B. Juckett. 2008. Augmented and standard Berlin–Frankfurt–Münster chemotherapy for treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 49(12): 2298-2307. doi 10.1080/10428190802517732.
- Coley, H., F. Labeed, H. Thomas y M. Hughes. 2007. Biophysical characterization of MDR breast cancer cell lines reveals the cytoplasm is critical in determining drug

- sensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770(4): 601-608. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.12.002.
- Conter, V., C. Rizzari, A. Sala, R. Chiesa, M. Citterio, A. Biondi. 2004. Acute Lymphoblastic Leukemia. Orphanet encyclopedia, Report update June 18, 2019. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf>
- Cooper, S. L., y P. A. Brown. 2015. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America* 62(1): 61-73. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.006
- Covarrubias-Espinoza, G. y H. Rendón-García. 2008. Datos clínicos de alarma para sospechar cáncer en el niño. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora* 25(1): 36-39.
- D Antonio, P., M. Lasalvia, G. Perna. Y V. Capozzi. 2012. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818(12):3141-3148. doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.001
- Dannhauser, D., D. Rossi, M. Ripaldi, P. Netti, y F. Causa. 2017. Single-cell screening of multiple biophysical properties in leukemia diagnosis from peripheral blood by pure light scattering. *Scientific Reports* 7(12666): 1-13. doi: 10.1038/s41598-017-12990-4
- Daza-García, R. 2014. Desarrollo de un procedimiento para la observación y caracterización mecánica de células sobre sustratos opacos mediante microscopía de fuerzas atómicas: aplicación al estudio de linfocitos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Departamento de Ciencias de los Materiales. Madrid, España.
- Deng, X., F. Xiong, X. Li, B. Xiang, Z. Li, X. Wu y W. Xiong. 2018. Application of atomic force microscopy in cancer research. *Journal of Nanobiotechnology* 16(102): 2-15. doi.org/10.1186/s12951-018-0428-0
- Dolai, T. K., A. Panigrahi, K. Kumar, P. K Mandal, B. Bagchi y P. Chakrabarti. 2015. Outcome of ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) 90 Protocol in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Resource Constraint Setting. *Blood* 126(23), 4911.
- Dong, S., Q. Wang, S. Sun, Y. Liang, J. Jiang y L. Liu. 2013. Atomic force microscopy of chronic lymphatic leukaemia cells activation induced by *Staphylococcus aureus*. *Cell Biology International* 37(4): 380-386. doi: 10.1002/cbin.10052
- Dördelmann, M., A. Reiter, A. Borkhardt, W. D. Ludwig, N. Götz, S. Viehmann y M. Schrappe .1999. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94(4): 1209-1217. doi.org/10.1182/blood.V94.4.1209.416k05_1209_1217
- Duman, M., A. Ebner, C. Rankl, J. Tang, L. Chtcheglova y L. Wildling, J. G Herman, P. Hinterdorfer. 2013. Atomic Force Microscopy (AFM) for Topography and Recognition Imaging at Single Molecule Level. *Encyclopedia of Biophysics* 1(1): 102-112. doi: 10.1007/978-3-642-16712-6_496
- Eaton, P. y P. West. Oxford University Press. AFM instrumentation, AFM modes, Measuring AFM images. 2010., 9-100 p. En: Oxford University Press (Eds), *Atomic Force Microscopy*. New York, United States of America.
- Flenner, E., F. Marga, A. Neagu, I. Kosztin y G. Forgacs. 2008. Relating Biophysical Properties Across Scales. *Current Topics In Developmental Biology* 81:461-483. doi: 10.1016/s0070-2153(07)81016-7
- Francis, L. W., P.D. Lewis, C. J. Wright y R.S Conlan. 2010. Atomic force microscopy comes of age. *Biology of the Cell* 102(2): 133-143. doi: 10.1042/BC20090127.

- Găman, A., E. Osiac, I. Rotaru y C. Taisescu. 2013. Surface morphology of leukemic cells from chronic myeloid leukemia under atomic force microscopy. *Current health sciences journal* 39(1): 45-47.
- Globocan. 2018. Estimated number of new cases in 2018, all cancer, both sexes, all ages. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Report update June 09, 2019. (https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysispie?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=)
- Globocan. 2018. Cancer tomorrow. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Report update June 09, 2019. (http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphicisotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0)
- Guzmán-Ortiz, A. L., G. Aparicio-Ozores, R. Valle-Ríos, O. Medina-Contreras, G. Patiño-López y H. Quezada. 2017. Proteomic changes in a childhood acute lymphoblastic leukemia cell line during the adaptation to vincristine. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México* 74(3): 181-192. doi: 10.1016/j.bmhmx.2017.03.005.
