

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a scale of justice, a book, and a sun. Above the shield is a banner with the motto "TODO · LO · ILUMINAN". The shield is flanked by two figures. The entire seal is surrounded by a circular border containing the text "UNIVERSIDAD DE SONORA".

**“Evaluación de Apoptosis y Necrosis
Mediante Microespectroscopía
Raman y AFM”**

TESIS PROFESIONAL TEÓRICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Francisco Martín Vázquez Meza

Repositorio Institucional UNISON



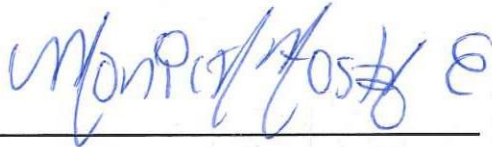
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



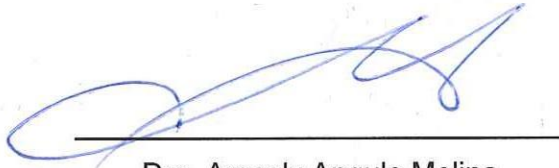
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Francisco Martín Vázquez Meza, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el título de licenciatura en Químico Biólogo Clínico



Dra. Mónica Alessandra Acosta Elías
Presidente



Dra. Aracely Angulo Molina
Secretario



Dra. Lorena Armenta Villegas.
Vocal



M.C. Iracema Del Carmen Rodríguez Hernández
Suplente

DECLARATORIA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Mónica Alessandra Acosta Elías y co-asesoría de Dra. Aracely Angulo Molina en el Laboratorio de Biofísica Médica del Departamento de Investigación en Física (DIFUS), responsable UNISON Dr. Martín R. Pedroza Montero

DEDICATORIA

A mis padres, hermana, abuelos y amigos, por todo su apoyo incondicional

INDICE

FORMA DE APROBACIÓN	2
DECLARATORIA.....	3
DEDICATORIA	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
CAPÍTULO 1. MUERTE CELULAR.....	12
1.1 Apoptosis.....	12
1.1.1 Vía Intrínseca.....	13
1.1.2 Vía Extrínseca	15
1.2 Necrosis	16
1.2.1 Necrobiosis.....	19
1.2.2 Necrofanerosis	20
1.2.3 Necrolisis	20
CAPÍTULO 2. MÉTODOS COMUNES PARA EVALUAR APOPTOSIS Y NECROSIS	22
2.1 Citomorfología	23
2.2. Citometría de Flujo: Ensayo de Anexina V y Fosfatidilserina.....	23
2.3 Ensayo Cometa	25
2.4 Activación de Caspasas.....	27
2.5 Ensayos Mitocondriales	28
2.6 Fragmentación de ADN.....	29
2.7 Ensayos Colorimétricos	32
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTACIÓN DE LA MICROESPECTROSCOPIA RAMAN	35
3.1 Principios de la Microscopía Raman	36
3.2 Microespectroscopía Raman en Sistemas Biológicos	39
3.3 Microespectroscopía Raman en Apoptosis y Necrosis.....	40
CAPÍTULO 4. FUNDAMENTACIÓN DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.....	52
4.1 Principios de Microscopía de Fuerza Atómica.....	52
4.2 Microscopía de Fuerza Atómica en Sistemas Biológicos.....	56

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica en Apoptosis y Necrosis	57
CAPÍTULO 5 VALOR BIOLÓGICO DE LA CORRELACIÓN AFM-RAMAN.....	62
5.1 Aplicación en Necrosis.....	63
5.2 Aplicación en Apoptosis	66
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Tabla comparativa de tipo de muerte celular y picos característicos	50
2.	Espectro Raman de células MCF-7 tratadas con paclitaxel	69
3.	Tabla comparativa de número de espectros vs total de células	70
4.	Tabla comparativa de total de células analizadas vs número de imágenes por célula	72

