



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

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

---

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA DE DISTINTO ORIGEN  
ÉTNICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN Y  
MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.**

---

**TÉSIS**

Que para obtener el título en licenciatura en física presenta:  
**MARTHA ANAHÍ IÑIGUEZ BELTRÁN**

Hermosillo, Sonora. 9 de septiembre del 2021

# 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

## Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a mi madre, Martha, quien siempre ha sido un pilar importante en mi desarrollo personal y profesional, y que me apoyó con los ojos cerrados en aventurarme en esta carrera. También a mi pareja, Álvaro Iván, y mi hijo, Diego, quienes me dieron impulso y confianza para terminar mis estudios.

A mis hermanas, Majo y Yovanna, y mis suegros, Álvaro e Isabel, que siempre estuvieron conmigo dándome ánimos y ayudándome a hacer más fácil el camino a la culminación de mi licenciatura.

A todos los profesores y compañeros con quienes tuve el placer de tomar cursos y quienes aportaron gran parte del conocimiento que adquirí durante mi formación como física. Especialmente a mis amigos Fer, Majo, Aarón, Olga, Joules y Melissa, con quienes estudiaba durante la licenciatura o hacíamos tareas juntos.

A la Dra. Mónica Acosta, quien aceptó asesorarme en este trabajo y quien me dio la confianza de trabajar con ella y la ayuda en la estructuración de la tesis.

También al Dr. Ricardo López Esparza, a la Dra. Aracely Angulo Molina y al Dr. Efraín Urrutia Bañuelos por haber aceptado participar como sinodales.

# Índice general

<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>7</b>
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>8</b>
<b>1. Fundamentos de la Radiación Ionizante</b>	<b>9</b>
1.1. Tipos de radiación ionizante . . . . .	9
1.1.1. Radiación alfa ( $\alpha$ ) . . . . .	9
1.1.1.1. Decaimiento alfa . . . . .	10
1.1.2. Radiación beta ( $\beta$ ) . . . . .	10
1.1.2.1. Decaimiento $\beta^-$ . . . . .	11
1.1.2.2. Decaimiento $\beta^+$ . . . . .	11
1.1.3. Radiación gamma ( $\gamma$ ) . . . . .	12
1.1.3.1. Decaimiento gamma . . . . .	12
1.1.3.2. Fuentes de radiación gamma . . . . .	13
1.2. Interacción de la radiación con la materia . . . . .	13
1.2.1. Interacción fotón-materia . . . . .	14
1.2.1.1. Dispersión de Thomson . . . . .	14
1.2.1.2. Efecto fotoeléctrico . . . . .	14
1.2.1.3. Dispersión de Compton . . . . .	14
1.2.1.4. Reacción fotonuclear . . . . .	14
1.3. Radiación ionizante aplicada en tratamientos de cáncer . . . . .	15
1.3.1. Radioterapia y teleterapia . . . . .	15
1.3.1.1. Braquiterapia . . . . .	16
<b>2. Cáncer de Mama</b>	<b>17</b>
2.1. Generalidades del cáncer de mama . . . . .	17
2.1.1. Estadísticas . . . . .	18
2.1.1.1. Cáncer de mama en México . . . . .	18
2.2. Líneas celulares de cáncer de mama . . . . .	19
2.2.1. MCF-7 . . . . .	20
2.2.2. MDA-MB-231 . . . . .	20
2.2.3. ID014-T . . . . .	21
2.2.4. T-47D . . . . .	22
2.2.5. MDA-MB-468 . . . . .	22
2.2.6. MCF-10A . . . . .	23
2.3. Efecto de la radiación gamma en distintas líneas celulares de cáncer de mama . . . . .	23

<b>3. Teoría de la Espectroscopía Raman</b>	<b>24</b>
3.1. Principios de la espectroscopía Raman	24
3.1.1. Teoría básica	25
3.1.2. Raman Stokes	26
3.1.3. Raman anti-Stokes	27
3.1.4. Relaciones entre Raman Stokes y anti-Stokes	28
3.2. Instrumento de la microscopía Raman	28
3.2.1. Fuentes de excitación	29
3.2.1.1. Fibra óptica	30
3.2.2. Sistema de iluminación de la muestra y recolección óptica de la luz	30
3.2.3. Sistema de selección de longitud de onda	30
3.2.4. Sistema de detección	30
3.2.4.1. Software	31
3.2.5. Microscopía Raman confocal	31
3.3. Aplicaciones de la espectroscopía Raman	32
3.3.1. Raman en física de estado sólido	32
3.3.2. Raman en química de estado sólido	32
3.3.3. Raman en la química	32
3.3.4. Raman en biología y medicina	33
3.3.5. Raman en nanotecnología	33
3.4. Microscopía Raman en sistemas biológicos	34
3.5. Microscopía Raman en células de cáncer de mama gamma irradiadas	34
3.5.1. Espectroscopía Raman de diversas líneas celulares	35
3.5.2. Espectroscopía Raman de líneas celulares de cáncer de mama irradiadas	38
3.5.2.1. MCF-10A	38
3.5.2.2. MCF-7 y MDA-MB-231	40
<b>4. Teoría de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</b>	<b>45</b>
4.1. Instrumentación y principios físicos del AFM	45
4.1.1. Micropalanca	46
4.1.2. Diodo láser y fotodiodo	46
4.1.3. Piezoeléctrico	47
4.1.4. Obtención de imágenes	47
4.2. Mecánica de la micropalanca	47
4.3. Mediciones y modos de operación del AFM	49
4.3.1. Mediciones en AFM	49
4.3.1.1. Medición de imagen:	49
4.3.1.2. Medidas de fuerza:	49
4.3.2. Modos de operación en AFM	50
4.3.2.1. Modo de contacto	50
4.3.2.2. Modos dinámicos	50
4.3.3. Interacción de fuerzas y modelos de descripción	51
4.4. Aplicaciones del AFM	53
4.5. AFM en sistemas biológicos	53
4.5.1. Células y procesos celulares:	54
4.5.2. AFM en células de cáncer	54
4.6. AFM en células de cáncer de mama.	57

4.6.1. Líneas celulares MCF-10A y MCF-7 . . . . .	57
4.6.2. Líneas celulares MDA-MB-231, T-47D e ID014-T . . . . .	59
4.6.3. Línea celular MDA-MB-468 . . . . .	61
<b>Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>63</b>

# Introducción

La Radiación Ionizante es un tipo de radiación electromagnética que se manifiesta en forma de ondas de alta frecuencia, tales como los rayos gamma, alfa y beta. Este tipo de radiación es capaz de ionizar átomos o moléculas; en otras palabras, puede arrancar electrones de sus capas más externas <sup>[1]</sup>.

La radiación ionizante ha abierto gran camino en el área de la medicina utilizándose como terapia y tratamiento para diversas enfermedades. Uno de los principales padecimientos a tratar es el cáncer en sus diversas manifestaciones. Además, el tipo de cáncer más común a nivel mundial es el cáncer de mama, y se estimaba que en México, para el año 2020 el riesgo de padecer cáncer de mama pudiera alcanzar a 1 de cada 3 mujeres mexicanas mayores de 25 años <sup>[30]</sup>. Actualmente se utiliza un mismo modelo para la aplicación de radioterapias utilizadas para atacar el cáncer de mama. Sin embargo, la variabilidad de incidencia y mortalidad por este padecimiento entre distintas razas étnicas lleva a la necesidad de caracterizar cada población. El estudio de agentes terapéuticos y de diagnóstico generalmente se realiza en líneas celulares de origen afroamericano o caucásico. Dado que algunas investigaciones han observado diferencias en la respuesta al tratamiento, según el origen étnico, se puede decir que estos modelos están limitados. Con el fin de minimizar los efectos adversos de la radiación como lo es el daño celular por ionización de ADN, o a través de radicales libres, la radioterapia personalizada es utilizada para optimizar las dosis de exposición.

En los últimos años ha crecido el interés por la aplicación de herramientas biofísicas en el estudio del cáncer de mama entre ellas Microscopía de Fuerza Atómica y Espectroscopía Raman; esto con el fin de mejorar los modelos existentes y adaptarlos mejor a la radioterapia personalizada. En el año 2019, un grupo de investigación de la Universidad de Sonora, enfocado en inmunología y cáncer, aisló y caracterizó parcialmente y por primera vez una línea celular de cáncer de mama proveniente de un tumor de una paciente mexicana diagnosticada con carcinoma ductual invasivo, la cual fue denominada como “ID014-T”; todo esto con el interés de crear modelos para encontrar diagnósticos y terapias más certeras. Inicialmente, esta línea se caracterizó parcialmente por inmunohistoquímica en 2018. Posteriormente, como parte de un proyecto de tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, y el apoyo de un grupo interdisciplinario de biofísica y del laboratorio de inmunología de la Universidad de Sonora, se logró en 2021 su caracterización parcial bioquímica y topográfica a nanoescala por medio de espectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica. Gracias a los resultados que se obtuvieron es posible realizar un estudio del efecto de la radiación ionizante en células de cáncer de mama provenientes de distinto origen étnico por medio de espectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica y ponerlas en comparación.

Esta tesis se desarrolla en 4 importantes capítulos. En el primer capítulo aborda diversos conceptos de radiación así como sus tipos y origen. Además se mencionan los tipos de terapias y tratamientos que recurren a ella.

El segundo capítulo está enfocado en el cáncer de mama. Se realiza un análisis de su epidemiología, los tipos de cáncer de mama que existen y la descripción de algunas de las líneas celulares ya establecidas pertenecientes a distinto origen étnico.

El tercer capítulo aborda todo lo relacionado a la microscopía Raman desde los principios físicos básicos de la espectroscopía Raman, la instrumentación y equipo necesario y finalizando el capítulo con un análisis comparativo de los patrones Raman en células de cáncer de mama irradiadas y sin irradiar.

Por último, el capítulo 4 se enfoca en la Microscopía de Fuerza Atómica, llegando a comparar diversas características físicas de las mismas líneas celulares al ser irradiadas y antes de someterse a radiación.

Finalmente, se agrega una breve conclusión y perspectivas acerca de este trabajo de tesis. Esta revisión da paso al estudio de la relación que existe entre el origen étnico de líneas celulares de cáncer de mama y la respuesta radiológica que presentan.

# Objetivo General

Revisar el efecto de la radiación gamma en líneas celulares de cáncer de mama de distinto origen étnico así como su caracterización química y nano-topografía mediante espectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

# Objetivos Específicos

- Presentar de manera breve, concisa y precisa la diferencia entre los efectos de la radiación ionizante en distintas líneas celulares.
- Comparar los espectros Raman de las líneas celulares de cáncer de mama en condiciones normales y después de ser expuestas a radiación ionizante.
- Analizar las características físicas que presentan las células de cáncer de mama (viscosidad, elasticidad y rugosidad) por medio de Microscopía de Fuerza Atómica y observar el cambio en estas magnitudes en las mismas células después de exponerse a radiación ionizante.

# Capítulo 1

## Fundamentos de la Radiación Ionizante

### 1.1. Tipos de radiación ionizante

La física ha estudiado diversos tipos de radiación ionizante como lo son la radiación Alfa, Beta y Gamma. Estas pueden diferenciarse entre ellas por la cantidad de energía que transmiten. A continuación, se presentan las características de estos tres tipos de radiación.

#### 1.1.1. Radiación alfa ( $\alpha$ )

La radiación alfa, rayos alfa o partículas alfa están conformadas por dos protones y dos neutrones, similar a la composición del núcleo del Helio-4. Estas tienen una masa en reposo de alrededor de los 3.7273 GeV (eV - Electron Volts) y una energía alrededor de los 5 MeV <sup>[2]</sup>. Dado que se componen de fermiones se puede decir que son pesadas y están cargadas positivamente, lo que hace que pierdan energía cinética rápidamente a unos cuantos centímetros de la fuente de emisión <sup>[3]</sup>. Esto quiere decir que su tiempo de vida es muy corto ya que unos centímetros en el aire terminan absorbiendo su energía. En comparación con objetos cotidianos, una simple hoja de papel puede absorber la mayor parte de su energía, explicando así que las partículas alfa tienen un poder de penetración débil.

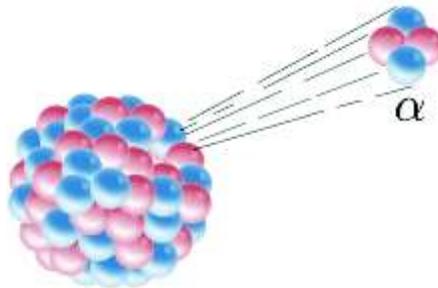


Figura 1.1: partícula alfa. Imágen creada por: Inductiveload - Trabajo propio, Dominio público, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2858666>

Estas partículas se generan en un proceso llamado desintegración alfa o decaimiento alfa, el cual ocurre cuando el núcleo de átomos pesados sufre un proceso llamado fisión nuclear espontánea [2]. Esto se explica mejor estudiando la conservación de la energía, conservación del momento lineal y conservación del momento angular. A continuación, se dará una breve explicación.

#### 1.1.1.1. Decaimiento alfa

Abordando la conservación de la energía para el proceso del decaimiento alfa, asumimos que tenemos un núcleo  $\mathbf{X}$  el cual será el núcleo emisor en reposo, por lo que la energía inicial del sistema será la energía de  $\mathbf{X}$ , que es  $m_x c^2$ . Después de la emisión tendremos ahora un núcleo  $\mathbf{X}'$  y nuestra partícula alfa ( $\alpha$ ) la cual se encuentra en movimiento. Entonces, con  $\mathbf{T}$  como la energía cinética de las partículas, la conservación de la energía se puede expresar de la siguiente manera

$$m_x c^2 = m_{x'} c^2 + T_{x'} + m_\alpha c^2 + T_\alpha, \quad (1.1)$$

escrito de otra manera

$$(m_x c^2 - m_{x'} c^2 - m_\alpha c^2) = T_{x'} + T_\alpha. \quad (1.2)$$

El valor del lado izquierdo de la igualdad es la energía asociada al decaimiento, la cual es llamada  $Q$ :

$$Q = (m_x - m_{x'} - m_\alpha) c^2 \quad (1.3)$$

El decaimiento espontáneo ocurre solo si  $Q > 0$  [2].

#### 1.1.2. Radiación beta ( $\beta$ )

Se le llama radiación beta, rayos beta o partículas beta a los electrones o positrones emitidos con altas velocidades-energías en un proceso llamado decaimiento beta el cual ocurre en los núcleos atómicos [4]. Como hablamos de electrones y positrones, la masa relacionada es  $m_e = 0,510998 MeV$ . Un electrón de  $0,5 MeV$  puede recorrer una distancia alrededor de un metro en el aire. Por su alta energía y velocidad, la radiación beta es más ionizante que la alfa y tiene un poder de penetración mayor lo que significa que puede penetrar piel. Sin embargo, estas partículas pueden ser detenidas fácilmente por una hoja de metal o un bloque de madera.

Existen dos tipos de decaimiento más conocidos que producen este tipo de radiación, uno de ellos es el decaimiento  $\beta^-$  donde se emite un electrón y otro es el decaimiento  $\beta^+$ , donde se emite un positrón [2]. A continuación se dará una breve explicación.

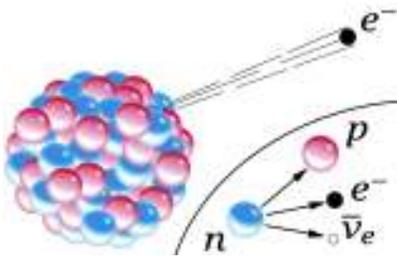
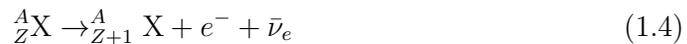


Figura 1.2: Decaimiento beta. Imágen creada por: Inductiveload - Trabajo propio, Dominio público, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2859203>

### 1.1.2.1. Decaimiento $\beta^-$

El proceso de decaimiento  $\beta^-$  ocurre a consecuencia de la interacción débil de un núcleo inestable, en el cual se genera un electrón y un electrón antineutrino [5].



Aquí,  $\text{X}$  y  $\text{X}'$  son los núcleos antes del decaimiento y después del decaimiento respectivamente, con número másico  $\mathbf{A}$  y número atómico  $\mathbf{Z}$ .  $e^-$  y  $\bar{\nu}_e$  son el electrón y el antineutrino.

Este tipo de decaimiento también ocurre con neutrones libres los cuales producen un protón y un bosón  $W^-$  que a su vez decaen en dos partículas: un electrón y un electrón antineutrino.



### 1.1.2.2. Decaimiento $\beta^+$

El decaimiento  $\beta^+$ , también conocido como emisión de positrones, ocurre cuando de un núcleo inicial inestable se produce otro con número atómico decrementado en uno por consecuencia de la fuerza nuclear débil, al contrario que el decaimiento  $\beta^-$  [5].



En este proceso un protón del núcleo se convierte en neutrón y se produce un positrón  $e^+$  y un electrón neutrino  $\nu_e$ .



Este tipo de decaimiento generalmente ocurre en núcleos con muchos protones y no se da con protones aislados (o libres) dado que la masa del protón es menor a la del neutrón [5]. Para que este proceso sea posible el núcleo “daughter” debe tener mayor energía de enlace que el núcleo “mother”. La diferencia entre estas energías es lo que permite que un protón se convierta en un neutrón.

### 1.1.3. Radiación gamma ( $\gamma$ )

La radiación Gamma o rayos Gamma es una forma de radiación electromagnética altamente energética que se produce por el decaimiento radioactivo de un núcleo atómico. Las partículas encargadas de transportar este tipo de radiación son los fotones. Los rayos Gamma tienen una energía en un rango entre los 0.1 a 10 MeV y longitudes de onda correspondientes entre los 104 y 100 fm <sup>[2]</sup>. Dada su naturaleza energética son altamente penetrantes; comparado con los rayos Alfa y Beta, los rayos Gamma tienen la capacidad de alta penetración en la materia, siendo detenidos únicamente por bloques de plomo, granito o concreto.

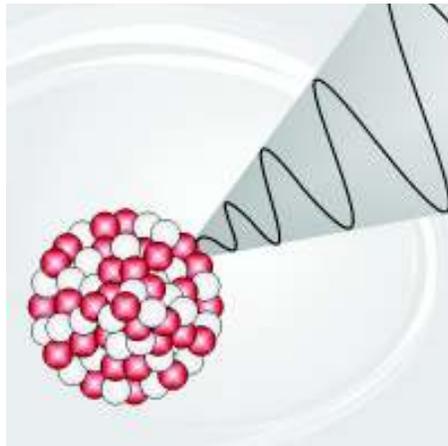


Figura 1.3: Rayos Gamma. Imagen creada por: CC BY 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1889504>

En procesos naturales se encuentra la radiación Gamma siendo emitida por radioisótopos como el Potasio-40. También es posible producirla de manera artificial: los rayos X son un ejemplo de ello. Son ondas electromagnéticas originadas por el choque de electrones con un cierto material en el interior de un tubo de vacío<sup>[40]</sup>. También se observa radiación Gamma en forma de rayos cósmicos. A continuación, se explicará de manera breve el decaimiento Gamma.

#### 1.1.3.1. Decaimiento gamma

El decaimiento Gamma puede ocurrir después de otro proceso de decaimiento beta o alfa. En los procesos de decaimiento, al decaer un núcleo mother el núcleo daughter queda en estado excitado. En el proceso de estabilización se emiten los fotones altamente energéticos conocidos como rayos Gamma. Este proceso es similar al ocurrido cuando un electrón excitado pasa a un nivel de energía mayor y regresa a su estado inicial, emitiendo un fotón en este último proceso <sup>[2]</sup>.

Un ejemplo de decaimiento Gamma se presenta cuando un núcleo de Cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ) decae por desintegración  $\beta$  a Niquel-60 ( $^{60}\text{Ni}$ ), siendo este un isótopo estable el cual llega a emitir un par de rayos Gamma con energías alrededor de 1.17 y 1.33 MeV respectivamente. A partir de la interacción de los rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  con la materia se producen dos fenómenos físicos principales: el efecto fotoeléctrico y el efecto Compton <sup>[41]</sup>.

### 1.1.3.2. Fuentes de radiación gamma

Una fuente radiactiva es una cantidad conocida de un radionúclido que emite radiación ionizante como son: rayos gamma, partículas alfa, partículas beta y radiación de neutrones.

Las fuentes de radiación gamma se caracterizan de acuerdo a sus niveles de energía discretos que varían en intensidad, dependiendo de la probabilidad de desintegración de cada nivel nuclear. Las fuentes comunes actualmente en uso, en orden de energía fotónica ascendente, son Iterbio-169, Selenio-75, Iridio-192, Cesio-137 y Cobalto-60 [8]. A continuación, se mostrará una tabla con características de cada uno de los isótopos.