- Hansma, P., J. Cleveland, M. Radmacher, D. Walters, P. Hillner y M. Bezanilla M. 1994. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters* 64(13): 1738-1740. doi: 10.1063/1.111795
- Hassan, K., K.P. Bukhari, A. Zafar, M. Z. K. Malik y M. J. Akhtar. 1992. Acute leukaemia in children-French-American-British (FAB) classification and its relation to clinical features. *J Pak Med Assoc* 42(2): 29-33.
- Horcas, I., R. Fernández, J. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero y A. Baro. 2007. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments* 78(1): 13705.
- Horwitz, R. 2016. Cellular Biophysics. *Biophysical Journal* 110(5): 993-996. doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.002
- Hu, M., J. Wang, H. Zhao, S. Dong y J. Cai. 2009. Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis. *Journal of biomechanics* 42(10):1513-1519. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.03.051
- Huang, X., J. He, M. Liu y C. Zhou. 2014. The influence of aminophylline on the nanostructure and nanomechanics of T lymphocytes: an AFM study. *Nanoscale Research Letters* 9(1): 518. doi: 10.1186/1556-276x-9-518.
- Inaba, H. y C. Pui. 2010. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *The lancet oncology* 11(11): 1096-1106. doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70114-5
- Jembrek, M.J, J. Vlainić, V. Čadež y S. Šegota. 2018. Atomic force microscopy reveals new biomarkers for monitoring subcellular changes in oxidative injury: neuroprotective effects of quercetin at the nanoscale. *PLoS ONE* 13(10): 1-22. doi: 10.1371/journal.pone.0200119
- Jin, H., H. Zhao, L. Liu, J. Jiang, X. Wang, S. Ma y J. Cai. 2013. Apoptosis Induction of K562 Cells by Lymphocytes: An AFM Study. *Scanning*, 35(1): 7-11. doi: 10.1002/sca.21028
- Joshi, N. V., H. Medina, C. Colasante y A. Osuna. 2000. Ultrastructural investigation of human sperm using atomic force microscopy. *Archives of andrology* 44(1): 51-57. doi: 10.1080/014850100262416

- Kaymaz, B. T., N. Selvi, G. Saydam, F. Şahin y B. Kosova. 2012. Methylprednisolone induces apoptosis by interacting with the JAK/STAT pathway in HL-60 and K-562 leukemic cells. *Hematology* 17(2):93-99. doi: 10.1179/102453312X13221316477859
- Kim K., C. Cho, E. Park, M. Jung, k. Yoon y H. Park. 2012. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *Plos ONE* 7(1): e30066. doi: 10.1371/journal.pone.0030066
- Kozlova, E., A. Chernysh, V. Moroz y A. Kuzovlev. 2013. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron* 44: 218-227. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012
- Kubitschke, H., E. Morawetz, J. Käs y J. Schnauß. 2017. Physical Properties of Single Cells and Collective Behavior, 89-123 p. En: Ingolf S. (Ed.), *Quantification Of Biophysical Parameters In Medical Imaging*, Springer, Berlin Germany. doi: 10.1007/978-3-319-65924-4_5
- Lambrou, G. I., S. Vlahopoulos, C. Papathanasiou, M. Papanikolaou, M. Karpusas, E. Zoumakis, y F. Tzortzatou-Stathopoulou. 2009. Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells: Relation to early gene expression. *Leukemia research* 33(12):1684-1695. doi: 10.1016/j.leukres.2009.04.018
- Larios-Farak, T. C., H. Rendón-García, J. R. Ornelas-Ceballos, G. Covarrubias-Espinoza, C. G. Ríos-García y A. Morales-Peralta. 2016. Supervivencia de Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de Riesgo Intermedio. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora* 33(1): 19-25.
- Lastella, M., M. Lasalvia, G. Perna, P. F. Biagi y V. I. T. O. Capozzi. 2007. Atomic force microscopy study on human keratinocytes treated with HgCl₂. In *Journal of Physics: Conference Series* 61(1): 920-925. doi:10.1088/1742-6596/61/1/183
- Li, Y., J. Chen, Y. Liu, W. Zhang, W. He y H. Xu. L. Liu y E. Ma. 2017. Nanoscale quantification of the biophysical characterization of combretastatin A-4-treated tumor cells using atomic force microscopy. *PLOS ONE* 12(6): e0179115. doi: 10.1371/journal.pone.0179115
- Liu, H., Q. Tan, W. Geddie, M. Jewett, N. Phillips y D. Ke. 2013. Biophysical Characterization of Bladder Cancer Cells with Different Metastatic Potential. *Cell Biochemistry And Biophysics* 68(2): 241-246. doi: 10.1007/s12013-013-9702-9
- Liu, J., Y. Qu, G. Wang, X. Wang, W. Zhang, J. Li y J. Jiang. 2018. Study of morphological and mechanical features of multinuclear and mononuclear SW480 cells by atomic force microscopy. *Microscopy research and technique*, 81(1): 3-12. doi: 10.1002/jemt.22950
- Löwenberg, M., C. Satahn, D. W. Hommes y F. Butgereit. 2008. Novel insights into mechanism of glucocorticoids action and development of new glucocorticoid receptor ligands steroids. *Steroids*, 73(9-10): 1025-1029. doi:10.1016/j.steroids.2007.12.002
- Marrese, M., V. Guarino y L. Ambrosio. 2017. Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *Journal Of Functional Biomaterials*. 8(7): 2-20. doi: 10.3390/jfb8010007
- Matsko, N. y M. Mueller. 2004. AFM of biological material embedded in epoxy resin. *Journal Of Structural Biology* 146(3): 334-343. doi: 10.1016/j.jsb.2004.01.010
- Mikromash. 2019. HQ Tips. Report update November 28, 2019. (<https://www.spmtips.com/afm-tip-hq-nsc15-no-al>).

- Miller, K. D., R.L. Siegel, C. C. Lin, A. B. Mariotto, J. L. Kramer, J. L. Rowland y A. Jemal. 2016. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 66(4): 271-289. doi: 10.3322/caac.21349
- Morales-Peralta, A., G. Covarrubias-Espinoza, H. Rendón-García y T. C. Larios-Farak. 2014. Supervivencia en niños con Leucemia Aguda Linfoblástica tratados en base a factores de riesgo inmunomoleculares. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora* 31(2): 90-95.
- Morraja, M. M., T. Costa, E. Aguado y J. Illa. 1979. Clasificaciones morfológicas de la leucemia agudas. *Pediatría catalana: butlletí de la Societat Catalana de Pediatria* 39(4): 333-339.
- Nečas, D. y P. Klapetek. 2012. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics*, 10(1): 181-188. doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2
- Onciu, M. 2009. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* 23(4): 655-674. doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009
- Pan, Y., X. Liu, J. Liu, Q. Liu, Y. Yang, J. Yang, X. Zhang, Y. Wu y Y. Wang. 2016. Necroptosis: a new link between cell death and inflammation. *Neuroimmunology and Neuroinflammation* 3(7): 156-160. doi.10.20517/2347-8659.2015.59
- Pettmann, J., A. Santos, O. Dushek y S. Davis. 2018. Membrane Ultrastructure and T Cell Activation. *Frontiers In Immunology* 9(2152): 1-9. doi: 10.3389/fimmu.2018.02152
- Preetha, A., N. Huilgol y R. Banerjee. 2005. Interfacial properties as biophysical markers of cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59(9): 491-497. doi: 10.1016/j.biopha.2005.02.005
- Pujolsa, L., J. Mullol y C. Picado. 2009. Glucocorticoid receptor in human respiratory epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 16(5): 290-299. doi: 10.1159/000216187
- Qu, Y., Z. Wang, F. Zhao, J. Liu, W. Zhang, J. Li y H. Xu. 2018. AFM-detected apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by American ginseng root water extract. *Micron* 104:1-7. doi: 10.1016/j.micron.2017.10.003
- Rajkumar, N. N. y R. H. Vijay. 2017. Immunological Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia-Beyond Morphology: Experience from Kidwai State Cancer Institute, Bengaluru, India. *Journal of the Association of Physicians of India* 65(7) 14-17.
- Rendón-García H., G. Tamayo-Peraza y G. Covarrubias-Espinoza. 2017. Ventana del esteroide en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda evaluada por factores pronósticos. *Boletín Clínico Hospital Infantil Estado Sonora* 34(2): 82-89.
- Rendón-García, H. 2011. Determinación de la Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo en Pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Tesis de Maestría. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Hermosillo, Sonora, México.