Cuadro 1.1: Propiedades de radioisótopos Gamma típicos utilizados en Imagenología de transmisión [8] (Tabla periódica de los isótopos: <http://ie.lbl.gov/education/isotopes.htm> y XCOM: <http://www.physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/Text/XCOM.html>).

## 1.2. Interacción de la radiación con la materia

Los diferentes tipos de radiación interactúan de diversa manera con la materia, dado que su constitución es distinta. Por ejemplo, al hablar de partículas alfa hablaremos de núcleos de Helio formados por neutrones y protones; con las partículas beta nos referiremos a electrones o positrones; con los rayos gamma estaremos hablando de fotones. Cada uno de ellos varía entre sus energías y, en consecuencia, en su poder de penetración. Sin embargo, para esta tesis solo es de importancia la interacción que hay entre la radiación Gamma y la materia o conocido de otra manera interacción fotón-materia, por lo que abordaremos los distintos tipos de interacción que hay a continuación.

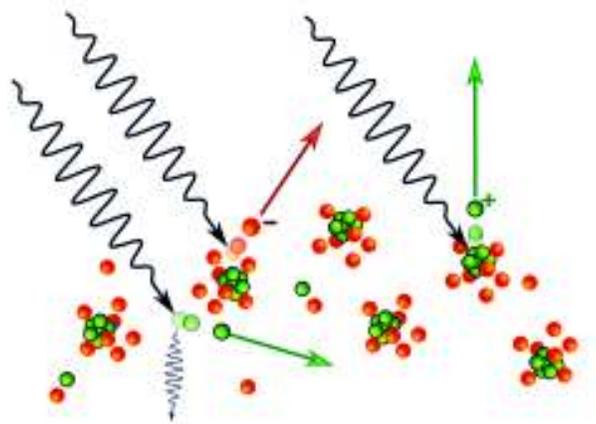


Figura 1.4: Interacción luz-materia. Imagen creada por Ponor - Trabajo propio, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=91353714>

### 1.2.1. Interacción fotón-materia

Toda partícula cargada en movimiento pierde continuamente energía al interactuar con los átomos que conforman la materia. Sin embargo, los fotones interactúan de distinta manera por la neutralidad de su carga. En algunas interacciones pueden perder totalmente su energía y desaparecer; en otros casos puede ceder parte de su energía. Las principales formas en las que la energía de un fotón interactúa con la materia son por absorción fotoeléctrica (o efecto fotoeléctrico), por dispersión de Compton, por creación de pares y por reacción fotonuclear <sup>[6]</sup>. A continuación, se describe cada uno de estos tipos de interacción con la materia.

#### 1.2.1.1. Dispersión de Thomson

En la dispersión de Thomson un electrón oscila dado el vector de campo eléctrico de una onda electromagnética. A bajas energías el electrón oscilante emite una radiación con la misma frecuencia que la onda incidente. En este proceso no hay pérdida de energía por parte de la onda (en nuestro caso, el fotón), sólo existe cambio en el ángulo de deflexión de la onda en caso de que haya una colisión. La mecánica cuántica demuestra que la dispersión de Thomson es un extremo de la dispersión de Compton cuando la energía del fotón incidente se reduce a cero <sup>[6]</sup>.

#### 1.2.1.2. Efecto fotoeléctrico

El efecto fotoeléctrico es un fenómeno en el que se emiten electrones de una superficie (materia) tras la absorción de energía de cierto tipo de radiación electromagnética incidente como los rayos X o la luz visible, a estos electrones emitidos se les llama fotoelectrones. En este fenómeno la energía con la que son emitidos dichos electrones no depende de la intensidad de la luz incidente, sino que esta se relaciona con la longitud de onda de la radiación. Cuando la longitud de onda de la luz es más corta se emiten electrones más energéticos <sup>[6]</sup>.

#### 1.2.1.3. Dispersión de Compton

La dispersión de Compton es la disminución de energía de un fotón de rayos X o rayos Gamma cuando interactúa con materia. Este es un proceso de dispersión inelástica debido al cambio en la energía de los fotones. El efecto es importante ya que demuestra que la luz no se puede explicar simplemente como un fenómeno ondulatorio puesto que para explicar la dispersión de Compton la luz debe comportarse como partícula. El experimento de Compton verificó que la luz puede comportarse como una corriente de cuantos parecidos a partículas cuya energía es proporcional a la frecuencia <sup>[6]</sup>.

#### 1.2.1.4. Reacción fotonuclear

La reacción fotonuclear es el proceso en el cual núcleos son eyectados por otros núcleos que absorben fotones. Un ejemplo de ello es al emitirse un neutrón cuando un rayo Gamma es capturado por un núcleo de Plomo. Para que esto pueda ocurrir

los fotones deben tener una energía mayor a la energía de enlace de los núcleos. La energía cinética del neutrón emitido es igual a la energía del fotón menos la energía de enlace. Esta reacción es importante desde el punto de vista de la protección radiológica ya que existe la producción de neutrones, lo que significa que los núcleos residuales después de la reacción se vuelven radiactivos <sup>[6]</sup>.

### **1.3. Radiación ionizante aplicada en tratamientos de cáncer**

Las aplicaciones médicas de la radiación ionizante van desde la simplicidad de tomar una radiografía de tórax hasta la complejidad del tratamiento de un tumor cerebral. Cada uno de estos procedimientos beneficia a los pacientes <sup>[9]</sup>. Existen distintas formas de utilizar radiación ionizante en el campo de la medicina los cuales son:

- Radiología
- Medicina nuclear diagnóstica
- Radioterapia y teleterapia
- Braquiterapia
- Medicina nuclear terapéutica

En esta sección nos enfocaremos principalmente en la radioterapia la cual es un tipo de terapia utilizada en el tratamiento de cáncer, ya que en esta tesis buscamos abordar la parte relacionada a la radiosensibilidad de tejido biológico.

#### **1.3.1. Radioterapia y teleterapia**

La radiación ionizante aplicada con fines terapéuticos (a diferencia de la de fines de diagnóstico) también se clasifica típicamente en categorías según si la fuente de radiación es externa o interna al paciente. Estas áreas se denominan oncología radioterápica o radioterapia y teleterapia (fuentes externas), braquiterapia (interna) y medicina nuclear terapéutica (interna) <sup>[9]</sup>.



Figura 1.5: Ejemplo de Radioterapia. Imagen extraída de RogelCancer-Center.org: <https://www.rogelcancercenter.org/living-with-cancer/mind-body-and-side-effects/how-cope-side-effects-radiation-therapy> el 20 de enero del 2021.

La radioterapia y oncología radioterápica es una especialidad de la medicina que trata con pacientes con cáncer utilizando radiación ionizante. Esta emplea teleterapia la cual es terapia con radiación emitida por una fuente de radiación externa. La radioterapia también puede tratar condiciones cancerosas selectivas, su función en pacientes con cáncer es aplicar una dosis de radiación al tumor con el fin de matar las células que lo componen <sup>[9]</sup>.

#### 1.3.1.1. Braquiterapia

La braquiterapia es una técnica donde se colocan fuentes de radionúclidos selladas dentro de las cavidades corporales o directamente en tejidos para tratar neoplasias malignas. Su principal ventaja es que la dosis de radiación utilizada puede ser más alta en el lugar que más se ocupe, en comparación con otros métodos <sup>[9]</sup>.

El método original de braquiterapia ahora se denomina braquiterapia de "dosis baja" (Low Dose Radiation - LDR). La radiactividad de las fuentes disponibles en el momento del desarrollo de la braquiterapia era tal que, para administrar una dosis que matara al tumor las fuentes tenían que dejarse en su lugar durante días. Debido a la baja actividad estas fuentes podrían manejarse manualmente <sup>[9]</sup>. La terapia por LDR normalmente implica dosis de radiación tumorales de 0.3 a 0.6 Gy por hora. Existen estudios recientes donde se menciona que la LDR ayuda a reparar el daño en el ADN de células cancerosas y a la proliferación del sistema inmunológico <sup>[10]</sup>.

# Capítulo 2

## Cáncer de Mama

### 2.1. Generalidades del cáncer de mama

Se le llama cáncer al conjunto de enfermedades las cuales están relacionadas por la proliferación desmedida de células que presentan mutaciones. Este tipo de enfermedades inicia cuando una única célula muta, lo que da paso a alteraciones en la regulación de los procesos de división celular. Las mutaciones presentadas por las células pueden ser hereditarias, causadas por errores en la replicación del ADN, el resultado de la exposición a químicos nocivos o exposición a la radiación <sup>[28]</sup>.

El cáncer de mama es una proliferación de células epiteliales que revisten los conductos mamarios, y la cual se considera maligna. Es una enfermedad donde una única célula producida de una serie de mutaciones somáticas o de línea germinal, adquiere la capacidad de dividirse de manera desmedida y sin un orden, formando masas de células de cáncer también conocidas como tumores. El tumor el cual comienza como anomalía leve y de dimensiones indetectables, pasa a ser grave si no se detecta a tiempo. Las células cancerosas tienen la capacidad de propagarse a otras partes del cuerpo, fenómeno mejor conocido como metástasis. El cáncer no tratado a tiempo puede producir la muerte <sup>[29]</sup>.

Actualmente se conocen y se han caracterizado dos tipos de cáncer de mama los cuales son:

- El carcinoma ductal el cual inicia en los conductos que transportan leche desde la mama hasta el pezón. Es el tipo más común de cáncer de mama.
- El carcinoma lobular comienza en partes de las mamas llamadas lobulillos, las cuales se encargan de la producción de leche materna.

En la actualidad se cuenta con distintos métodos de detección y tratamientos para el cáncer de mama, algunos de ellos mencionados en el primer capítulo de esta tesis. A continuación se mostrará una revisión estadística de este padecimiento.

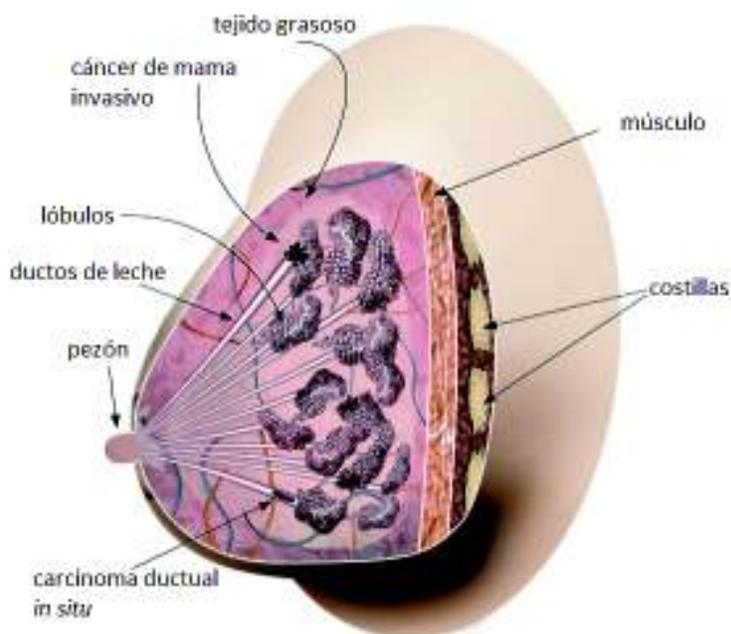


Figura 2.1: Ilustración del seno de una mujer, mostrando carcinoma ductal *in situ* y cáncer de mama invasivo. Extraído de [canceraustralia.gov: https://www.canceraustralia.gov.au/affected-cancer/cancer-types/breast-cancer/what-breast-cancer](https://www.canceraustralia.gov.au/affected-cancer/cancer-types/breast-cancer/what-breast-cancer)

### 2.1.1. Estadísticas

El cáncer de mama femenino es el tipo de cáncer diagnosticado con más frecuencia y la principal causa de muerte en mujeres que padecen cáncer a lo largo del mundo. A partir de un estudio realizado con datos obtenidos en el 2008 por la organización mundial de la salud, cada año son detectados 1.38 millones de casos nuevos de cáncer de mama y alrededor de 458 mil mujeres mueren a causa de esta enfermedad <sup>[29]</sup>.

#### 2.1.1.1. Cáncer de mama en México

En México, en el año 2019, de cada 100 mil mujeres de mayores de 19 años se reportaron 35.24 casos nuevos de cáncer de mama. Las tasas de mortalidad más altas por cáncer de mama en México se presentan en el norte del país y las más bajas al sur, lo cual puede asociarse a la distribución regional del desarrollo socioeconómico. En este año, las entidades con las menores tasas de mortalidad (de 9.29 a 13.64) son Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Campeche, Colima, Guerrero, Morelos, Hidalgo, Tabasco. En el siguiente estrato (13.65 a 18) se encuentra Tlaxcala, Puebla, México, San Luis Potosí, Veracruz, Michoacán, Guanajuato, Durango y Zacatecas. Le siguen (estrato 18.01 a 22.35) Querétaro, Coahuila, Sinaloa, Sonora, Jalisco, Nuevo León, Aguascalientes, Tamaulipas y Nayarit. Las mayores tasas (22.36 a 26.71) se encuentran en Chihuahua, Ciudad de México, Baja California y Baja California Sur. Se estimaba que para el año 2020 el riesgo de padecer cáncer de mama pudiera alcanzar a 1 de cada 3 mujeres mexicanas mayores de 25 años <sup>[30]</sup>

Los factores de riesgo para padecer cáncer de mama más estudiados en México son los asociados con la reproducción, como la edad de la menarca, edad de la menopausia, edad del primer embarazo, número de embarazos, uso de anticonceptivos y terapia hormonal, así como la práctica de lactancia materna. Aunque estudios han demostrado la relación de algunos de estos factores con la neoplasia, el efecto por el uso de anticonceptivos hormonales y de la terapia hormonal sobre el riesgo de padecer cáncer de mama, esto no está totalmente comprobado. En cuanto a lactancia materna se refiere, este factor parece tener un efecto protector contra este padecimiento <sup>[31]</sup>.

## 2.2. Líneas celulares de cáncer de mama

Una línea celular es un cultivo de células con alta capacidad de multiplicación *in vitro*, establecido a partir del primer subcultivo generado de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen <sup>[59]</sup>.

En el caso del cáncer de mama, según la base de datos Cellosaurus, actualmente existen alrededor de 1200 líneas celulares humanas conocidas. A continuación se muestra una tabla con los nombres de las líneas comúnmente utilizadas para estudio y experimentación, tumor primario (tumor original, el primero en producirse) y, en algunas de ellas, origen de las células.

Línea celular	Tumor primario	Origen de las células
600MPE	Carcinoma Ductual Invasivo	
AMJ13	Carcinoma Ductual Invasivo	Primario
AU565	Adenocarcinoma	
BT-20	Carcinoma Ductual Invasivo	Primario
BT-474	Carcinoma Ductual Invasivo	Primario
BT-483	Carcinoma Ductual Invasivo	
BT-549	Carcinoma Ductual Invasivo	
Evs-a-T	Carcinoma ductal invasivo	Metástasis
Hs578T	Carcinoma Ductual Invasivo	Primario
MCF-7	Carcinoma Ductual Invasivo	Metástasis
MDA-MB-231	Adenocarcinoma	Metástasis
SkBr3	Carcinoma Ductual Invasivo	Metástasis
T-47D	Carcinoma Ductual Invasivo	Metástasis
ZR-75-1	Carcinoma Ductual Invasivo	

Cuadro 2.1: Líneas celulares de cáncer de mama. Extraído de la base de datos Cellosaurus”: <https://web.expasy.org/cellosaurus/>

Las líneas celulares de cáncer de mama más utilizadas en el área de investigación son la MCF-7, MDA-MB-231, T-47D, MDA-MB-468 y la línea normal MCF-10A, la cual se utiliza comúnmente como control. También, se ha estudiado recientemente una nueva línea celular de cáncer de mama nombrada ID014-T, la cual es de origen mexicano. Por estos motivos, en esta tesis nos enfocaremos a describir cada una de ellas.

### 2.2.1. MCF-7

Línea celular aislada por primera vez en 1970 de una mujer caucásica estadounidense. Es una de las líneas celulares de cáncer de mama con mayor tiempo de vida. Las células MCF-7 son células adherentes con un tamaño de célula típico que mide 20-25 micrones. Además de conservar la sensibilidad a los estrógenos, las células MCF-7 también son sensibles a la citoqueratina, un tipo de proteínas fibrosas encargadas de formar los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células epiteliales. No son receptivas a ciertas proteínas específicas [32].

Las células MCF-7 son de tipo epitelial y crecen en monocapas. Cuando se cultiva *in vitro*, la línea celular es capaz de formar cúpulas y procesar estradiol, una hormona esteroidea sexual femenina, a través de receptores de estrógeno citoplasmáticos. El crecimiento se puede inhibir mediante el uso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y el tratamiento de las células cancerosas MCF-7 con antiestrógenos puede modular las proteínas del factor de crecimiento similar a la insulina, que en última instancia tienen efecto de reducción en el crecimiento celular. A pesar de su fácil propagación, las células MCF-7 generalmente son una población de crecimiento lento. El tiempo de duplicación de MCF-7 suele ser de 30 a 40 horas [32].

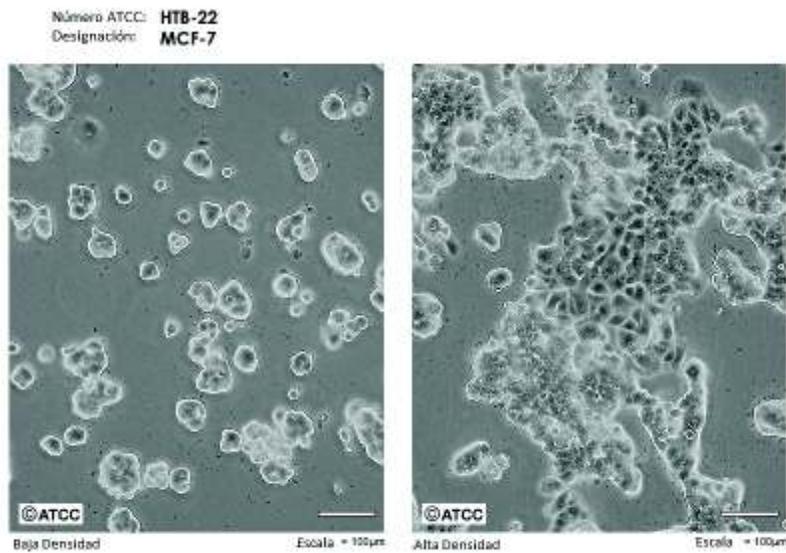


Figura 2.2: Cultivo de línea celular MCF-7 vista bajo microscopio. Imagen extraída de ATCC: <https://www.atcc.org/products/htb-22>

### 2.2.2. MDA-MB-231

Línea celular aislada por primera vez en 1973 de mujer caucásica, a partir de un derrame pleural. La línea celular MDA-MB-231 presenta un rápido crecimiento en medios de cultivo poco enriquecidos, esto debido en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Cuentan con gran cantidad de receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero no se sobreestiman con dicho factor [38].

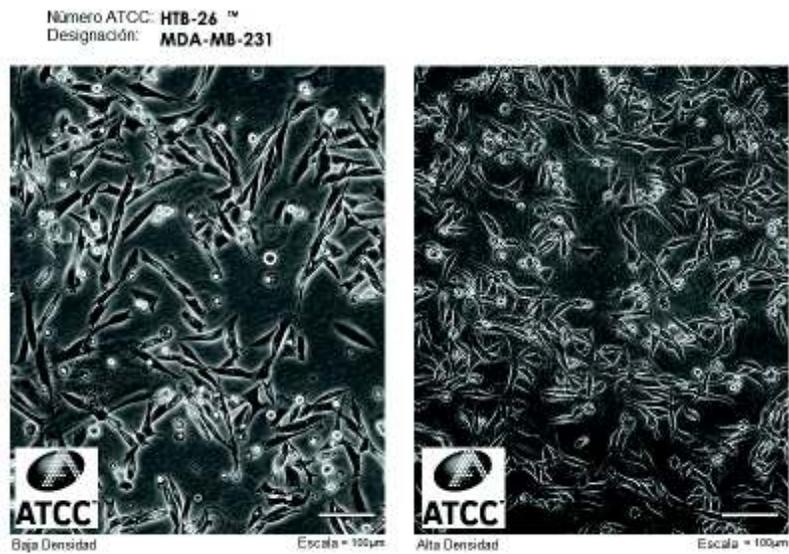


Figura 2.3: Cultivo de línea celular MDA-MB-231 vista bajo microscopio. Imágen extraída de ATCC: <https://www.atcc.org/products/htb-26>

### 2.2.3. ID014-T

Línea celular de cáncer de mama aislada por primera vez en el 2018 de una mujer mexicana de 40 años. Esta fue extraída de una muestra de carcinoma ductal invasivo. Esta línea presenta características de célula epitelial de origen luminal y de célula mesenquimal<sup>[39]</sup>.