- Ries, J., C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi y H. Ewers. 2012. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nature methods* 9(6): 582-584. doi: 10.1038/nmeth
- Rivera-Luna, R., R. Cárdenas-Cardós, A. Olaya-Vargas, J. Shalkow-Klincovstein, M. Pérez-García, O. A. Pérez-González y Y. M. Vidal. 2015. El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC* 60(2): 91-97.

- Rosenbluth, M. J., W. A. Lam y D. A. Fletcher. 2008. Analyzing cell mechanics in hematologic diseases with microfluidic biophysical flow cytometry. *Lab on a Chip* 8(7): 1062-1070. doi: 10.1039/b802931h
- Ross, A., Z. Jiang, M. Bastmeyer y J. Lahann. 2011. Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity. *Small*, 8(3): 336-355. doi: 10.1002/smll.201100934
- Ruiz-Argüelles, G. J., 2014. Leucemias agudas. 143-158 p. En: Editorial Panamericana (Eds). *Fundamentos de Hematología*. México D.F.
- Sack, I., y T. Schaeffter. 2018. Introduction: Medical Imaging for the Quantitative Measurement of Biophysical Parameters. 1-9 p. En: Sack I. y T. . Schaeffter (Eds), *Quantification Of Biophysical Parameters In Medical Imaging*. Springer, Cham, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-65924-4_1
- Sánchez-Vega F., M. Mina, J. Armenia, W. K. Chatila, A. Luna, K. C. La y D. Chakravarty. 2018. Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2): 321-337. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.035.
- Schwartzman, R. A., y J. A. Cidlowski. 1994. Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells. *International archives of allergy and immunology* 105(4): 347-354. doi.org/10.1159/000236781
- Seguro popular, Instituto Nacional de Salud Pública. 2001. Protocolo de la atención para la leucemia Linfoblástica. Guía Clínica y esquema de tratamiento. Report update June 16, 2018. <http://www.salud.gob.mx/unidades/dgpfs/micsitio/ptcia/htmldocs/htmbenef.htm>
- Smith, L. K., y J. A. Cidlowski. 2010. Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Healthy and Malignant Lymphocytes. *Neuroendocrinology-Pathological Situations and Diseases Progress in Brain Research* 182(1-30): (4):655-674. doi: 10.1016/S0079-6123(10)82001-1
- Suresh, S. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomaterialia* 3(4): 413-438. doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002
- Tan, Y., T. K. Fung, H. Wan, K. Wang, A. Y. Leung y D. Sun. 2011. Biophysical characterization of hematopoietic cells from normal and leukemic sources with distinct primitiveness. *Applied Physics Letters* 99(8): 083702. doi: 10.1063/1.3610938
- Tatar, A., T. Nagy-Simon, C. Tomuleasa, S. Boca y S. Astilean. 2016. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 238: 123-138.
- Tissing, W. J., J. P. Meijerink, M. L. den Boer y Pieters. 2003. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17(1): 17-25. doi: 10.1038/sj.leu.2402733
- Tomankova, K., H. Kolarova, M. Vujtek y H. Zapletalova. 2007. Study of cancer cells used Atomic Force Microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 23-28.
- Tortonesi, M. 1997. Cantilevers and tips for atomic force microscopy. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 16(2):28-33. doi:10.1109/51.582173
- Wang, J., Z. Wan, W. Liu, L. Li, L. Ren, X. Wang y Z. Zhang. 2009. Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosensors and Bioelectronics* 25(4): 721-727. doi:10.1016/j.bios.2009.08.011

- Wang, Y., C. Xu, N. Jiang, L. Zheng, J. Zeng, C. Qiu y S. Xie. 2016. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning* 38(6): 558-563. doi: 10.1002/sca.21300.
- World Health Organization. 2018. *Cancer*. Report update June 5, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wu, Y., H. Lu, J. Cai, X. He, Y. Hu, H. Zhao y X. Wang. 2009. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM. *Nanoscale research letters* 4(8): 942-947. doi:10.1007/s11671-009-9340-8
- Yadav, S., M. J. Barton y N. T. Nguyen. 2019. Biophysical properties of cells for cancer diagnosis. *Journal of biomechanics* 86:1-7. doi:10.1016/j.jbiomech.2019.02.006
- Zemła, J., J. Danilkiewicz, B. Orzechowska, J. Pabijan, S. Seweryn y M. Lekka. 2018. Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 73: 115-124. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.029