Figura 2.4: Cultivo de línea celular ID014-T vista bajo microscopio invertido con magnificación 100x <sup>[39]</sup>.

#### 2.2.4. T-47D

Línea celular de cáncer de mama usada con frecuencia en investigación biomédica, la cual involucra la expresión hormonal de células de cáncer. Su morfología es del tipo epitelial. Fue establecida en 1979 en la Universidad de Tel Aviv, Israel, de una paciente femenina de origen caucásico con carcinoma ductal inoperable en el seno derecho [37]. Las células T-47D se diferencian de otras células de cáncer de mama humano en sus receptores de progesterona, ya que no están regulados por el estradiol, una hormona que abunda en las propias células.[33]

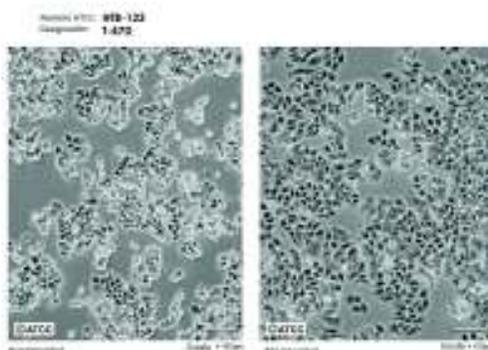


Figura 2.5: Cultivo de línea celular T-47D vista bajo microscopio. Imágen extraída de ATCC: <https://www.atcc.org/products/htb-133#detailed-product-images>

#### 2.2.5. MDA-MB-468

Línea celular extraída a partir de un derrame pleural en glándula mamaria y tejido de mama. Esta línea fue aislada en el año 1977 de una mujer afrodescendiente de 51 años de edad con adenocarcinoma metastásico de mama. Es una de las líneas celulares más comúnmente usadas en investigaciones pues ha demostrado ser útil en el estudio de la metástasis, migración y proliferación del cáncer de mama. También ha sido usada para probar tratamientos químicos contra el cáncer de mama [45].

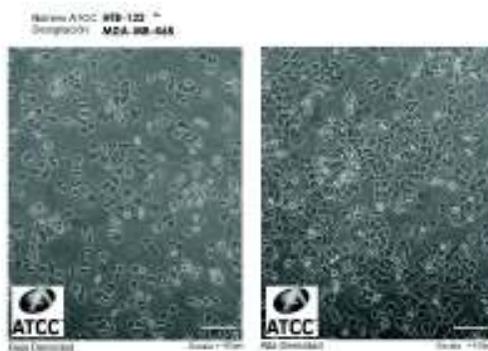


Figura 2.6: Cultivo de línea celular MDA-MB-468 vista bajo microscopio. Imágen extraída de ATCC: <https://www.atcc.org/products/htb-132#detailed-product-images>.

### 2.2.6. MCF-10A

La línea celular epitelial de mama humana MCF-10A es posiblemente el modelo de células de mama normal más comúnmente utilizado para estudiar la función y transformación normal de las células mamarias. Estas células se derivaron de tejido mamario proliferativo benigno, de origen étnico caucásico, y se inmortalizaron espontáneamente sin factores definidos. No son tumorigénicas y no expresan receptor de estrógenos.<sup>[34]</sup>

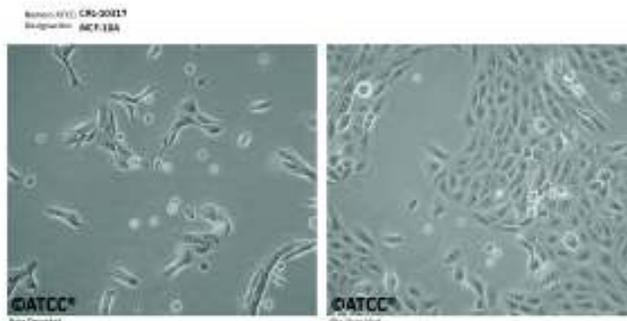


Figura 2.7: Cultivo de línea celular MCF-10A vista bajo microscopio. Imagen extraída de ATCC: <https://www.atcc.org/products/crl-10317#detailed-product-images>.

## 2.3. Efecto de la radiación gamma en distintas líneas celulares de cáncer de mama

La radiación ionizante se ha utilizado por muchos años como tratamiento del cáncer, fundamentando su uso en que las células cancerosas que proliferan con mayor rapidez son más sensibles a la radiación en comparación con las células sanas <sup>[36]</sup>. El principal efecto de la radiación ionizante en tejidos es la muerte directa de las células que lo componen, principalmente a causa del daño producido a su ADN, lo que produce la despoblación celular y, como consecuencia, deficiencia funcional. De manera indirecta, la irradiación de una célula puede producir radicales libres por la ionización o excitación del agua que la compone, y esto desencadena daño en su ADN, lo que termina en su mayoría en muerte celular.

Sin embargo, existe evidencia científica de que la radiación ionizante surte distintos efectos en cada línea celular dependiendo del origen étnico. Estos efectos se pueden observar mediante diversas técnicas de espectroscopía aplicada a las células de cáncer de mama gamma irradiadas.

En el capítulo 3 y 4 se presentarán a detalle los efectos de la radiación gamma en células de cáncer de mama de distinto origen étnico mediante espectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica (por sus siglas en inglés, AFM).

## Capítulo 3

# Teoría de la Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman (nombrada así por su inventor, el físico indio C. V. Raman) es una técnica de espectroscopía utilizada con mayor frecuencia en el área de la física y química, para determinar modos vibracionales de ciertas moléculas. Su principal función es obtener información de estructuras químicas de sustancias o materiales dado cierto patrón de dispersión característico de cada molécula, similar a lo que se conoce como huella dactilar en los humanos.

La espectroscopía Raman permite examinar muestras en sus distintos estados, ya sean sólidos, líquidos o vapores, a distintas temperaturas, como partículas microscópicas o como capas <sup>[11a]</sup>. A continuación se abordarán los principios de la espectroscopía Raman así como algunos modos específicos, entre otras características.

### 3.1. Principios de la espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es la principal técnica de dispersión causada por la interacción luz-materia y utilizada para identificación de moléculas en materiales o sistemas biológicos.

En este proceso se identifican dos tipos de dispersión. El primer tipo de dispersión, el más intenso, viene del fenómeno de dispersión de Rayleigh y éste ocurre cuando la nube de electrones excitada vuelve a un estado de relajación sin que ocurra movimiento en los núcleos de la molécula. Este es un tipo de dispersión principalmente elástica por lo que no se observan cambios de energía notorios. El segundo tipo es la dispersión Raman el cual es un evento poco común. La dispersión Raman ocurre cuando los fotones incidentes interactúan con los electrones de la molécula y esto hace que los núcleos comiencen a moverse al mismo tiempo. Sin embargo, ya que los núcleos son más pesados en comparación con los electrones es posible observar un cambio bastante notorio en la energía de la molécula, siendo este a una energía más alta o más baja, dependiendo del estado inicial de la molécula al darse el proceso.

### 3.1.1. Teoría básica

Sabemos que la radiación se caracteriza comúnmente por su longitud de onda ( $\lambda$ ). Sin embargo, en la espectroscopía es común utilizar la frecuencia ( $\nu$ ) o el número de onda ( $\varpi$ ) ya que estas magnitudes están relacionadas linealmente con la energía, lo que es importante puesto que estamos interesados en la interacción que hay entre la radiación y los estados de la molécula <sup>[11]</sup>. Las relaciones entre la energía y las magnitudes anteriormente mencionadas están dadas por:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}, \quad (3.1)$$

$$\nu = \frac{\Delta E}{h}, \quad (3.2)$$

$$\varpi = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}. \quad (3.3)$$

La técnica de espectroscopía Raman utiliza una luz láser monocromática como fuente de radiación la cual es dispersada por la muestra y, a partir de ello, se detecta una unidad vibracional de energía distinta al del haz incidente. En la dispersión Raman, la luz incidente interactúa con una molécula al polarizar la nube de electrones alrededor de sus núcleos para formar un estado virtual donde la energía de la luz es absorbida por la molécula pero sin permitir que los núcleos se muevan de manera apreciable <sup>[11]</sup>.

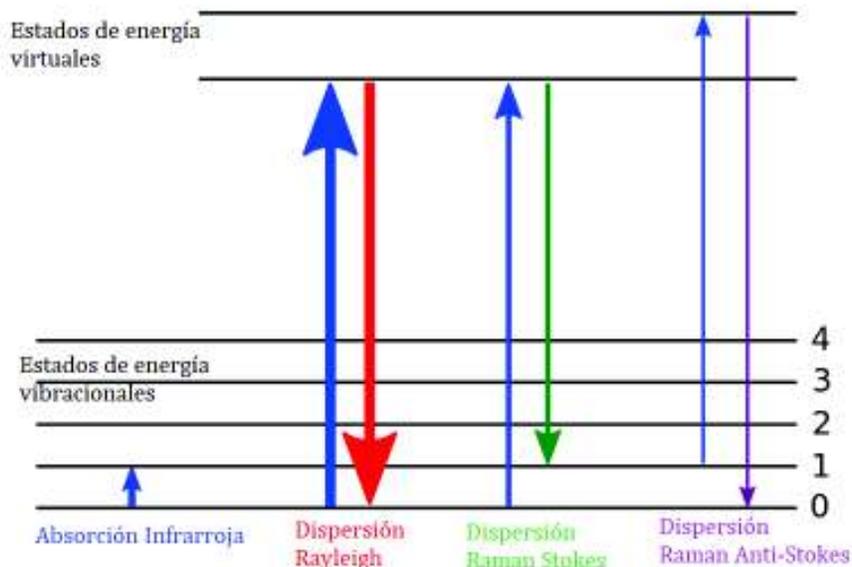


Figura 3.1: Diagrama de nivel de energía mostrando los estados implicados en la señal de Raman. Imagen creada por Moxfyre, based on work of User:Pavlina2.0 - vectorization of File:Raman energy levels.jpg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7845122>

Existen dos procesos de dispersión Raman característicos los cuales dependen del estado inicial de la molécula a estudiar. Cuando la molécula se encuentra inicialmente en el estado base, la dispersión se nombra **dispersión de Stokes**. En el caso en que la molécula se encuentra en un estado inicial excitado, la dispersión ocurrida recibe el nombre de **dispersión anti-Stokes**. En las siguientes secciones se abordarán ambos tipos de dispersión Raman con mayor profundidad <sup>[11]</sup>.

### 3.1.2. Raman Stokes

Se le llama dispersión de Stokes o Raman Stokes al proceso de dispersión Raman donde una molécula se encuentra inicialmente en estado base "m". Esto conduce a la absorción de energía por parte de la molécula lo que da paso a saltar a un estado excitado o de mayor energía "n"<sup>[11]</sup>.

Específicamente, al incidir un haz de fotones en una molécula la cual se encuentra en su estado de más baja energía (m), esta absorbe parte de la energía incidente por lo que salta a un estado excitado por una pequeña cantidad de tiempo (en algunos casos alrededor de nanosegundos, dependiendo de la muestra) y esto da paso a la emisión inmediata de fotones. Dado que parte de la energía del haz incidente ha sido absorbida por la molécula, el haz emitido tendrá una frecuencia menor a la inicial y la molécula permanecerá en un estado excitado (n), al contrario que en la dispersión de Rayleigh donde la molécula regresa a su estado inicial después de emitir la luz que incide sobre ella <sup>[11]</sup>.

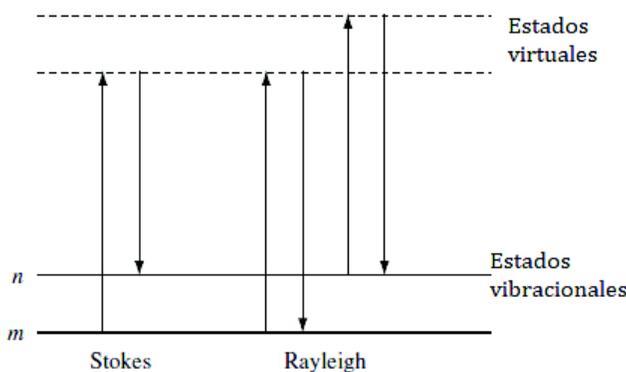


Figura 3.2: Diagrama de dispersión Rayleigh y Raman Stokes <sup>[11]</sup>.

La dispersión de Stokes puede observarse al obtener una curva de absorción-emisión de un haz de luz incidente. Dado que la muestra en este proceso absorbe parte de la energía del fotón, el fotón resultante es de menor frecuencia y se produce una línea de Stokes en el lado rojo del espectro incidente. En la imagen 3.4 se muestra un ejemplo de ello, donde luz incide en una muestra de Rodamina 6G y se genera un corrimiento de aproximadamente 25 nm <sup>[11]</sup>.

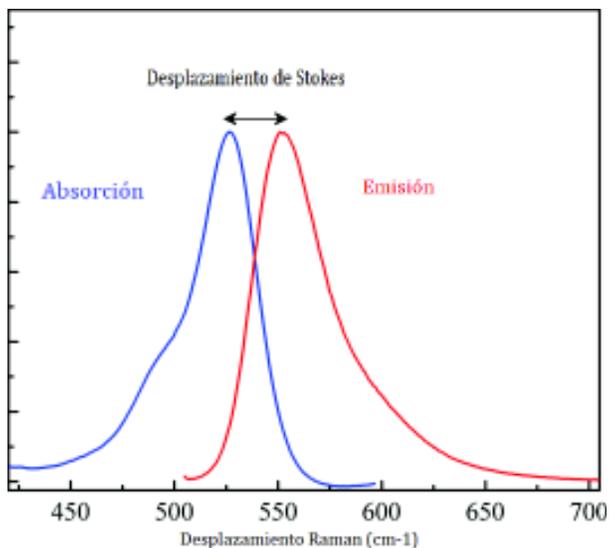


Figura 3.3: Espectros de absorción y emisión de la rhodamine 6G con un corrimiento de Stokes de aproximadamente 25 nm. Imagen creada por Sobarwiki - Trabajo propio, Dominio Público, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29474504>

### 3.1.3. Raman anti-Stokes

La dispersión Anti-Stokes es un tipo característico de dispersión Raman que se logra observar cuando un haz de fotones incide en una molécula que se encuentra inicialmente en un estado excitado  $n$  y que al momento de emitirse el haz, pasa a su estado base  $m$  <sup>[11]</sup>.

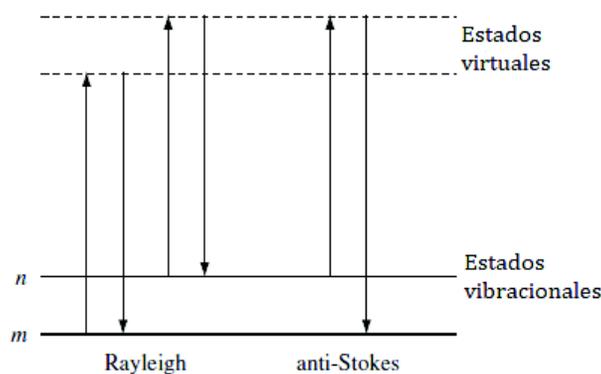


Figura 3.4: Diagrama de dispersión Rayleigh y Raman Anti-Stokes <sup>[11]</sup>.

Las moléculas pueden encontrarse en un estado excitado debido a la energía térmica que presenta el sistema o muestra. Al incidir el haz de luz en la muestra, la molécula transfiere parte de su energía al fotón dispersado, por lo que al ser emitido tendrá una frecuencia mayor a la que tenía antes de incidir y se producirá una línea Anti-Stokes en el lado azul del espectro <sup>[11]</sup>.

En comparación con la dispersión de Stokes, la dispersión Anti-Stokes es más débil y se debilita aún más conforme aumenta la frecuencia de los fotones emitidos, pues esto implica que en una muestra disminuirá la cantidad de moléculas que se encuentren en estados excitados inicialmente. Además, la dispersión Anti-Stokes aumenta en relación con la dispersión de Stokes conforme aumenta la temperatura del sistema <sup>[11]</sup>.

### 3.1.4. Relaciones entre Raman Stokes y anti-Stokes

Una de las principales comparaciones que podemos hacer entre la dispersión Stokes y Anti-Stokes es la siguiente: dado que la mayoría de las moléculas se encuentran en reposo y a temperatura ambiente antes de interactuar con un láser, quiere decir que también la mayoría estará en su estado base; por lo tanto, se espera que la mayoría de la dispersión Raman será del tipo Raman Stokes. Sin embargo, algunas moléculas estarán en un estado excitado, por lo que también se presentará la dispersión anti-Stokes. En ese sentido, podemos llegar a una relación de intensidades entre la dispersión Stokes y anti-Stokes para las moléculas en estado base y estado excitado. Esto con la finalidad de ir acorde con la ecuación de Boltzman que describe a continuación <sup>[11]</sup>.

$$\frac{N_n}{N_m} = \frac{g_n}{g_m} \exp \left[ \frac{-(E_n - E_m)}{kT} \right]. \quad (3.4)$$

$N_n$  es el número de moléculas que se encuentran en un estado excitado (n);  $N_m$  es el número de moléculas que se encuentran en estado base (m);  $g$  es la degeneración de los niveles n y m;  $(E_n - E_m)$  es la diferencia de energías que hay entre el estado n y m;  $k$  es la constante de Boltzmann ( $1,3807 \times 10^{-23} JK^{-1}$ ).

Gracias a las características que hay entre ambos tipos de dispersión, también es posible medir la temperatura de una muestra a partir de la diferencia en las líneas generadas por la dispersión Raman Stokes y anti-Stokes <sup>[11]</sup>.

## 3.2. Instrumento de la microscopía Raman

El equipo necesario para realizar caracterización por espectroscopía Raman consta de cuatro componentes principales los cuales son:

- Fuente de excitación
- Sistema de iluminación de la muestra y recolección óptica de la luz
- Sistema de selección de longitud de onda
- Detector

También se incluyen otros componentes, como la fibra óptica, el dispositivo de carga acoplada (CCD) y el Software <sup>[12]</sup>.

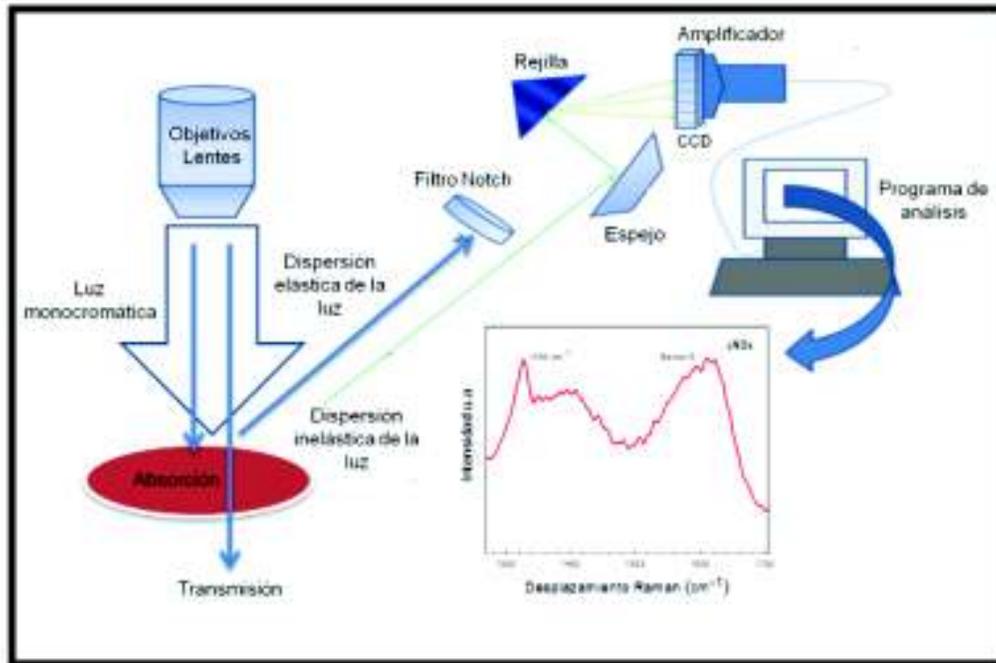


Figura 3.5: Esquema del proceso para la toma de espectros Raman. Gran parte de la luz se dispersa elásticamente, lo que significa que tiene la misma longitud de onda que la fuente de excitación. El filtro Notch es utilizado para eliminar la luz dispersada elásticamente y solo dejar pasar los fotones dispersados de forma inelástica o señales débiles de Raman (alrededor de 1/106 de los fotones dispersados) los cuales se detectan mediante una CCD.<sup>[55]</sup>

### 3.2.1. Fuentes de excitación

Los equipos para realizar espectroscopía Raman utilizan láseres como fuentes de excitación, la selección de estos depende de la muestra a analizar. En el cuadro 3.1 se muestran las fuentes que comúnmente se utilizan para los equipos de espectroscopía Raman.

Para seleccionar la fuente de excitación adecuada hay que tomar en cuenta el tipo de detector con el que se dispone, así como la posible fluorescencia y/o fotodescomposición que puede sufrir la muestra a analizar.

Fuente de Excitación	Longitud de Onda ( $\lambda$ )
Láser de Helio-Neón (He-Ne)	632.8 nm
Láser de Argón (Ar)	514.4 nm
Láser Semiconductor Infrarrojo (IR)	785 nm

Cuadro 3.1: Fuentes de excitación comunes para espectroscopía Raman y sus respectivas longitudes de onda <sup>[12]</sup>.

### 3.2.1.1. Fibra óptica

La fibra óptica es el medio por donde viaja la luz del láser desde la fuente de excitación y hacia la muestra. Comúnmente se utilizan con una longitud no mayor a 10 metros y con un diámetro de  $110 \mu\text{ m}$ .

Existen dos formas de hacer viajar la luz; una de ellas es guiar la luz del láser a la cabeza óptica del espectrómetro. La otra es recogiendo y transportando la luz del láser hacia el monocromador.

### 3.2.2. Sistema de iluminación de la muestra y recolección óptica de la luz

Dado que el microscopio utilizado en la microscopía Raman es similar a un microscopio óptico básico, su sistema de iluminación es similar. Comúnmente, el microscopio Raman cuenta con varios objetivos los cuales van desde 20x hasta 100x, donde el uso de cada objetivo depende del tamaño de la muestra a analizar. Los objetivos en la microscopía Raman ayuda en la recolección de la luz, ya que al pasar esta a través de un objetivo, se encuentra con un arreglo óptico de espejos lo cual conduce el haz hasta un filtro Notch, encargado de permitir únicamente el paso de la señal Raman (evitando posibles señales de dispersión de Rayleigh) <sup>[13]</sup>; Después, el haz filtrado pasa a través de una rejilla hasta llegar al CCD para ser interpretado por el software especializado. Esto último se explica con mayor detalle en las secciones siguientes.

### 3.2.3. Sistema de selección de longitud de onda

Existen diferentes tipos de mecanismos para seleccionar las longitudes de onda emitidas después de excitar una muestra; a estos mecanismos se les conoce como espectrómetro o espectrofotómetro.

Comúnmente se utilizan cámaras compuestas de varios espejos, prismas y filtros. En muchos equipos se utiliza un monocromador doble o triple con el fin de tener mayor resolución, sin embargo esto puede causar disminución en la intensidad de luz dispersada, lo que provoca que sea difícil distinguir los picos del espectro. Estos tipos de arreglos ópticos quedan limitados a fuentes policromáticas. Por lo anterior, es preferente el uso de láser monocromático <sup>[13]</sup>.

### 3.2.4. Sistema de detección

Un dispositivo de carga acoplada (CCD por sus siglas en inglés), es un circuito integrado que contiene una cantidad determinada de condensadores acoplados. Su principal funcionamiento es como sensor, ya que muchos CCD cuentan con pequeñas células fotoeléctricas las cuales detectan la luz incidente en ellas <sup>[14]</sup>.

En los equipos de espectroscopía Raman es usual encontrar como detector un dispositivo de carga acoplada, mejor conocido como CCD. El más usado para este tipo de espectroscopía es el bidimensional multicanal ya que presenta alta eficiencia cuántica, muy bajo nivel de ruido térmico, así como bajo nivel de ruido de lectura.

### 3.2.4.1. Software

El software es la última fase que se presenta en el sistema de medición y es necesario para la interpretación de los datos recopilados por el CCD. A través del software se puede visualizar el patrón espectral obtenido<sup>[12]</sup>.

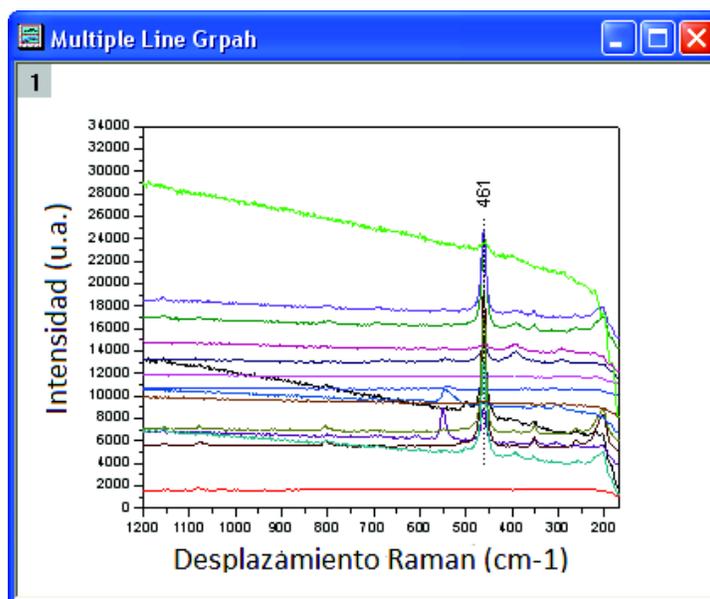


Figura 3.6: Espectroscopía micro-Raman de sistemas minerales nanoestructurados complejos. Imagen extraída de <https://www.originlab.com/doc/Tutorials/Customize-MutliLines-Graph>

Existe una gran variedad de programas que ayudan a observar e identificar bandas en los modos vibracionales, líneas espectrales, transformadas de Fourier, etc. <sup>[12]</sup> Algunos de los más utilizados son LabSpec, SpectraPro, OriginLab, entre otros. En la actualidad, muchos equipos integrados para microespectroscopía Raman cuentan con su propio software de interpretación. En la figura 3.6 se puede observar un ejemplo del espectro analizado e interpretado por el Software OriginLab de sistemas minerales nanoestructurados complejos.

### 3.2.5. Microscopía Raman confocal

Se le llama Microscopía Raman confocal al método de espectroscopía que permite analizar muestras a distintas profundidades sin necesidad de realizar cortes transversales, y con resolución espacial del orden de micrómetros <sup>[58]</sup>.

Este tipo de microscopía basa su funcionamiento de la siguiente manera: Luz monocromática incide en una zona determinada de la muestra y se procede a focalizar la señal Raman dispersada hacia una pequeña apertura confocal, la cual actúa como un filtro espacial. Lo que permite la entrada de la señal proveniente de la zona de interés únicamente, eliminando la señal proveniente de otros puntos. La señal recogida es dispersada en un CCD el cual producirá el espectro.



### 3.3.4. Raman en biología y medicina

Una de las aplicaciones de la espectroscopía Raman en la medicina ha sido como técnica no invasiva para caracterización bioquímica en tiempo real de heridas y su cicatrización gracias al análisis multivariado de espectros Raman [15].

Existe una técnica de espectroscopía Raman con compensación espacial (mejor conocida como SORS, por sus siglas en inglés) que permite estudiar tejido biológico de forma no invasiva, pues ésta es menos sensible a capas superficiales en comparación con la técnica convencional de Raman [15].

La espectroscopía Raman ha permitido el análisis de algunas proteínas y cadenas de ADN, así como el estudio de sus funciones biológicas [15].

En la actualidad existe gran variedad de investigaciones acerca de la caracterización de células de cáncer por medio de espectroscopía Raman y existe evidencia científica que permite diferenciar células de cáncer de distinto origen étnico. Esta parte se abordará más a profundidad en las siguientes secciones.

### 3.3.5. Raman en nanotecnología

En nanotecnología, la microscopía Raman permite analizar nanofibras para comprender mejor sus estructuras, y el modo de respiración radial de los nanotubos de carbono se usa comúnmente para evaluar su diámetro.

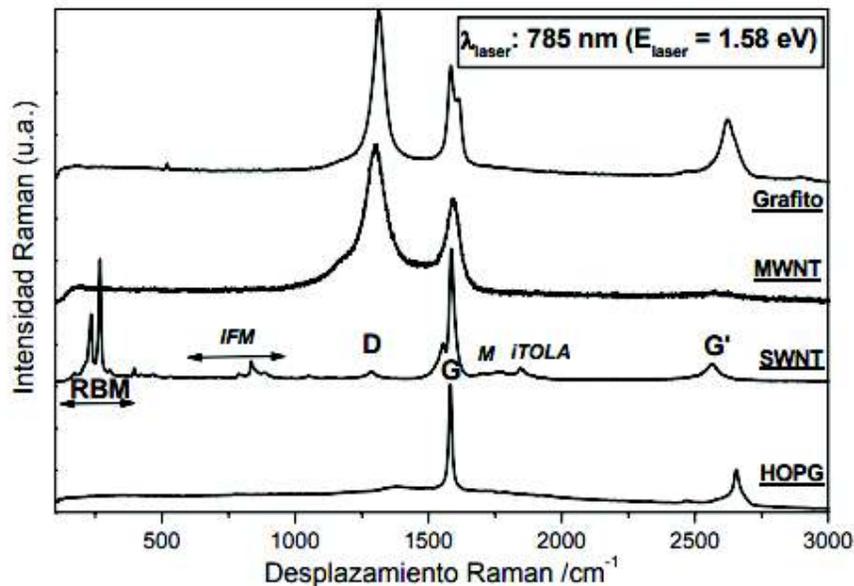


Figura 3.8: Espectro Raman de nanotubos de carbono de pared única (SWNT) y de pared múltiple (MWNT), comparados con espectros de grafito HOPG ("Highly Oriented Pyrolytic") y de grafito policristalino [17].

### 3.4. Microscopía Raman en sistemas biológicos

La microscopía Raman permite medir espectros Raman *in vivo* de regiones microscópicas en muestras biológicas como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, células y órganos, e incluso permite la detección e identificación de microorganismos tanto en una muestra aislada como en un sujeto. Los espectros Raman nos brindan un patrón espectral característico para cada línea celular, brindándonos información de procesos bioquímicos a nivel celular, observándose variaciones en los picos Raman asociados a proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos de los sistemas biológicos [16].

En ese sentido, los cambios conformacionales pueden ser observados como una variación en la forma, desplazamiento, intensidad e interrelación entre bandas espectrales, así como la ausencia de alguna de éstas.

Existen diversas técnicas para la obtención del espectro Raman de muestras biológicas y el uso de cada una de ellas es más conveniente según el tipo de muestra que se desea analizar. La técnica más utilizada es la dispersión Raman coherente (CRS, por sus siglas en inglés), la cual se utiliza para obtener imagen celular, imagen de tejido biológico, así como para detección de cáncer y para aplicaciones farmacéuticas. Una de sus principales ventajas es su alta sensibilidad y permite tomar imágenes 3D de las muestras [18].

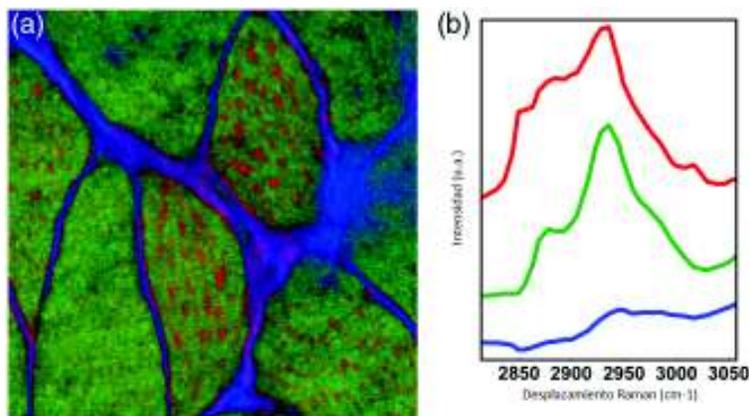


Figura 3.9: Ejemplo de imagen CRS-SRL hiperespectral de tejido muscular de ratón [19].

### 3.5. Microscopía Raman en células de cáncer de mama gamma irradiadas

Actualmente, la espectroscopía Raman ha sido de gran utilidad como una herramienta de alta sensibilidad, no invasiva y libre de marcaje para la caracterización bioquímica de células normales y cancerígenas, así como células vivas y muertas. Específicamente si se refiere a células de cáncer de mama, esta técnica espectroscópica permite notar las variaciones que puedan presentar en su estructura antes y después de que el huésped pase por una radioterapia, es decir, que se les aplique radiación ionizante.

Existe una gran diversidad de estudios donde se muestra caracterización por espectroscopía Raman de las líneas celulares MCF-7 MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-10A, ID014-T y T-47D. Según la literatura se han detectado 12 picos similares correspondientes a las huellas dactilares de las líneas de cáncer de mama antes mencionadas, los cuales se relacionan principalmente a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos <sup>[43]</sup>. En la literatura la Amida I se asocia a la progresión del cáncer, la Amida III es un indicador del comportamiento canceroso en el cáncer de mama y los lípidos se relacionan a la invasividad del cáncer. Entre mayor presencia de lípidos hay en la célula el cáncer es más agresivo <sup>[43]</sup>. En el cuadro 3.2 se muestran los componentes asociados a cada pico del espectro.

A continuación se muestra el espectro Raman de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 MDA-MB-231, MCF-10A antes y después de ser irradiadas, así como se presenta una breve comparación entre sus componentes y los efectos de la radiación sobre ellas.

Es importante mencionar que no se encontró evidencia sobre patrones espectrales Raman de las líneas MDA-MB-468, ID014-T y T-47D al ser sometidas a radiación, por lo que nos abre un gran área para futuras investigaciones.

Desplazamiento Raman ( $cm^{-1}$ )	Asignación de Pico	Componente
787	Bases de Citosina	Ácido Nucléico (Nucleobases)
941	Polisacáridos	Carbohidratos
1007	Anillo Aromático C-C	Proteína
1250	Estiramiento C-N	Proteína (Amida III)
1344	Bases de Adenina	Ácido Nucléico (Nucleobases)
1453	Modo Estructural	Proteína
1583	Flexión C=C	Proteína
1614	Estiramiento C=C	Proteína (Tirosina)
1667	Estiramiento -C=O-	Proteína (Amida I)
2938	Estiramiento C-H	Lípido/Proteína
3066	Estiramiento C-H	Lípido
3296	Estiramiento N-H	Proteína (Amida A)

Cuadro 3.2: Composición de la huella dactilar de las líneas celulares de cáncer de mama con su correspondiente grupo funcional o moléculas <sup>[43]</sup>.

### 3.5.1. Espectroscopía Raman de diversas líneas celulares

El espectro Raman combinado con un análisis de sus principales componentes (PC) permiten separar las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A en función de su contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos<sup>[42]</sup>. En la figura 3.10 podemos observar los PC de ambas líneas celulares, antes de ser expuestas a radiación ionizante.

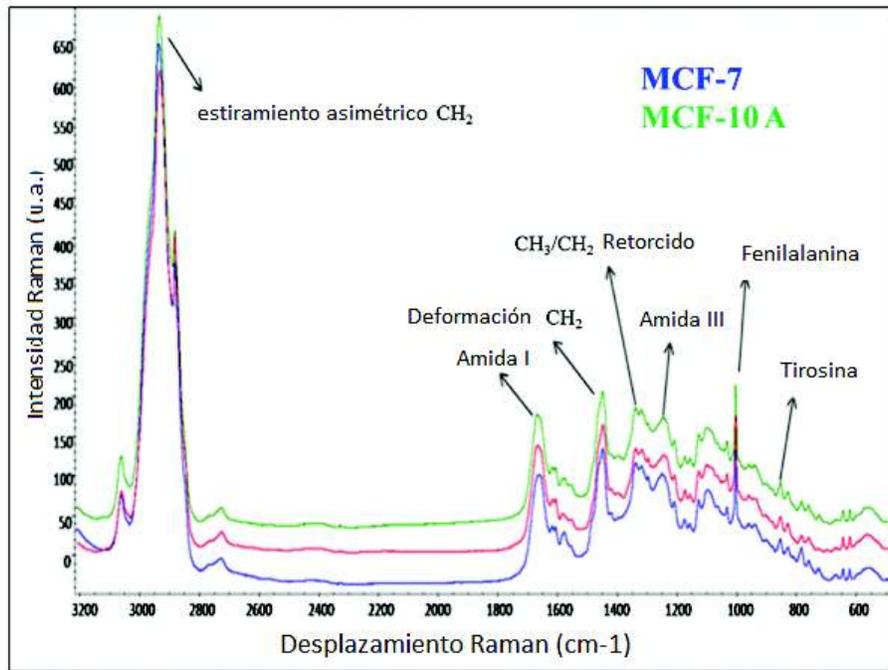


Figura 3.10: Espectros Raman de línea celular normal (MCF-10A) y dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB 436 y MCF-7). Se muestra información espectral sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que las componen.<sup>[42]</sup>

En el análisis que se realiza en el artículo anteriormente citado se muestra que la línea celular MCF-7 parece contener mayor cantidad de lípidos y mayor concentración de ácidos nucleicos en comparación con la MCF-10A.

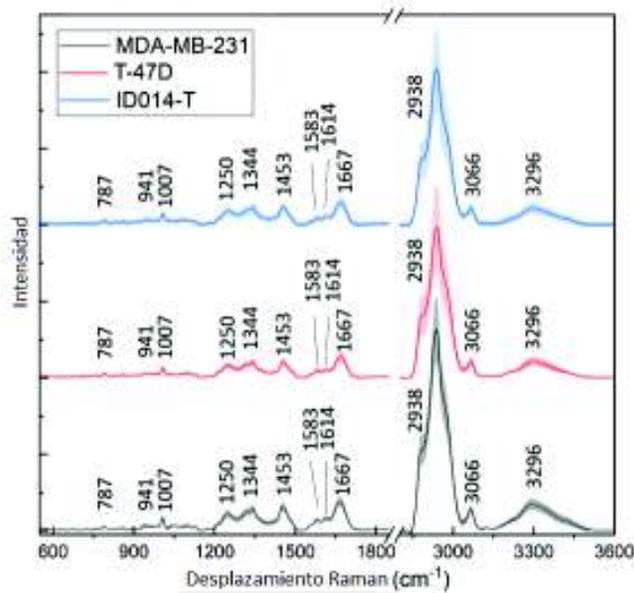


Figura 3.11: Espectros Raman de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, T-47D e ID014-T donde se muestra el valor de los picos característicos <sup>[43]</sup>.

Para las líneas celulares MDA-MB-231, T-47D e ID014-T, los espectros Raman son los mostrados en la figura 3.11. Es posible observar que los picos correspondientes a los PC son similares para todas las líneas celulares. Sin embargo, comparando las figuras 3.10 y 3.11 es posible notar que la línea celular MDA-MB-231 tiene mayor concentración de PC en comparación con las demás. Esto se observa también en la figura 3.12.

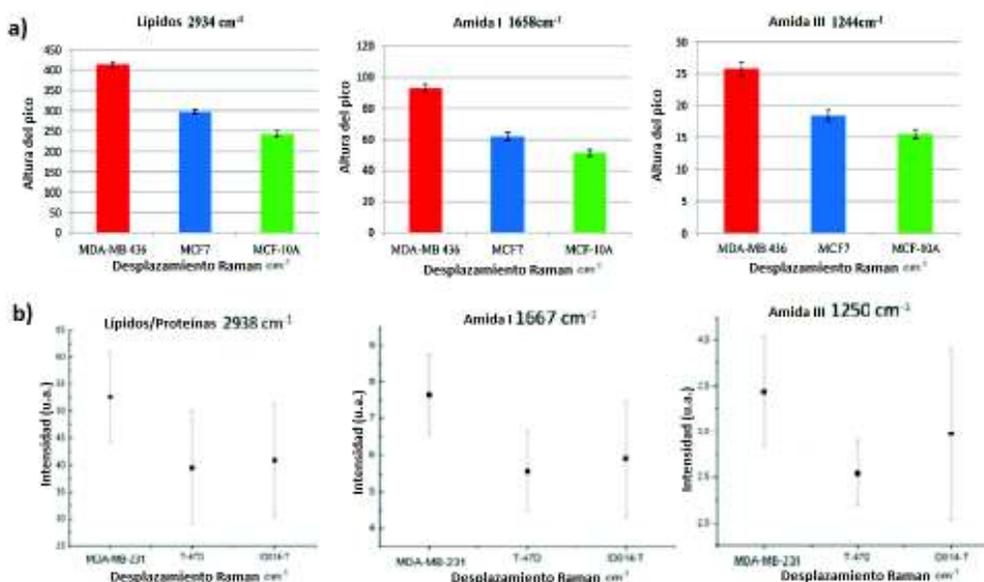


Figura 3.12: Análisis de altura de los picos correspondientes a lípidos, Amida I y Amida III para las líneas celulares a) MCF-10A, MCF-7 [42] y b) MDA-MB-231, T-47D e ID014-T[43]. En el pico a 2934 cm<sup>-1</sup> asociado a lípidos se puede observar una tendencia donde la línea MDA-MB-436 presenta mayor intensidad seguida de las líneas MCF-7 y MCF-10A. En los picos de 1658 cm<sup>-1</sup> y 1244 cm<sup>-1</sup> asociados a Amida I y Amida III respectivamente se puede observar la misma tendencia que en lípidos para cada línea celular.

Una comparación más se puede realizar con la línea celular MDA-MB-468, donde su espectro Raman (figura 3.13) muestra nuevamente que tiene los mismos PC que la línea celular MCF-10A, sin embargo presenta mayor concentración de lípidos [44].

Esto nos muestra que incluso antes de ser irradiadas, las líneas celulares presentan diferentes concentraciones en sus PC aún siendo del mismo origen étnico (caucásico) lo que nos podría indicar que presentan distinta radiosensibilidad tanto las de origen caucásico como las de origen mexicano y afrodescendiente. Sin embargo, no hay que afirmar esto último sin hacer el análisis correspondiente.

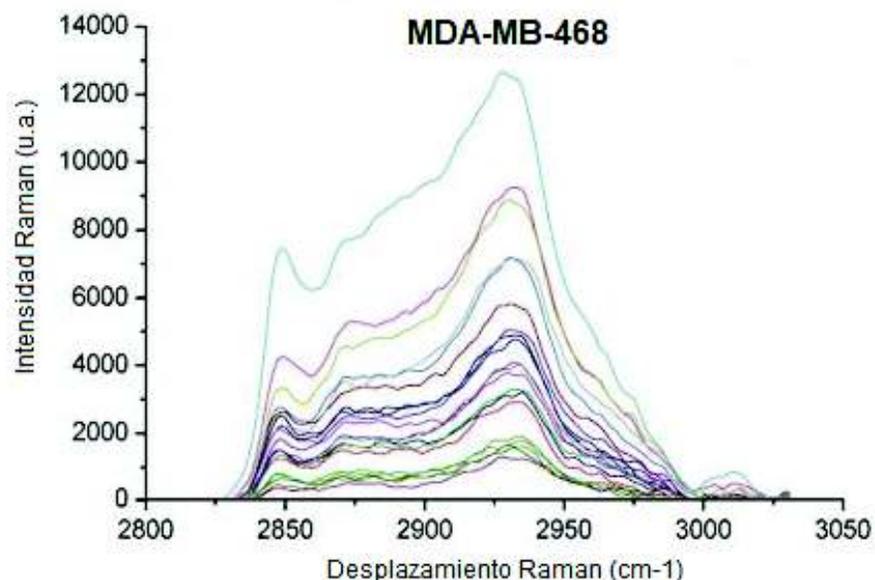


Figura 3.13: Espectro Raman de la línea celular MDA-MB-468 donde se muestran el rango asociado a lípidos <sup>[44]</sup>.

### 3.5.2. Espectroscopía Raman de líneas celulares de cáncer de mama irradiadas

#### 3.5.2.1. MCF-10A

Fue posible localizar en la literatura científica el análisis por espectroscopía Raman de la línea celular MCF-10A después de ser irradiada por un haz de protones de 62 MeV (mega electronvolts) con dosis de 0.5, 2 y 4 Gy. El análisis se realizó pasando las 24, 48 y 72 horas después de la irradiación <sup>[48]</sup>.

Inicialmente se muestra el espectro Raman de la línea MCF-10A antes de ser irradiada, enfocando el láser de excitación en el núcleo y el nucleolo de la célula. Como se observa en la figura 3.14 los picos son los mismos que se mencionaron anteriormente y están relacionados con los PC de la célula <sup>[48]</sup>. La diferencia que hay en este caso es que se encuentra mayor concentración de PC en el nucleolo que en el nucleoplasma. Después se muestran los espectros Raman de la línea celular después de las 24 horas (figura 3.15) y 48 horas (figura 3.16) de haber sido irradiada con diferentes dosis de radiación. Tal como se aprecia, los picos asociados al ADN/ARN ( $784\text{cm}^{-1}$ ) se ven reducidos, lo que se relaciona con el daño causado en este PC por efecto de la radiación <sup>[48]</sup>.

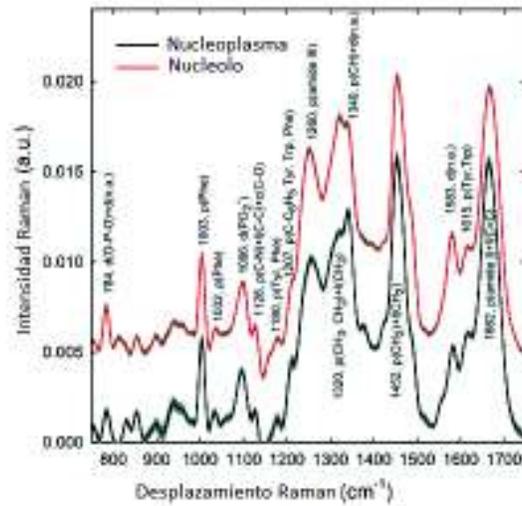


Figura 3.14: Espectros Raman promedio de la línea celular MCF-10A antes de ser irradiada. Los espectros se han medido enfocando el láser por encima de los dominios del nucleolo (línea roja) y del nucleoplasma (línea oscura)<sup>[48]</sup>.

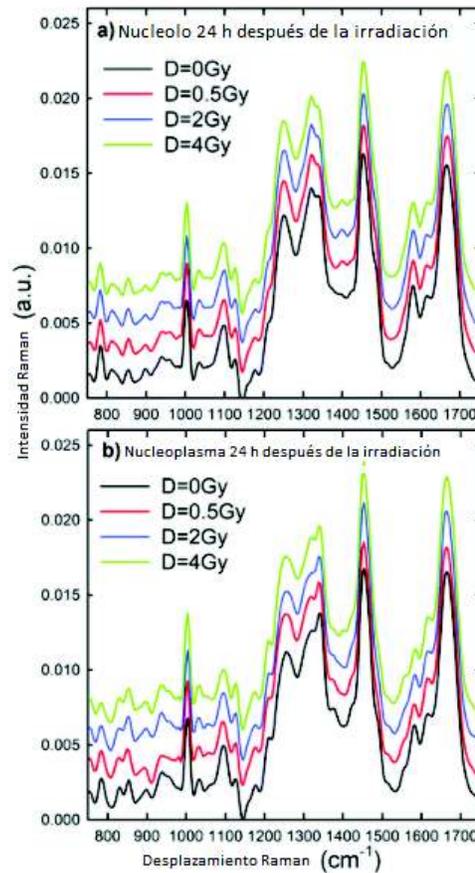


Figura 3.15: Espectros Raman promedio de la línea celular MCF-10A después de las 24 horas de ser irradiada por dosis de 0 Gy (línea negra), 0.5 Gy (línea roja), 2 Gy (línea azul) y 4 Gy (línea verde)<sup>[48]</sup>.

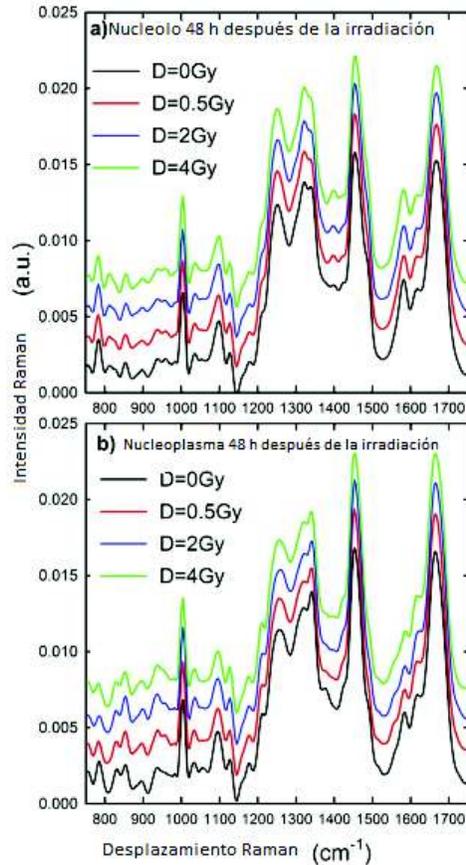


Figura 3.16: Espectros Raman promedio de la línea celular MCF-10A después de las 48 horas de ser irradiada por dosis de 0 Gy (línea negra), 0.5 Gy (línea roja), 2 Gy (línea azul) y 4 Gy (línea verde) [48].

En particular, los espectros Raman presentados muestran que el daño inducido por radiación que recibe el ADN/ARN aumenta conforme aumenta el tiempo de reparación de la célula de 24 a 48 horas. Esto quiere decir que la célula es incapaz de reparar los enlaces rotos de ADN/ARN e iniciar una vía de muerte necrótica [48].

### 3.5.2.2. MCF-7 y MDA-MB-231

Se encontró en la literatura el espectro Raman de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después de ser irradiadas con dosis clínicas de radiación ionizante por un haz de fotones con una tasa de dosis de 6 Gy/min, y a las cuales se les administraron fracciones simples de 0, 2, 4, 6, 8, 10 (bajas dosis de radiación - LDR), 30 o 50 Gy (altas dosis de radiación - HDR). Las muestras irradiadas fueron recolectadas después de las 18, 42 y 66 horas después de la irradiación [46].

Iniciando con la línea MDA-MB-231, su espectro Raman identifica un aumento de proteína inducido por radiación en relación con las características espectrales de ácidos nucleicos y lípidos después de ser expuesta a dosis bajas de radiación, específicamente de 6 Gy a las 66 horas después de la irradiación (figura 3.17) [46].

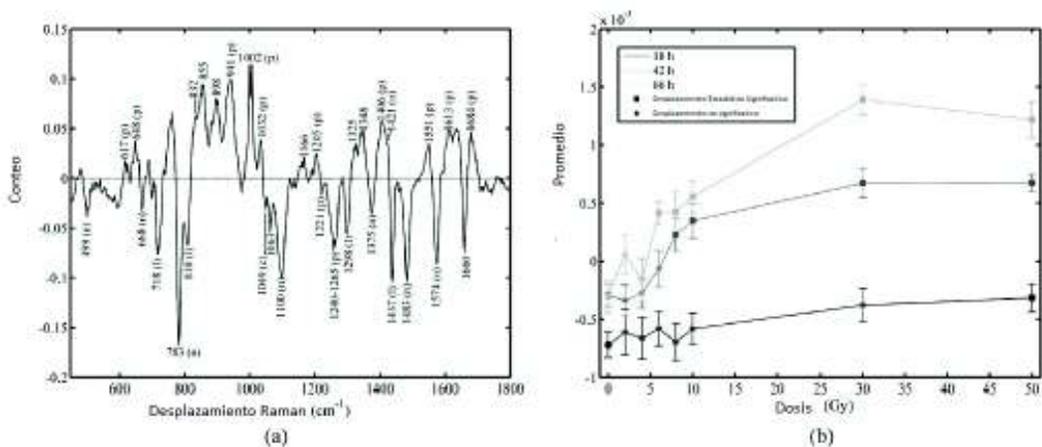


Figura 3.17: Espectro Raman de la línea celular MDA-MB-231. PC inducidos por radiación (a) y gráfico de puntuación (b) para el conjunto de datos de dosis alta. Las principales características positivas se deben a las proteínas, mientras que las principales características negativas se originan en los ácidos nucleicos y los lípidos. El gráfico de puntuación indica un cambio estadísticamente significativo hacia puntuaciones de PC medias positivas para las poblaciones expuestas a dosis tan bajas como 6 Gy. Abreviaturas: c: carbohidrato, l: lípido, n: ácido nucleico, p: proteína [46].

Al irradiar esta misma línea celular con dosis más altas (30 - 50 Gy) y ser analizada después de 72 horas de la irradiación, se observa en ella cambios inducidos por radiación en su estructura bioquímica de manera dramática, demostrando incremento en las concentraciones de proteínas (fenilalanina, tirosina y triptofano) y en las estructuras de proteínas de hélice  $\alpha$ , así como un decremento en concentraciones de estructuras de proteínas de lámina  $\beta$  y de espiral aleatoria (estas tres últimas son estructuras secundarias que adoptan las proteínas), en comparación con la línea celular no irradiada [47]. Estos cambios corroboran que la síntesis y degradación de proteínas estructuradas están correlacionadas con una mayor supervivencia post-irradiación y juega un rol muy importante en la respuesta celular radioadaptativa.

En cambio para la línea MCF-7, el espectro Raman identifica un aumento inducido por radiación en las características espectrales al glucógeno (polisacárido de reserva energética) en células expuestas a dosis tan bajas como 2 Gy al ser analizadas después de 44 y 66 horas de la irradiación [46]. De igual manera ocurre al exponer la línea celular a dosis altas de radiación, pues se muestra este mismo incremento en la concentración de glucógeno. En la figura 3.18 puede observarse que no hay gran diferencia en el espectro Raman de la línea celular irradiada con dosis bajas en comparación a cuando es irradiada con dosis altas de radiación.

El aumento en la concentración de glucógeno puede indicar que se ha activado la vía de señalización fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/AKT) la cual es un importante contribuyente a la radioresistencia de una célula pues tiene gran importancia en aspectos de crecimiento y supervivencia celular. Se cree que ciertas citocinas (proteínas) al ser inducidas por la vía AKT, protegen la célula contra la apoptosis (muerte celular programada) por radiación a través de la regulación de proteínas mitocondriales, factores de transcripción, maquinaria de traducción y progresión del ciclo celular [46].

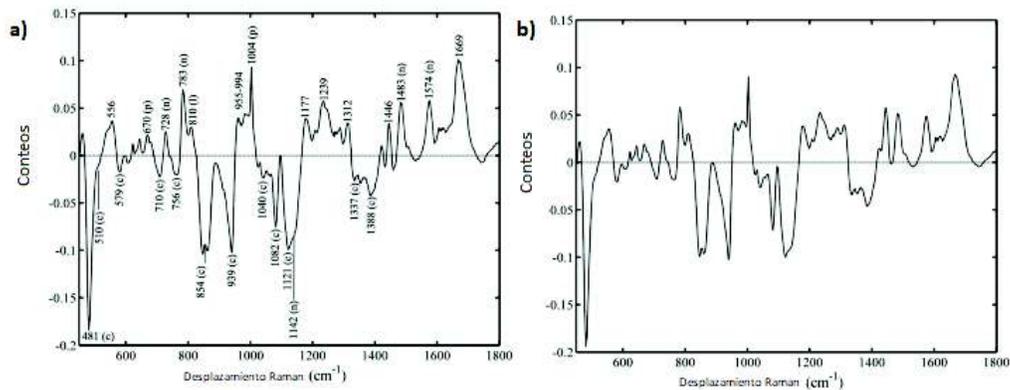


Figura 3.18: Espectro Raman de PC de la línea celular MCF-7 después de ser irradiada a) con bajas dosis, b) con altas dosis. Se puede observar que en ambos espectros hay un aumento en las características espectrales de glucógeno inducido por radiación [46].

Otra de las características más importantes que se muestra en los espectros de ambas líneas celulares después de ser irradiadas es el aumento en la intensidad de la banda a  $718\text{ cm}^{-1}$  relacionado a fosfolípidos de membrana, la cual se atribuye a la presencia de vesículas en la membrana celular. Las vesículas se producen por la dislocación de los fosfolípidos de plasma membrana y citoesqueleto como parte del mecanismo activado por la radiación [46]. En otras palabras, lo anterior se refiere a un daño por radiación causado en la membrana celular.

En la figura 3.19 puede observarse una comparación entre los espectros Raman de ambas líneas celulares antes de ser irradiadas. En el apartado b) se observa el porcentaje de la varianza asociado a los PC. Sin embargo, al observar la figura 3.20, se puede ver claramente que las varianzas se reducen drásticamente después de ser irradiadas con altas dosis de radiación [46].

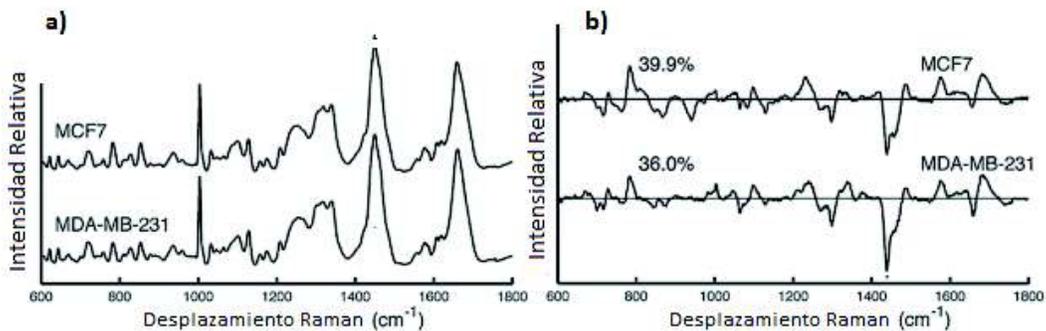


Figura 3.19: Espectro Raman de líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 antes de ser irradiadas. El porcentaje en b) equivale a la varianza de sus PC [47].

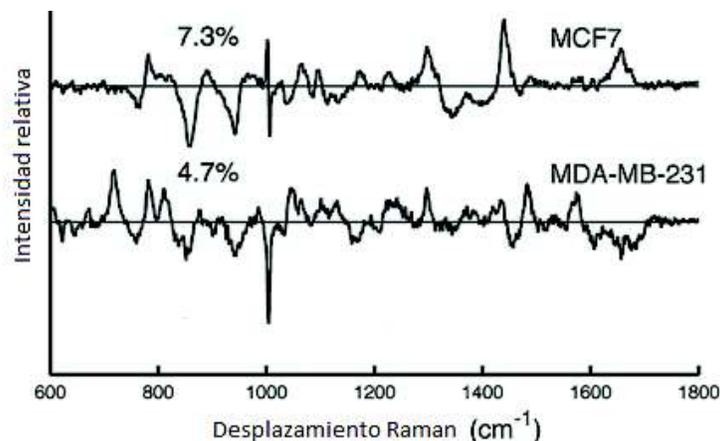


Figura 3.20: Espectro Raman de líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 después de ser irradiadas con dosis altas de radiación. El porcentaje equivale a la varianza de sus PC [47].

También se presenta como el estado del gen p53 influncia la respuesta de la línea celular a la radiación. Este gen mejor conocido como proteína supresora de tumores, es el encargado de detener el ciclo celular, activar enzimas de reparación del ADN, iniciar el proceso de senescencia y activar la apoptosis [48]. Presenta dos estados comunes los cuales son wild type (wt) que es la forma común en la que se expresa un gen, y mutant-type (mt) que es la manera atípica de expresarse. En el caso de la línea MDA-MB-231 se trata de un mt y la línea MCF-7 es un wt. En células tumorales de mamíferos el estado mt del gen p53 se asocia a una mayor resistencia a la radiación. En cambio, existe evidencia que muestra que es necesario el estado wt para el inicio de la detención del ciclo celular y muerte celular inducidas por radiación [46].

De la información obtenida por el espectro Raman de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 fueron propuestos dos posibles mecanismos de respuesta bioquímica a la radiación. El primer mecanismo es la síntesis regulada y la degradación de proteínas estructuradas y el segundo mecanismo es la expresión de factores anti apoptosis y otras señales de supervivencia [47].

Entre la literatura analizada se puede concluir que hay diferencias notables en la intensidad de los picos obtenidos por espectroscopía Raman asociados a lípidos y amidas de líneas celulares de cáncer de mama provenientes de distinto origen étnico y el control normal (MCF-10A). La evidencia recopilada muestra la similitud que hay entre ellas respecto a principales componentes como lípidos, amidas, polisacáridos, ácidos nucleicos, etc. Sin embargo, existe diferencia en las concentraciones de cada uno de ellos: para células cancerosas la intensidad de los picos relacionados a lípidos y amidas I y III es mayor que la intensidad de los picos en una célula de mama saludable. Esto se puede asociar al hecho de que en general, las células de cáncer presentan un metabolismo alterado lo que se relaciona con una mayor recaptación de energía y por consiguiente, aumento en los componentes vitales de la célula [52].

Respecto a las características espectrales asociadas a los diferentes orígenes étnicos de cada línea celular se puede destacar que todas ellas presentan diferencias en las intensidades de los picos relacionados a sus principales componentes, específicamente lípidos y amidas.

En orden ascendente, la intensidad de los picos obtenidos del espectro Raman asociados a lípidos ( $2934-2938\text{ cm}^{-1}$ ) se presenta a continuación:

1. MDA-MB-468 (afrodescendiente)
2. MDA-MB-231 (caucásico)
3. ID014-T (mexicano)
4. T-47D (caucásico)
5. MCF-7 (caucásico)
6. MCF-10A (caucásico)

Respecto a la intensidad de los picos Raman asociados a amida I ( $1658-1657\text{ cm}^{-1}$ ), el orden es el siguiente:

1. MDA-MB-231 (caucásico)
2. MCF-7 (caucásico)
3. ID014-T (mexicano)
4. T-47D (caucásico)
5. MCF-10A (caucásico)

Por último, la intensidad de los picos Raman asociados a amida II ( $1244-1250\text{ cm}^{-1}$ ) presentan el siguiente orden:

1. MDA-MB-231 (caucásico)
2. ID014-T (mexicano)
3. T-47D (caucásico)
4. MCF-7 (caucásico)
5. MCF-10A (caucásico)

No se encontró información de la intensidad de los picos asociados a amida I y III de la línea MDA-MB-468. Tampoco se encontró evidencia respecto a la radiosensibilidad y radioresistencia de las líneas celulares ID014-T, T-47D, MDA-MB-468.

## Capítulo 4

# Teoría de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es una técnica que permite la obtención de imágenes topográficas y propiedades físicas por medio de la interacción de fuerzas entre la punta muy delgada de una sonda mecánica y la superficie de la muestra analizada [20]. Permite trabajar en aire, líquido y en vacío. En la actualidad existen varias técnicas o modos de sondeo que permiten analizar muestras blandas o inestables en el vacío como las de origen biológico y orgánico, así como muestras duras como las inorgánicas minerales, industriales, entre otras. Estos modos en conjunto con el pequeño diámetro que pueden llegar a tener las puntas permite alcanzar resolución de hasta  $10^{-10}$  m, permitiendo visualizar átomos. Además, el AFM hace posible la medición de distintas propiedades físicas tales como la fuerza de adhesión, rugosidad y elasticidad de una muestra [20].

### 4.1. Instrumentación y principios físicos del AFM

El AFM viene compuesto de un cantilever con una punta al final, un diodo láser, un fotodiodo o detector, y un tubo piezoeléctrico.

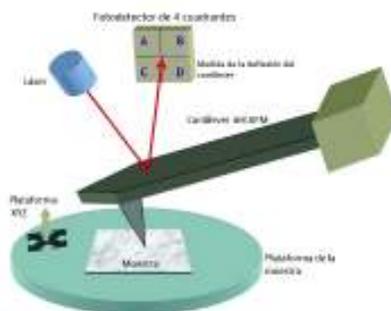


Figura 4.1: Diagrama de un microscopio de fuerza atómica. Imagen creada por yashvant para The Opensource Handbook of Nanoscience and Nanotechnology: <https://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology/AFM#/media/File:AFMsetup.jpg>

### 4.1.1. Micropalanca

El cantilever, también conocido como micropalanca, cuenta con una punta muy afilada en uno de sus extremos; esta punta sirve para escanear la superficie de la muestra ya sea dando pequeños toques o arrastrándose sobre ella, está sujeta de una base que se mueve en las direcciones X-Y-Z.

Dadas las dimensiones con las que cuenta la punta, las fuerzas de atracción de corto alcance que hay entre la superficie de la muestra y la punta provocan que la micropalanca se curve o flexione hacia la superficie a lo largo de su longitud. Pero, dado que la punta continúa acercándose a la superficie hasta llegar a "tocarla", se puede observar un aumento en las fuerzas de repulsión que provocan una inversión en la curvatura de la micropalanca contra la superficie <sup>[20]</sup>.

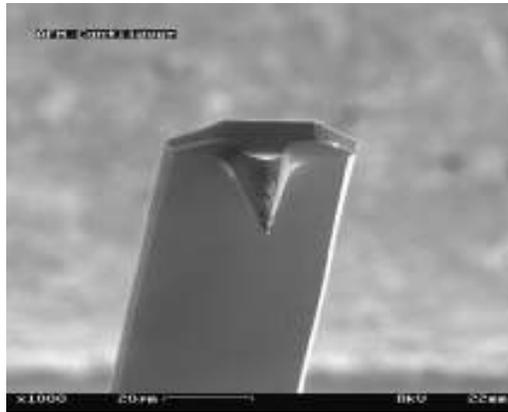


Figura 4.2: Ampliación a 1000x de una palanca usada de AFM. Imagen creada por MaterialsScientis, trabajo propio: [https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic\\_force\\_microscopy#/media/File:AFM\(used\)\\_cantilever\\_in\\_scanning\\_electron\\_microscope\\_magnification\\_1000x.JPG](https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscopy#/media/File:AFM(used)_cantilever_in_scanning_electron_microscope_magnification_1000x.JPG)

La micropalanca puede ser fabricada de distintos materiales, entre ellos, los más comunes son nitruro de silicio, dióxido de silicio y silicio. El largo suele ser de 100 y 200  $\mu\text{m}$  aproximadamente. El grosor de la punta define en gran medida la resolución del método. Mientras más delgada es hay mayor resolución de imagen, mayor precisión y exactitud en la medición de fuerzas. Las puntas estándares rondan entre los 7 y 20 nm, mientras que las super afiladas de alta resolución pueden ser hasta de 1 nm o un poco menos. La forma de la micropalanca puede ser en forma triangular o de viga, mientras que la punta puede tener forma de espiga semi piramidal o totalmente piramidal <sup>[21]</sup>.

### 4.1.2. Diodo láser y fotodiodo

Para detectar las desviaciones que se provocan en la micropalanca hacia la superficie o en contra de ella se emplea un diodo láser. Este láser emite un haz de luz, el cual incide en la cabeza de la micropalanca y es reflejado en cierta dirección. La dirección con la que se refleja el haz incidente depende directamente del movimiento de la micropalanca <sup>[20]</sup>.

Para AFM se utilizan fotodiodos sensibles a la posición (PSPD por sus siglas en inglés) los cuales monitorizan el haz de luz reflejada. Los movimientos generados por la micropalanca producen pequeños cambios en la dirección del haz reflejado, los cuales serán monitorizados por el PSPD. Por lo tanto, si una punta de AFM pasa sobre una superficie elevada, la flexión de la micropalanca contra la superficie y el subsecuente cambio en la dirección del haz reflejado se registran mediante los cambios de posición del haz medidos en el fotodiodo <sup>[20]</sup>.

### 4.1.3. Piezoeléctrico

El tubo piezoeléctrico se encarga de sujetar la muestra y, a través del sondeo en el plano X-Y por parte de la micropalanca, permite determinar la altura en Z a la que se encuentra la punta de la muestra <sup>[56]</sup>. Esto gracias a que permite controlar la precisión en los soportes de muestras dentro de cámaras de vacío y así mantener un nivel constante de separación entre punta-muestra que no sea afectado por la superficie de la muestra. Esta altura es dependiente del movimiento de la punta en el plano X-Y.

### 4.1.4. Obtención de imágenes

La obtención de una imagen topográfica por medio de la técnica de AFM se realiza al explorar una muestra de manera superficial con la punta de la micropalanca en la zona de interés. La transición entre partes elevadas y deprimidas de la superficie de la muestra influyen en la desviación del haz que controla a la micropalanca, y el cual se monitoriza en el fotodiodo. El AFM puede generar un mapa topográfico de las características superficiales usando un circuito de retroalimentación para controlar la altura de la punta sobre la superficie, y buscando mantener constante la posición del láser sobre el fotodiodo <sup>[20]</sup>.

## 4.2. Mecánica de la micropalanca

Una micropalanca tiene las siguientes dimensiones: Ancho ( $w$ ), grosor ( $t$ ), largo ( $L$ ) y altura de la punta ( $h$ ), la cual es medida desde la punta hacia el centro de la micropalanca <sup>[22]</sup>.

Cuando la micropalanca se curva dada una fuerza  $F_N$  en dirección Z ejercida en la punta, esta se desviará una distancia  $Z(x)$  desde la posición descargada en el eje  $z$ , como

$$z(x) = \frac{F_N L}{2EI} \left( x^2 - \frac{x^3}{3L} \right) \quad (4.1)$$

Donde  $L$  es la longitud antes mencionada,  $E$  es el módulo de Young e  $I$  es el momento de inercia.

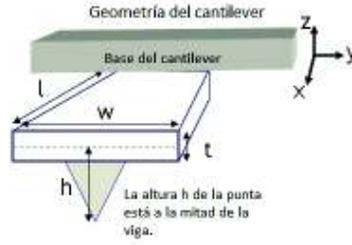


Figura 4.3: Geometría de una micropalanca. Imágen extraída de Wikibooks, subida por Kristian Molhave: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1377662>

La deflexión de la punta está dada por

$$\Delta_z = z(L) = \frac{F_N}{3EI} L^3 \quad (4.2)$$

Ya que el comportamiento de la micropalanca está representado según la ley Hooke, podemos obtener la constante del resorte  $k_N$  a partir de la siguiente relación

$$F_N = k_N \Delta_z \quad (4.3)$$

$$k_N = \frac{3EI}{L^3} \quad (4.4)$$

Y de esto podemos conseguir el ángulo de la micropalanca con la punta en el plano X-Y,  $\theta_x$ . Este ángulo es el que produce la deflexión del láser y está dado por

$$\theta_N = Z'(L) \quad (4.5)$$

$$Z'(L) = \frac{F}{EI} L^2 = \frac{3}{2} \frac{Z(L)}{L} \quad (4.6)$$

Dada esta relación obtenemos que el ángulo  $\theta_N$  es

$$\theta_N = \frac{3}{2} \frac{\Delta_z}{L} \quad (4.7)$$

Este es el ángulo medido entre la distancia de deflexión de la punta y el ángulo de deflexión de la punta [22].

## 4.3. Mediciones y modos de operación del AFM

### 4.3.1. Mediciones en AFM

#### 4.3.1.1. Medición de imagen:

En este modo se hace un barrido de la muestra en la superficie (plano X-Y) por medio de la punta en la micropalanca. Mientras se produce el barrido, las fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos de la muestra producen que la micropalanca se flexione. Esta flexión se registra por un sensor y la señal obtenida se introduce a un circuito el cual controla un actuador piezoeléctrico que determina la altura (medida en el eje Z) de la punta sobre la muestra y de esta manera permite que la flexión en la micropalanca se mantenga constante <sup>[56]</sup>.

Es posible trazar un mapa topográfico a partir de la representación de la altura de la punta en términos de su posición (X,Y) sobre la muestra ( $Z = Z(X, Y)$ ) <sup>[23]</sup>. Esto también permite detectar la fuerza interatómica cuando la punta está muy cerca de la superficie de la muestra.

#### 4.3.1.2. Medidas de fuerza:

Para la medida de fuerza se hace oscilar la punta de la micropalanca de manera vertical sobre la muestra y de esta forma se va registrando la flexión generada en la micropalanca. La medida de la fuerza F se expresa dependiente de la altura Z que tiene la punta sobre la superficie de la muestra <sup>[56]</sup>.

Las medidas de fuerza permiten el estudio de la elasticidad y fuerzas de adhesión en una muestra, e incluso, a nivel de una sola molécula permite el estudio de interacciones específicas entre varias de ellas, por ejemplo, interacciones entre antígenos y anticuerpos así como la interacción entre las hebras complementarias del ADN, así como también interacciones estructurales de biomoléculas y caracterización de la elasticidad en polímeros. Además es de gran utilidad en estudios de indentación de polímeros blandos que permiten caracterizar propiedades tales como el módulo de elasticidad o viscoelásticas, y en muestras duras se puede obtener el módulo de Young <sup>[24]</sup>.

El módulo de Young también es conocido como módulo de elasticidad. Es un parámetro utilizado para caracterizar el comportamiento de materiales elásticos, según la dirección en la que se aplica una fuerza <sup>49</sup>. En materiales anisótropos como lo es la superficie celular, es posible probar que hay tres constantes elásticas ( $E_x$ ,  $E_y$ ,  $E_z$ ) tales que el módulo de Young en cualquier dirección puede expresarse como

$$E = l_x E_x + l_y E_y + l_z E_z \quad (4.8)$$

Donde  $l_x$ ,  $l_y$ ,  $l_z$  representan los cosenos directores del vector de dirección en que medimos el módulo de Young respecto a tres direcciones ortogonales dadas <sup>49</sup>.

### 4.3.2. Modos de operación en AFM

En AFM existen dos modos principales los cuales son el método de contacto y el método dinámico. De estos métodos se derivan todos los demás métodos existentes [21].

#### 4.3.2.1. Modo de contacto

En el método de contacto la punta de la micropalanca está en contacto perpetuo durante el barrido, esto quiere decir que la fuerza entre la punta y la muestra se mantiene constante, permitiendo así que se mantenga una constante de deflexión. La señal de retroalimentación se obtiene a partir de la deflexión en Z de la micropalanca. Éste método se utiliza principalmente en muestras duras, que no sufran daño al someterse a una fuerza continua [21].

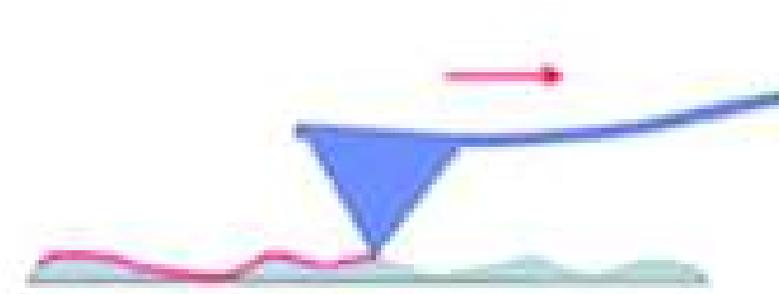


Figura 4.4: Representación del modo contacto en AFM [25]

Una fuerza fundamental en el método de contacto es la fuerza de adhesión entre la punta y la muestra, la cual está dada por:

$$F_{adhesion} = 4\pi R\gamma_L \cos\theta \quad (4.9)$$

Aquí,  $\gamma_L$  representa la tensión superficial del agua, R es el radio que hay de la punta a la muestra y  $\theta$  el ángulo del menisco entre ellas.

Una de las desventajas principales que se presenta en AFM al utilizar el modo contacto es que al analizar muestras biológicas, específicamente blandas o delicadas, éstas pueden dañarse a causa del contacto continuo con la punta. Es por ello que es preferente utilizar este modo en muestras fuertemente adheridas a la superficie [21].

#### 4.3.2.2. Modos dinámicos

Los dos modos más utilizados del modo dinámico son el modo de no contacto y el de contacto intermitente, mejor conocido como tapping. Para estos modos es necesario hacer vibrar la micropalanca con cierta frecuencia de resonancia apoyándose en el actuador piezoeléctrico. La amplitud, frecuencia y fase de vibración de la micropalanca dependen directamente de la interacción entre la punta y la superficie, mientras que el circuito de realimentación mantiene constante sólo una de estas tres propiedades, esto depende totalmente del modo de operación que se utilice [56].

- **Modo de no contacto:** También conocido como modo de frecuencia modulada (FM-AFM). En el modo de no contacto la punta oscila muy cerca de la superficie, dentro del régimen de fuerzas de atracción, sin haber contacto entre punta y muestra, facilitando así la obtención de imágenes topográficas de alta precisión y no invasivas (sin dañar la muestra) <sup>[21]</sup>.

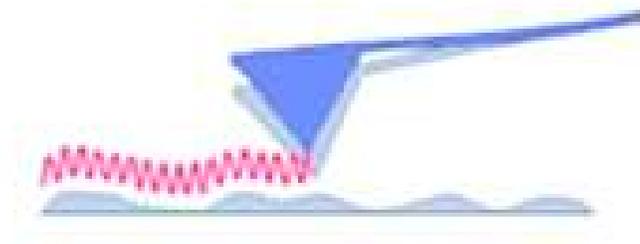


Figura 4.5: Representación del modo no contacto en AFM <sup>[25]</sup>

- **Modo de contacto intermitente:** Este modo también es conocido como “tapping” o de amplitud modulada (AM-AFM). Este método consiste en hacer oscilar la palanca, dando toques continuos a la muestra durante el barrido, apoyándose en el piezoeléctrico al que está acoplado. Éste método se emplea principalmente en muestras que se encuentran en un medio líquido, como son las muestras biológicas o en general, para muestras blandas <sup>[21]</sup>. Usualmente, en el modo de contacto intermitente, la punta golpeaba la superficie de la muestra de manera intermitente, sin embargo, se ha demostrado que este método se puede operar tanto a contacto con la muestra como a distancia de ella.

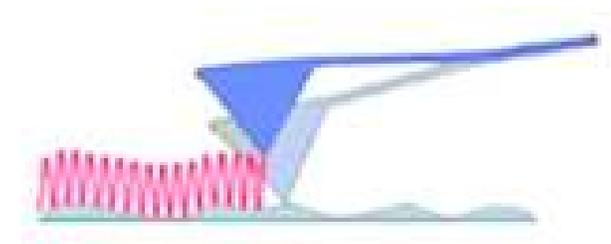


Figura 4.6: Representación del modo de repiqueteo (tapping) en AFM <sup>[25]</sup>

### 4.3.3. Interacción de fuerzas y modelos de descripción

Dado que la punta de la micropalanca se somete a un régimen de interacción de fuerzas atractivas y repulsivas con la superficie de la muestra, es posible obtener curvas de fuerza-distancia, las cuales son una representación gráfica de toda esa

interacción <sup>[21]</sup>. Como se observa en la figura 4.7, tenemos una curva fuerza-distancia de la cual se puede extraer la siguiente información:

- El tramo 2-3 permite evaluar las fuerzas de interacción electrostáticas y de Van der Waals entre la punta y la muestra.
- El tramo 3-4 permite evaluar el espesor de la capa de muestra adsorbida al sustrato.
- El tramo 5-6 permite cuantificar la fuerza de adhesión.



Figura 4.7: Curva fuerza-distancia obtenida por AFM. La punta se acerca a la muestra (1-2) y a una distancia crítica (2) actúan las fuerzas de atracción (2-3) provocando la unión entre ambas y la interacción atractiva continúa (3-4) hasta que comienzan a predominar las fuerzas repulsivas (4-5) y provocan una separación de la punta (5-6) y esta regresa a su posición inicial (6-7) <sup>[21]</sup>.

Además, la forma de las curvas fuerza-distancia permite obtener información sobre las características de la muestra o de la interacción punta-muestra como lo son las fuerzas de adhesión, si se trata de una muestra rígida o blanda, fuerzas de repulsión o atracción de largo alcance y si existe deformación plástica en la muestra <sup>[21]</sup>.

Es posible describir las fuerzas de atracción que existen entre la punta y la muestra mediante la ecuación de Van der Waals <sup>[21]</sup>, donde se calcula la fuerza entre una esfera y un plano:

$$F_{ts}(Z_c, Z) = \frac{HR}{6d^2} \quad (4.10)$$

Donde H es la constante de Hamaker, R es el radio de la punta y d la distancia entre la punta y la superficie,  $Z_c$  es la distancia entre la superficie y la posición de equilibrio del cantiléver, Z es la distancia entre la superficie y la micropalanca en un momento dado de oscilación ( $d= Z_c + Z$ ) <sup>[21]</sup>.

Para describir las fuerzas de contacto y de adhesión se han empleado modelos correspondientes a la teoría de la elasticidad como lo es el modelo de Hertz, que considera los cuerpos como esferas y desprecia las fuerzas de adhesión. También, los modelos de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) y el de Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) son más modernos y proveen las relaciones analíticas entre la deformación y la fuerza aplicada a la muestra. El modelo DMT es más adecuado para describir contactos rígidos, pequeñas fuerzas de adhesión y pequeño radio de la punta. El

modelo (JKR) se emplea para contactos con baja rigidez, grandes fuerzas de adhesión y radio de la punta grande <sup>[21]</sup>.

## 4.4. Aplicaciones del AFM

Como antes se mencionaba, el AFM permite obtener imágenes topográficas, profundidad y ancho de huecos en la superficie, rugosidad, entre otras propiedades de distintas muestras. Este método permite medidas de potencial de superficie para detectar la presencia de cargas superficiales en la muestra. También permite realizar medidas de fuerzas magnéticas (MFM) que nos posibilita la observación de dominios magnéticos que no son visibles en el modo topográfico. Otra de sus utilidades es que es posible cuantificar fuerzas eléctricas (EFM) sobre la superficie de la muestra, así como hacer estudios de dureza y durabilidad de películas de materiales inorgánicos, orgánicos y biológicos <sup>[21]</sup>.

Dada la información que puede obtenerse de una muestra, existe una amplia gama de ramas de las ciencias naturales a las cual se puede aplicar AFM, entre ellas se incluye a la física de estado sólido, al desarrollo de semiconductores, a ingeniería molecular, la química y física de polímeros, así como la química de superficies, biología molecular y celular, en medicina y nanotecnología <sup>[56]</sup>.

Las aplicaciones en el campo de la física del estado sólido incluyen la identificación de átomos en una superficie, la evaluación de interacciones entre un átomo específico y sus átomos vecinos, y el estudio de cambios en las propiedades físicas que surgen de cambios en una disposición atómica a través de la manipulación atómica <sup>[56]</sup>. En biología molecular, el AFM puede utilizarse para estudiar la estructura y propiedades mecánicas de conjuntos y complejos de proteínas. Un ejemplo es el uso de AFM para la obtención de imágenes de microtúbulos y la medida de su rigidez <sup>[56]</sup>. En biología celular, es posible utilizar AFM para intentar diferenciar células cancerosas de células normales basándose en distintas características como lo es su dureza. También para evaluar las interacciones entre una célula específica y sus células vecinas en un sistema de cultivo competitivo. El AFM también se puede utilizar para estudiar cómo las células regulan la rigidez o la forma de la membrana o pared celular <sup>[56]</sup>.

## 4.5. AFM en sistemas biológicos

En la actualidad, el AFM se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en el campo de la biología ya que ha permitido la cuantificación de diversas propiedades de materiales biológicos <sup>[56]</sup>. Además de ello, esta técnica ha destacado en la conducción de nuevos desarrollos en el área de la nanobiotecnología y, debido a sus características únicas, se ha hecho énfasis en utilizar AFM para la aplicación de fuerzas a nanoescala con el fin de estudiar ciertos eventos biológicos <sup>[26]</sup>.

Cabe destacar la capacidad del AFM de poder manejarse en diversos entornos como lo es el vacío, el aire, y lo más importante en el área de la biología, en líquido, ya que la gran mayoría de procesos biológicos tienen lugar en este medio <sup>[26]</sup>.

Además de visualizar la topografía de materiales biológicos como células individuales, proteínas individuales y cadenas de ADN en su entorno activo, el AFM

permite la manipulación de moléculas individuales mediante espectroscopia de fuerza de reconocimiento molecular, explorando propiedades mecánicas de las células y mecanismos biológicos, así como interacciones existentes entre enzima y fármaco [26].

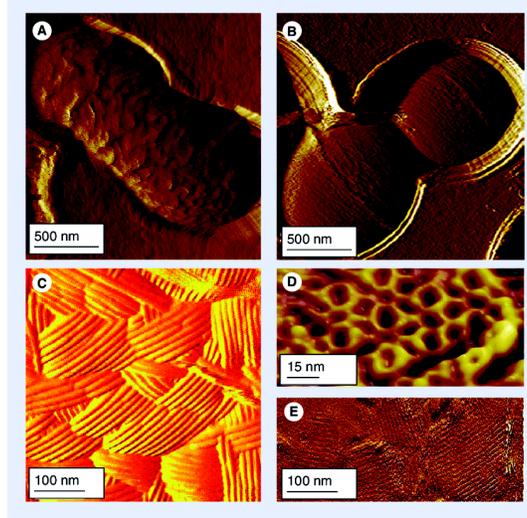


Figura 4.8: Imágenes de la organización a nanoescala de los componentes de la pared celular en células vivas obtenidas con AFM. Imágenes registradas en buffer para la superficie de (A) *Lactobacillus rhamnosus* GG, (B) *Lactococcus lactis*, (C) *Aspergillus fumigatus* y (D & E) *Corynebacterium glutamicum* [27]

#### 4.5.1. Células y procesos celulares:

Es bastante factible la obtención de imágenes de estructuras celulares y subcelulares en condiciones fisiológicas con una alta resolución por medio de AFM. Algunas de las primeras células observadas por este método fueron eritrocitos fijos secados sobre cubreobjetos de vidrio; sin embargo, en ese entonces no se pudo obtener suficiente información sobre las estructuras intracelulares o extracelulares. Actualmente, la técnica del AFM ha avanzado tanto, que incluso es posible analizar células en medios acuosos, muchas de ellas incluso son fotografiadas *in vivo* (figura 4.8) [27].

#### 4.5.2. AFM en células de cáncer

La exploración de células normales y cancerosas por medio de AFM nos puede brindar información importante respecto a las características superficiales que tiene cada una de ellas. Estudios muestran que en células normales, la superficie es rígida en comparación con células de cáncer puesto que, al aplicar fuerza con el cantilever se observa menor profundidad de la hendidura formada, al contrario que en una célula cancerosa, donde la hendidura suele ser más profunda al aplicar la misma fuerza [50].

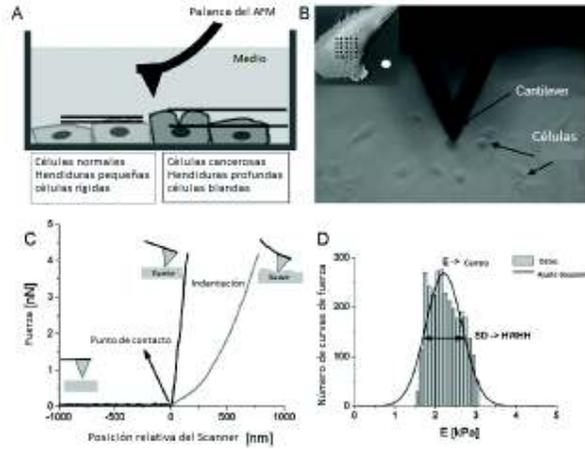


Figura 4.9: Esquema mostrando la identificación de medidas de elasticidad en AFM. A) identificación de células cancerosas usando AFM en base a la profundidad de la indentación. B) Imágen óptica de la vista superior de la cámara integrada al sistema AFM, utilizada para ubicar el cantilever sobre células no teñidas. C) Conversión de las curvas de fuerza registradas a una curva de fuerza aplicada vs indentación. D) El valor promedio del módulo de Young calculado ajustando una función Gaussiana al histograma de todos los datos recopilados. El ejemplo muestra la distribución del módulo para células de melanoma WM115<sup>[50]</sup>.

Para calcular el módulo de Young con AFM en células se sigue una secuencia específica, la cual se muestra en la figura 4.9 y se describe a continuación: Primero, las células son localizadas utilizando un sistema óptico usualmente integrado en los sistemas de AFM (Figura 4.9b). Después, el cantilever se acerca a la célula que será estudiada y se coloca una cuadrícula sobre el centro de esta. En cada punto de la cuadrícula se pone en contacto la punta del cantilever con la célula y se registran curvas de fuerza. Luego, las curvas de fuerza se convierten en curvas de fuerza versus indentación mediante la resta de dos curvas de fuerza, una registrada en una celda y la otra recolectada en un sustrato duro (Figura 4.9c). Las curvas de fuerza vs indentación describen la respuesta mecánica a la fuerza aplicada, que es característica de cada material. El valor del módulo de Young, que caracteriza la rigidez de la célula se puede evaluar dentro del marco de la mecánica de contacto de Hertz, teniendo en cuenta un indentador rígido con una geometría seleccionada por la punta del AFM (esférica, paraboloidal, cónica o de extremo plano) y un sustrato plano y deformable. Por lo general, la geometría de la punta utilizada en AFM es piramidal la cual se modela como un cono o paraboloides. Por lo tanto, se pueden utilizar dos fórmulas para describir la relación entre la fuerza aplicada  $F$  y la profundidad de indentación resultante  $\delta$  <sup>[50]</sup>:

Para un cono

$$F(\delta) = \frac{2 \cdot \tan(\alpha)}{\pi} E' \cdot \delta^2 \quad (4.11)$$

Para un paraboloides

$$F(\delta) = \frac{4 \cdot \sqrt{R}}{3} E' \cdot \delta^{3/2} \quad (4.12)$$

donde  $\alpha$  es el ángulo de apertura de la punta y R es el radio de la curvatura.

El módulo de Young reducido  $E'$  está dado por la expresión:

$$\frac{1}{E'} = \frac{1 - \mu_{punta}^2}{E_{punta}} + \frac{1 - \mu_{muestra}^2}{E_{muestra}} \quad (4.13)$$

En el caso de células vivas  $E_{muestra} \ll E_{punta}$ , por lo que la expresión 4.12 queda como

$$\frac{1}{E'} = \frac{1 - \mu_{muestra}^2}{E_{muestra}} \quad (4.14)$$

Donde  $\mu$  es el coeficiente de Poisson, relacionado a la compresibilidad del material en un rango de 0 a 0.5. Es difícil determinar el coeficiente de Poisson para células, sin embargo todos los cálculos necesitan asumir algún valor. Comúnmente el valor se toma como 0.5, ya que las células pueden ser tratadas como un material incompresible [50].

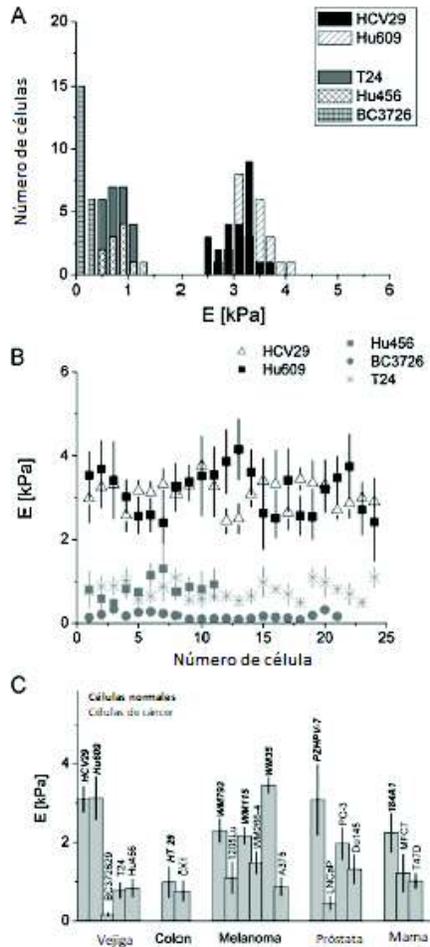


Figura 4.10: Medidas de elasticidad en líneas celulares. A) Histogramas del módulo de Young determinado para líneas celulares humanas malignas y benignas. B) La correspondiente relación entre el módulo en función del número de célula. C) Comparación del módulo de Young para varias líneas celulares<sup>[50]</sup>.

Finalmente, el módulo de Young de una célula puede ser calculado por la distribución de los valores determinados para formar las curvas de fuerza vs indentación de una sola célula (Figura 4.9d). El centro de la distribución denota el valor medio, mientras que la mitad del ancho tomado desde la mitad de la altura corresponde a la desviación estándar <sup>[50]</sup>.

El módulo de Young determinado por mediciones con AFM es un valor relativo y puede usarse sólo para estudios comparativos en casos donde todas las condiciones experimentales son conservadas. En caso de células vivas la muestra se considera anisotrópica, como anteriormente se mencionó, y entonces el módulo de Young determinado debe ser tratado como un valor relativo <sup>[50]</sup>. Un ejemplo de ello se puede observar en la figura 4.10 donde se presentan mediciones de elasticidad para diversas líneas celulares. Se puede observar la comparación entre el módulo de Young de líneas celulares malignas y benignas (figura 4.10a), así como de varias líneas celulares (figura 4.10c), entre otras.

## 4.6. AFM en células de cáncer de mama.

Mediante el uso de AFM se puede obtener información estructural de las células como lo son la rigidez, viscosidad, rugosidad y elasticidad (módulo de Young) <sup>[56]</sup>. A continuación, se presentan resultados obtenidos por AFM, obtenidos de literatura científica, de diversas líneas celulares de cáncer de mama.

### 4.6.1. Líneas celulares MCF-10A y MCF-7

Una investigación realizada en el año 2016 nos muestra las diferentes características que se pueden obtener por AFM de las líneas celulares MCF-10A y MCF-7. En la figura 4.11 podemos observar las nanoestructuras en la superficie de ambas líneas: MCF-10A (línea normal) y MCF-7 (línea de cáncer de mama). En ellas se puede observar que MCF-7 tiene una forma ovalada, en cambio MCF-10A presenta una forma elíptica redondeada (Figura 4.11a y 4.11b respectivamente). También podemos observar que la estructura de los filamentos difiere en ambas líneas, para la línea de cáncer de mama los filamentos no son paralelos y forman una red entrelazada en la membrana en comparación con la línea benigna, la cual forma una estructura paralela de filamentos. La estructura filamentosa está relacionada con el citoesqueleto de la actina y su reordenamiento es esencial para la transformación del tumor<sup>[61]</sup>, es por ello que toma esa estructura caótica en la línea MCF-7.

La línea celular MCF-7 presenta una interfase más corta que contribuye a tasas mitóticas más rápidas, lo que da paso a una más rápida proliferación celular. Esto hace que no tengan tiempo suficiente para desarrollar un citoesqueleto tan denso como el de las células normales. Por lo tanto, los filamentos de actina de la célula en interfase desaparecen cuando las células entran en la mitosis y son reemplazadas por una distribución difusa de actina tal como se muestra en la figura 4.11c <sup>[61]</sup>.

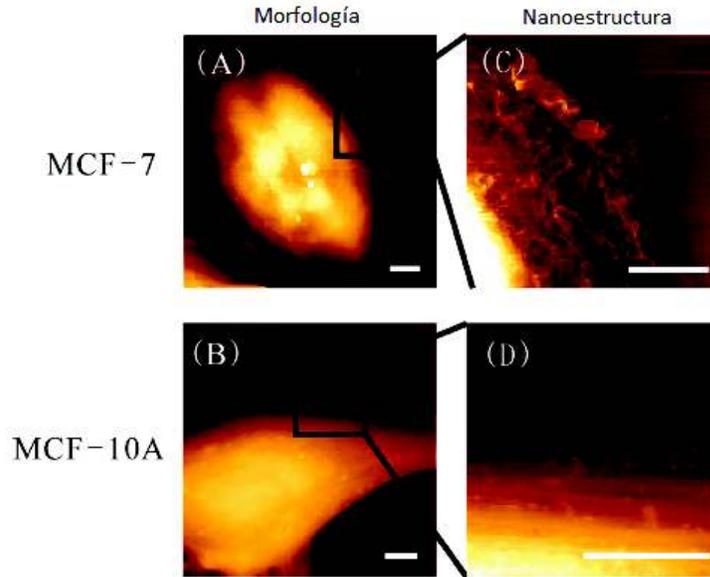


Figura 4.11: Imágenes de células mamarias cancerosas (MCF-7) y benignas (MCF-10A) obtenidas por AFM. Las imágenes de morfología (A y B) y nanoestructura (C y D) muestran detalles estructurales, así como información de tomografía del cáncer y de células mamarias benignas <sup>[61]</sup>.

En la misma investigación se demuestra que la rugosidad en el caso de la línea celular de cáncer de mama es significativamente más alta que la de la línea celular benigna, lo que puede indicar que esta característica de la membrana plasmática es un parámetro efectivo y que puede ser un indicador importante del estado de salud de la célula <sup>[61]</sup>. En el cuadro 4.1 se muestra la rugosidad media de cada una de las líneas celulares donde Ra es la media aritmética de las desviaciones en altura del valor medio de rugosidad y Rq es la raíz cuadrada media.

Línea Celular	Ra	Rq
MCF-7	$27.41 \pm 8.00$	$34.17 \pm 11.92$
MCF-10A	$21.34 \pm 6.59$	$26.10 \pm 7.76$

Cuadro 4.1: Rugosidad promedio de células mamarias cancerosas (MCF-7) y no cancerosas (MCF-10A) <sup>[61]</sup>.

Respecto a los valores de elasticidad y viscosidad de las líneas celulares, se determinaron mediante el modo de fuerza del AFM que la línea MCF-10A tiene alrededor de tres veces más elasticidad que la MCF-7, lo que sugiere que estas últimas son más blandas que las células normales. Esto se asocia al citoesqueleto no bien desarrollado como se había mencionado anteriormente <sup>[61]</sup>. En la figura 4.12 se muestra un histograma de los módulos de Young respectivos a las líneas celulares MCF-10A y MCF-7. En relación al parámetro de viscosidad (figura 4.13), se reporta asociación con la motilidad, proliferación e invasión celular y puede utilizarse para evaluar el estado de salud de las células. Menor viscosidad en la célula indica mayor motricidad y capacidad de agresión, lo que indica que la viscosidad en la línea celular MCF-7 es menor que la MCF-10A. Este resultado sugiere que MCF-7 es un tipo de célula de cáncer agresiva y con mayor potencial invasivo en comparación con MCF-10A <sup>[61]</sup>.

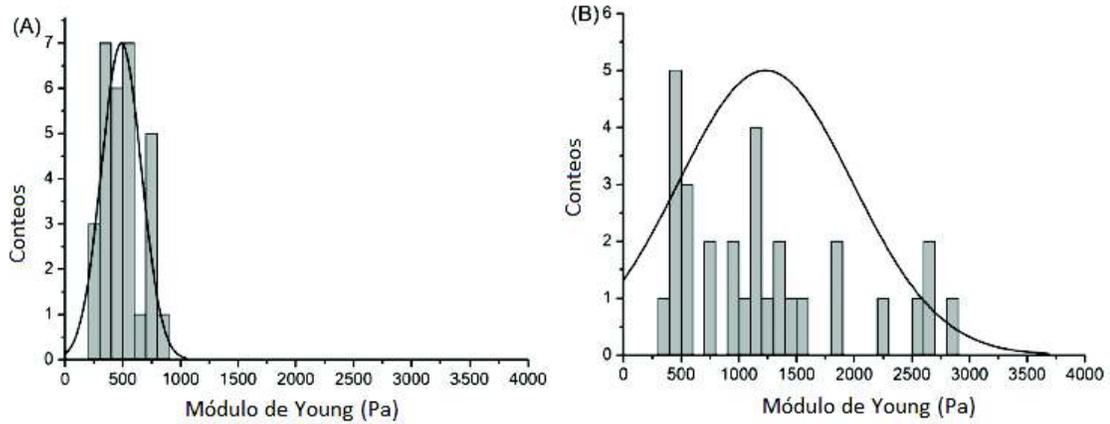


Figura 4.12: Histogramas del módulo de Young asociados a A) células MCF-7 y B) células MCF-10A [61]

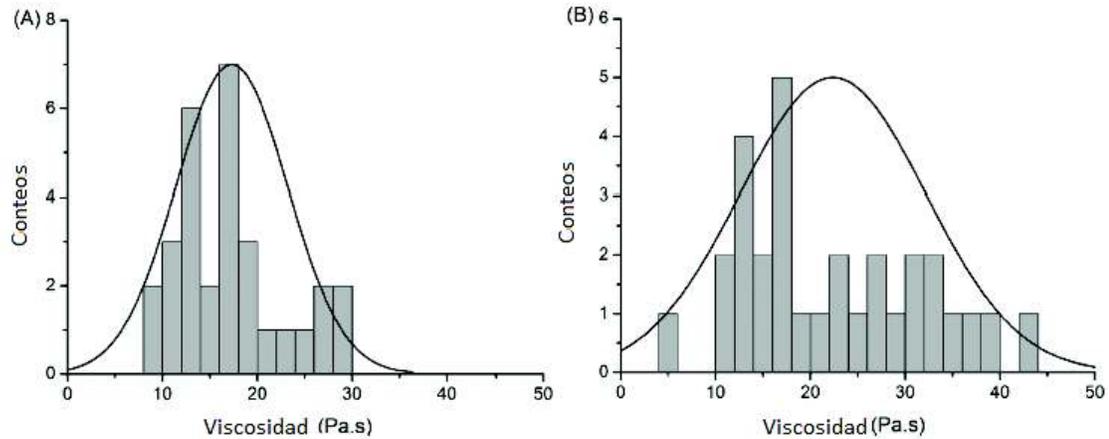


Figura 4.13: Histogramas de viscosidad asociados a A) células MCF-7 y B) células MCF-10A [61]

#### 4.6.2. Líneas celulares MDA-MB-231, T-47D e ID014-T

En esta sección describiremos la información topográfica encontrada de las líneas celulares MDA-MB-231, T-47D e ID014-T.

En la figura 4.14, se presenta la topografía obtenida mediante AFM de las líneas MDA-MB-231, T-47D e ID014-T. En el mismo sentido se presenta el cuadro 4.2 en el cual se muestran los valores de rugosidad medidos en el núcleo y en la periferia de cada célula, donde se observa mayor rugosidad en la línea MDA-MB-231 en comparación con las otras líneas celulares [43].

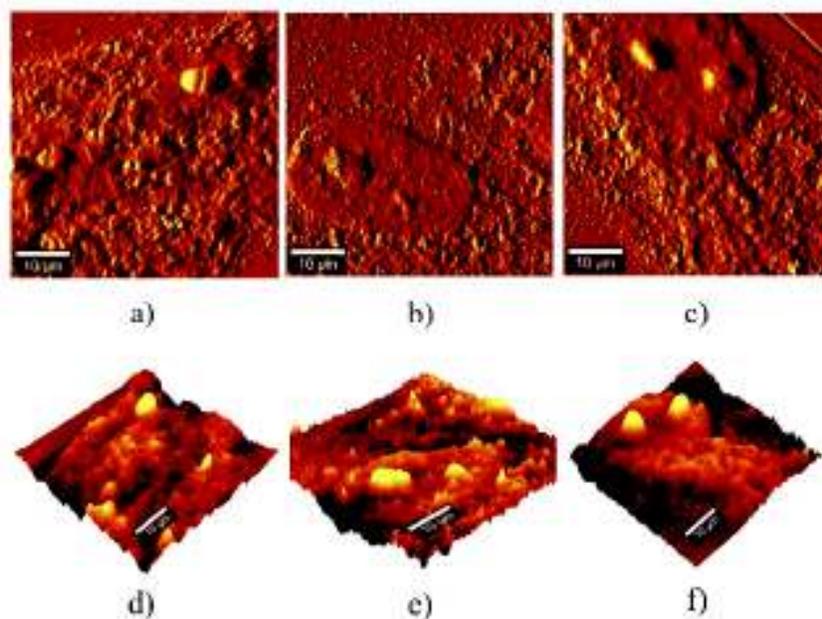


Figura 4.14: Imágenes AFM regulares y 3D de la superficie celular de MDA-MB-231, T-47D e ID014-T: a) Superficie celular regular de MDA-MB-231; (b) Superficie celular regular de T-47D; (c) Superficie celular regular de ID014-T; (d) superficie celular 3D de MDA-MB-231; (e) superficie celular 3D de T-47D; (f) Superficie celular 3D de ID014-T <sup>[43]</sup>.

Línea celular	Rugosidad del Núcleo (nm)	Rugosidad de la periferia (nm)
MDA-MB-231	$44.52 \pm 7.24$	$43.63 \pm 6.94$
T-47D	$43.73 \pm 7.43$	$43.49 \pm 5.95$
ID014-T	$39.78 \pm 7.72$	$38.83 \pm 7.53$

Cuadro 4.2: Valor de la rugosidad en el núcleo y periferia del núcleo de líneas celulares de cáncer de mama <sup>[43]</sup>.

Recordando la relación que existe entre la rugosidad de una célula de cáncer y su citoesqueleto, se podría determinar que la línea MDA-MB-231 tiene un citoesqueleto más débil al igual que la línea T-47D en comparación con la línea ID014-T, lo que indica que son más agresivas las dos primeras líneas en comparación con la última. La rugosidad celular se relaciona con el grado de agresividad del cáncer, por lo que se puede asociar a un cambio en el proceso bioquímico celular<sup>[43]</sup>.

En los resultados de la investigación que abarca las tres líneas celulares mencionadas en esta sección, se indica como la composición bioquímica celular y las características mecánicas celulares como lo son la rugosidad y topografía, pueden regular el comportamiento celular <sup>[43]</sup>. Los cambios cualitativos y cuantitativos que sufre la célula podrían utilizarse como una forma de distinguir entre subtipos celulares o como biomarcadores para la evaluación de terapias y medicamentos contra el cáncer.

### 4.6.3. Línea celular MDA-MB-468

A continuación describiremos información topográfica de la línea celular MDA-MB-468 y la compararemos respecto a la línea normal MCF-10A así como con las demás líneas celulares. En la figura 4.15 se muestra la topografía superficial de la célula recopilada por AFM <sup>51</sup>.

Comparada con la línea celular MCF-10A la cual tiene un coeficiente de rugosidad media de 27.41, la línea MDA-MB-468 muestra claramente una superficie celular altamente rugosa por lo que se puede relacionar, al igual que con las demás líneas celulares, a la debilidad de su citoesqueleto y la agresividad de la célula de cáncer <sup>[43]</sup>. En la Figura 4.15 se muestra la topografía superficial de la célula recopilada por AFM.

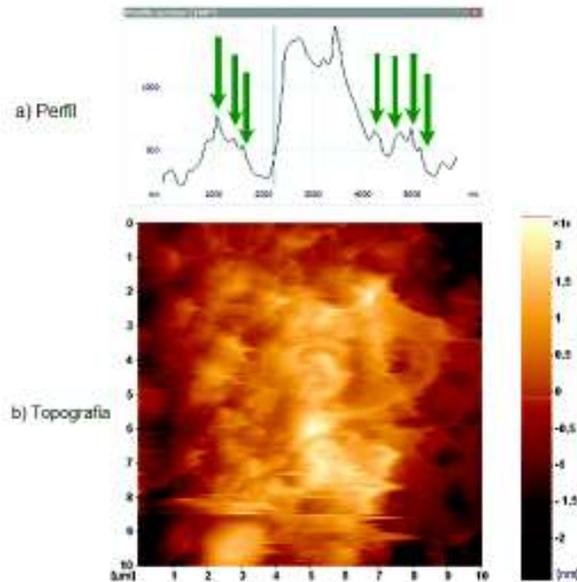


Figura 4.15: Imágenes de la superficie celular de la célula MDA-MB-468 obtenida mediante AFM a una resolución nanométrica. Se muestran (a) perfiles de altura representativos, (b) datos brutos de topografía de una exploración (10  $\mu\text{m}$ )<sup>51</sup>.

Actualmente no existen valores numéricos de la rugosidad de la línea MDA-MB-468 por lo que no es posible comparar este parámetro de forma cuantitativa con las demás líneas celulares.

La evidencia encontrada respecto al análisis con AFM muestra como hay una diferencia notable en la topografía superficial de cada una de estas células, y como todas las líneas celulares de cáncer de mama coinciden en mostrar una superficie totalmente rugosa comparada con la línea normal MCF-10A, lo que se relaciona a procesos bioquímicos y a la estructura de su citoesqueleto <sup>[52]</sup>. También se mostró como la línea normal MCF-10A presenta mayor elasticidad y viscosidad en comparación con líneas de cáncer de mama. Hasta este momento no se pudo recuperar bibliografía científica que evidenciara el efecto de la radiación en líneas celulares de mama normales y de cáncer de mama por medio de AFM.

# Conclusiones y Perspectivas

En esta revisión se realizó una búsqueda de información asociada a la caracterización de las líneas celulares de cáncer de mama de diferentes orígenes étnicos así como su respuesta a la radiación mediante espectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica. Esto permitió observar características estructurales y biomecánicas importantes como son la viscosidad, rugosidad, el módulo de Young así como la similitud que hay en la topografía de las distintas células de cáncer de mama comparado con la línea celular normal de mama; incluso perteneciendo al mismo origen étnico en condiciones normales, así como los cambios que sufren al exponerse a radiación ionizante.

Finalmente, este trabajo de revisión nos permitirá avanzar en el conocimiento biofísico de sistemas biológicos enmarcados en cáncer de mama. Sin embargo, no se encontró información de todas las líneas celulares que se analizaron en este trabajo mediante AFM y espectroscopía Raman por lo que esto permite abrir un gran área de investigación de radiosensibilidad en células de cáncer de mama asociado al origen étnico. En este sentido, resulta necesario evaluar y comparar los efectos bioquímicos y biomecánicos de líneas celulares de distinto origen étnico expuestas a dosis terapéuticas radiación gamma.

## Perspectivas

Este trabajo expone características importantes respecto a los principales componentes y topografía de líneas celulares de cáncer de mama obtenidas por medio de bibliografía científica. El hecho de no encontrar evidencia del efecto de la radiación en las líneas de origen mexicano y afrodescendiente permite considerar la caracterización respectiva por medio de espectroscopía Raman y AFM como un posible tema de investigación futuro.

# Bibliografía

- [1] World Health Organization. “Ionizing radiation, health effects and protective measures”. 29 April 2016.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>
- [2] Krane, Kenneth S. (1988). “Introductory Nuclear Physics”. John Wiley & Sons. pp. 246–269.
- [3] Eisberg, R. Resnick, R. (1994). “Física cuántica: Átomos, moléculas, sólidos, núcleos y partículas”. México D.F.: Limusa.
- [4] Lawrence Berkeley National Laboratory (9 August 2000). “Beta Decay. Nuclear Wall Chart”. United States Department of Energy. Revisado el 19 de octubre del 2020.  
<https://www.nrc.gov/about-nrc/radiation/health-effects/radiation-basics.html>
- [5] Loveland, W.D. (2005). “Modern Nuclear Chemistry”. John Wiley & Sons. pp. 232.
- [7] Allen, C., Borak, T. B., Tsujii, H., Nickoloff, J.A. (2011). “Heavy Charged Particle Radiobiology: Using Enhanced Biological Effectiveness and Improved Beam Focusing to Advance Cancer Therapy”. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Volume 711, Pp. 150-157.  
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.012
- [8] Esam M.A. Hussein (2011). “4. Transmission”. Computed Radiation Imaging. Elsevier. Pp. 37-52.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387777-2.00004-5>
- [9] Gottfried, K.L., Penn, G. (1996) “Radiation in Medicine: A Need For Regulatory Reform”. Institute of Medicine (US) Committee for Review and Evaluation of the Medical Use Program of the Nuclear Regulatory Commission. National Academies Press (US).
- [10] Abdullah Farooque, Rohit Mathur, Amit Verma, Vandana Kaul, Anant Narayan Bhatt, Jawahar Singh Adhikari, Farhat Afrin, Saurabh Singh and Bilikere S Dwarakanath (2011) “Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement”. Expert Rev. Anticancer Ther. Vol. 11. Pp. 791–802.  
<https://doi.org/10.1586/era.10.217>
- [11] Smith, E., Dent, G. (2005) “Modern Raman Spectroscopy. A Practical Approach”. John Wiley & Sons.

- [12] V. Gutierrez, J. Otero. (2014) “Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones”. Research Gate.  
DOI: 10.13140/RG.2.1.5015.5362
- [13] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. “Manual de Operación del espectrómetro MICRO-RAMAN RENISHAW”. Consultado el 9 de febrero del 2021:  
<http://www.linan-ipicyt.mx/Manual%20de%20Raman.pdf>
- [14] “Dispositivo de carga acoplada”. Consultado de la Wikipedia el 12 de febrero del 2021:  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Dispositivo\\_de\\_carga\\_acoplada](https://es.wikipedia.org/wiki/Dispositivo_de_carga_acoplada)
- [15] “Raman Spectroscopy”. Consultado de la wikipedia el 12 de febrero del 2021:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Raman\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy)
- [16] S. Takanezawa, S. Morita, Y. Ozaki, and Y. Sako. (2015) “Raman spectral dynamics of single cells in the early stages of growth factor stimulation”. *Biophysical Journal*, Vol. 08, Pp 2148-2157.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.037>.
- [17] C. Domingo, G. Santoro. (2007) “Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono”. *Sociedad Española de Óptica: Óptica Pura Y Aplicada*, Vol. 40, Pp 175-186.  
<http://hdl.handle.net/10261/4146>
- [18] Butler, H., Ashton, L., Bird, B. et al. (2016) “Using Raman spectroscopy to characterize biological materials”. *Nature Protocols* Vol. 11, Pp. 664–687.  
  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>
- [19] Alfonso-García, A., Mittal, R., Lee, E., Potman, E. (2014) “Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: A tutorial”. *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 19(7), Pp. 071407.  
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.7.071407>
- [20] Park Systems: “How AFM works?”. Consultado el 24 de Febrero del 2021.  
<https://www.parksystems.com/medias/nano-academy/how-afm-works>
- [21] Vilaso, J. (2020). “Microscopía de Fuerza Atómica”. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.  
DOI: 10.13140/RG.2.2.17860.24963
- [22] Wikibooks.org, “Nanotechnology/AFM”. Consultado el 24 de Febrero del 2021.  
<https://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology/AFM>
- [23] Radmacher, M., Cleveland, J. P., Fritz, M., Hansma, H. G., & Hansma, P. K. (1994). “Mapping interaction forces with the atomic force microscope”. *Biophysical journal*, 66(6), 2159–2165.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)81011-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)81011-2)
- [24] Trtik, P., Kauffman, J., Volz, U. (2012) “On the use of peak-force tapping atomic force microscopy for quantification of the local elastic modulus in hardened

- cement paste”. *Cement and Concrete Research*, Vol. 42, Issue 1, Pp. 215-221,  
<https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2011.08.009>.
- [25] Asmatulu, R., Khan, W.S. (2019) “Chapter 13 - Characterization of electrospun nanofiber. *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*”. Editorial Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813914-1.00013-4>.
- [26] Rupasinghe, T. P. (2019) “Atomic Force Microscopy: Is It Just an Imaging Technique?”. *Chemistry in Sri Lanka, Institute of Chemistry CEYLON*, Vol. 36.  
<https://www.ichemc.edu.lk/wp-content/uploads/2015/10/Vol.-36-No.1-web.pdf>
- [27] Alsteens, D., Dupres, D., Andre, G., Dufrière, Y.(2011) “Frontiers in microbial nanoscopy”. *Nanomedicine (London, England)*. Vol. 6, Pp. 395-403.  
 DOI: 10.2217/nnm.10.151
- [28] National Human Genome Research Institute (NIH) “Cáncer”. Consultado el 20 de marzo del 2021.  
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cancer#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20empieza%20cuando%20una,exposici%C3%B3n%20a%20sustancias%20qu%C3%ADmicas%20nocivas.>
- [29] Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011) “Global Cancer Statistics”. *CA Cancer Journal*, Vol. 6, No. 2, Pp. 69-90.  
 DOI: 10.3322/caac.20107
- [30] INEGI (2020) “Estadísticas a Propósito del Día Mundial de la Lucha Contra el Cáncer de Mama(19 de Octubre)”.  
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/a proposito/2020/Cancermama20.pdf>
- [31] Navarro, M.J., Caire, G., Ortega, M.I., Bolaños, A.V., Saucedo M.S. (2015) “Influencia de los factores reproductivos, la lactancia materna y la obesidad sobre el riesgo de cáncer de mama en mujeres mexicanas”. *Revista Nutrición Hospitalaria*, Vol. 32, No. 1, Pp. 291-298.
- [32] MCF-7 Cells, “MCF-7 Cell Line Information”. Consultado el 20 de marzo del 2021.  
<http://www.mcf7.com/>
- [33] Horwitz, K., Mockus, M., Lessey, B., “Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance” (1982) *Cell*, Vol. 20, Pp. 633-642.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90218-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90218-5).
- [34] Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. (2015) “Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells”. *PLoS ONE* Vol. 10, No. 7:  
 doi:10.1371/journal.pone.0131285
- [35] Instituto Nacional del Cáncer: NIH, “Tipos comunes de cáncer”. Consultado el 22 de marzo del 2021.  
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/comunes#:~:text=El%20tipo%20de%20c%C3%A1ncer%20m%C3%A1s,y%20el%20c%C3%A1ncer%20de%20pr%C3%B3stata.>

- [36] “How does radiation affect humans?”. Consultado el 24 de marzo del 2021.  
[https://bioethicsarchive.georgetown.edu/achre/final/intro\\_9\\_5.html](https://bioethicsarchive.georgetown.edu/achre/final/intro_9_5.html)
- [37] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik and H. J. Brenner (1979) “Establishment and Characterization of Cell Line of Human Breast Carcinoma Origin”. *European Journal of Cancer*, Volume 15, Issue 5, May 1979, Pages 659-670.  
[https://doi.org/10.1016/0014-2964\(79\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0014-2964(79)90139-7)
- [38] “MDA-MB-231”. Consultado de ATCC el 25 de marzo del 2021.  
<https://www.atcc.org/products/htb-26>
- [39] Valencia, M.L. (2019) “Generación y Caracterización Parcial de Líneas Celulares Cancerosas a Partir de Tejido Tumoral Obtenido de Pacientes con Cáncer de Mama”. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora. Recuperada de:  
<https://www.repositorioinstitucional.uson.mx/handle/unison/4190>
- [40] “Radiación Natural y Artificial”. Consultado de la página del Consejo Nacional de Seguridad Nuclear de España el 28 de marzo del 2021.  
<https://www.csn.es/radiacion-natural-y-artificial2>
- [41] L’Annunziata, M.F. (2012) ”Handbook of radioactivity analysis”. Academic Press. ISBN: 9780123848734
- [42] Talari, A. C. S., Evans, C. A., Holen, I., Coleman, R. E., Rehman, I. U. (2015) “Raman spectroscopic analysis differentiates between breast cancer cell lines.” *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 46, Pp. 421– 427.  
 Doi: 10.1002/jrs.4676.
- [43] Vazquez, F.M. (2021) “Characterization of Mexican Breast Cancer Cell Line by Raman Microspectroscopy and Atomic Force Microscopy”. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora.
- [44] Nieva, C., Marro, M., Santana-Codina, N., Rao, S., Petrov, D., & Sierra, A. (2012). The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PloS one*, 7(10), e46456.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046456>
- [45] “MDA-MB-468”. Consultado de la Wikipedia el 19 de junio del 2021:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/MDA-MB-468>
- [46] Harder, S. J., Matthews, Q., Isabelle, M., Brolo, A. G., Lum, J. J., & Jirasek, A. (2015) “A Raman Spectroscopic Study of Cell Response to Clinical Doses of Ionizing Radiation”. *Applied Spectroscopy*, Vol.69, Issue 2, Pp. 193–204.  
 Doi:10.1366/14-07561
- [47] Matthews, Q., Jirasek, A., Lum, J. J., & Brolo, A. G. (2011) “Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy”. *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 56, Issue 21, Pp. 6839–6855.  
 Doi:10.1088/0031-9155/56/21/006

- [48] M. Lasalvia, G. Perna, P. Pisciotta, F. P. Cammarata, L. Manti, V. (2019) “Raman spectroscopy for the evaluation of the radiobiological sensitivity of normal human breast cells at different time points after irradiation by a clinical proton beam”. *Analyst*, Vol. 144, Issue 6, Pp. 2097-2108.  
DOI: 10.1039/C8AN02155D
- [49] “Módulo de Young”. Consultado de la Wikipedia el 19 de junio del 2021:  
[https://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%B3dulo\\_de\\_Young](https://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%B3dulo_de_Young)
- [50] Lekka, M. Pogoda, K. Gostek, J. Klymenko, O. Prauzner-Behcicki, S. Wiltowska-Zuber, J. Jaczewska, J. Lekki, J. Stachura, Z. (2012) “Cell Recognition. Mechanical Phenotype”. *Micron Journal*, Vol. 43, Issue 12, Pp. 1259-1266.  
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.01.019>.
- [51] Schwickert A, Weghake E, Brüggemann K, Engbers A, Brinkmann BF, Kemper B, et al. (2015) “microRNA miR-142-3p Inhibits Breast Cancer Cell Invasiveness by Synchronous Targeting of WASL, Integrin Alpha V, and Additional Cytoskeletal Elements”. *PLoS ONE*, Vol. 10, Issue 12  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143993>
- [52] “Cáncer”. Consultado de la Wikipedia el 29 de Junio del 2021.  
<https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer>
- [53] D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, J.L. Jameson, J. Loscalzo (2016) “Harrison. Principios de Medicina Interna - 19ed”. McGraw-Hill Interamericana de España.
- [54] Abdullah Farooque, Rohit Mathur, Amit Verma, Vandana Kaul, Anant Narayan Bhatt, Jawahar Singh Adhikari, Farhat Afrin, Saurabh Singh, Bilikere S. Dwarakanath (2011) “Low-dose Radiation Therapy of Cancer: Role of Immune Enhancement”. *Expert Review Anticancer Ther.*, Vol. 11, Issue 5, Pp. 791-802.  
DOI: 10.1586/era.10.217
- [55] M. Acosta (2017) “Estudio Bioquímico y Estructural de Sangre Gamma Irradiada con Nanodiamantes Carboxilados como Precursores de Reoxigenación”. Tesis de Doctorado en Nanotecnología, Universidad de Sonora.
- [56] “Atomic Force Microscopy”. Consultado el 24 de Febrero del 2021.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic\\_force\\_microscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscopy)
- [57] Hanlon, E., Manoharan, R., Koo, T.W., Shafer, K.E., Motz, J.T., Fitzmaurice, M., Field, M. (2000) “Prospects for in vivo Raman spectroscopy” *Physics in Medicine and Biology*, Vol.45, Issue 2.  
doi:10.1088/0031-9155/45/2/201
- [58] Giridhar, G., Manepalli, Apparao, G. (2017) “Confocal Raman Spectroscopy”. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Pp. 141–161.  
doi:10.1016/b978-0-323-46140-5.00007-8
- [59] “Cell Lines - an overview”. Consultado de Science Direct el 20 de marzo del 2021: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cell-lines>
- [60] “Brachytherapy”. Consultado de la Wikipedia el 20 de marzo del 2021:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Brachytherapy>

- [61] Wang, Y., Xu, C., Jiang, N., Zheng, L., Zeng, J., Qiu, C., Yang, H. (2016)  
“Quantitative Analysis of the Cell-Surface Roughness and Viscoelasticity for  
Breast Cancer Cells Discrimination Using Atomic Force Microscopy”. Wiley Pe-  
riodicals, Vol. 38, Pp. 558-563.  
DOI:10.1002/sca.21300