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cambios morfológicos de célula en apoptosis	13
2	Vías de la apoptosis	14
3	Cambios morfológicos de la célula en necrosis	18
4	Imagen de una sección de páncreas de ratón B6C3F1	23
5	Detección de apoptosis mediada por yoduro de propidio y Anexina V con Citometría de flujo	24
6	Clasificación de la morfología del núcleo según el nivel de daño al ADN	26
7	Ensayo de caspasas donde a células se les indujo apoptosis con actomicina D	28
8	Imagen del miocardio de rata de 14 semanas tratada con Efedrina y cafeína	30
9	Imagen del patrón de escalera de ADN en gel de agarosa	31
10	Ensayo MTT de la viabilidad celular de células SiHa al ser expuestas a nanopartículas de magnetita, alfa TOS y alfa TOS-Np	33
11	Esquema del proceso para la toma de espectros Raman	36
12	Dispersión Raman (inelástico) y Rayleigh (elástico) en una molécula.	37
13	Principios básicos de Raman	38
14	Espectro Raman de células Saos-2	42
15	Espectro Raman de células SW-1353	44
16	Espectro Raman de células no tratadas y apoptóticas	45
17	Media del espectro Raman de las células control vs células con apoptosis	46
18	Media del espectro Raman de células en necrosis primaria, secundaria y autofagia	47
19	Espectro Raman de mitocondria de levadura después de ser expuesta in vivo a diferentes concentraciones de ácido acético por 60 min	48
20	Espectro Raman de mitocondria de levadura después de ser expuesta in vitro a 20 mM de ácido acético a diferentes tiempos	49
21	Diagrama de AFM y principio	52
22	Topografía de superficies celulares detectado por AFM después de ser tratadas con extracto de agua de raíz de ginseng	59
23	Imagen AFM de fragmentos de ADN aislados de células MFC- 7 tratadas con TMPyP	61
24	Imagen de espectro Raman(a), imagen Raman (b) y AFM(c) de masa tumoral en tejido de seno	62
25	Imagen AFM de superficie de células ASTC-a- 1 después del tratamiento con 70 mM de taxol después de 0, 6, 12, 24 horas.	63
26	Imágenes AFM de células: Ishikawa y HeLa	64
27	Espectro Raman de células en muerte celular por necrosis	65
28	Análisis AFM de la altura y el mapeo de deformación elástica de las células MCF7 después de 3 horas de incubación con paclitaxel	67
29	Espectro Raman de paclitaxel.	68

RESUMEN

En esta revisión, se presentan los avances más recientes del uso de la microespectroscopía Raman y AFM en la evaluación de los dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis. La apoptosis también recibe el nombre de muerte celular programada. La necrosis es un mecanismo más desordenado y que genera inflamación en su entorno. Para ciertos procesos biológicos es fundamental determinar el tipo de muerte celular y alteraciones en los componentes celulares, antes, durante o después de un tratamiento o exposición a una sustancia. Actualmente existen técnicas convencionales para tal fin como son las tinciones citomorfológicas, la citometría de flujo, ensayo cometa, activación de caspasas, ensayos mitocondriales, fragmentación de ADN y ensayos colorimétricos de viabilidad, entre otros. Sin embargo, suelen ser técnicas que requieren una gran cantidad de muestra y son invasivas. Existen otras metodologías emergentes en el área biomédica, como la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la microespectroscopía Raman. Estudios recientes muestran el potencial de estas metodologías para detectar huellas y marcadores bioquímicos y topográficos asociadas a etapas tempranas y tardías de muerte celular y que permiten diferenciar entre apoptosis y necrosis. Estas metodologías brindan información nueva, incluso a nanoescala, que puede complementar y enriquecer la información de las técnicas convencionales sobre los mecanismos y tipos de muerte celular.

INTRODUCCIÓN

El cese de las funciones vitales de una célula puede ocurrir por diferentes mecanismos como son la apoptosis y la necrosis. La Apoptosis es un proceso programado de muerte celular en el cual ocurren ciertos procesos bioquímicos y citomorfológicos. En el mismo sentido la necrosis lleva a la muerte celular, pero de una forma más desordenada que conlleva a otras alteraciones. (Brauchle et al. 2014)

La evaluación de la muerte celular es indispensable para cualquier estudio enfocado a la búsqueda de principios activos, o a la síntesis de sustancias con fines medicinales, como es la terapia antitumoral. Para la identificación de ambos procesos se utilizan habitualmente técnicas como son Anexina V, Yoduro de propidio, Citomorfología, Rodamina, Anexina-Fosfatidilserina, utilización de fluorocromos que detectan daño al DNA, entre otros. Sin embargo, estos métodos son invasivos y requieren gran cantidad de muestra. Por lo tanto, en el grupo de trabajo de Biofísica Medica estamos interesados en utilizar las técnicas de microespectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para evaluar el fenómeno de muerte celular en células tumorales. (Lin et al. 2018)

En el caso de la espectroscopía Raman, es una tecnología óptica libre de marcadores que permite el análisis continuo de eventos dinámicos de muerte en células individuales. El sistema utiliza un láser monocromático para investigar los distintos modos vibracionales de los componentes moleculares de la célula en su entorno fisiológico. A esta constitución molecular se le denomina huella bioquímica y podemos monitorearla a lo largo de un tratamiento, buscando modificaciones o alteraciones celulares, a diferencia de los métodos tradicionales que no brindan tal información a ese nivel. (Ghita et al. 2015)

Por otra parte, la Microscopía de Fuerza Atómica nos permite evaluar a nivel nanométrico la alteración de la membrana celular, mostrando cambios en la rugosidad, forma, volumen, etc.; que pueden estar presentes durante el proceso de muerte y que ninguna otra técnica nos puede proveer a tal escala. (Chtcheglova and Hinterdorfer 2018). Por esta razón, en esta propuesta de tesis describiremos la evaluación de apoptosis y necrosis con métodos emergentes y novedosos como son la Microespectroscopía Raman y Microscopía de Fuerza Atómica. Ambas técnicas, permiten un monitoreo no invasivo y continuo de la muerte celular. Es poco lo que se conoce en el medio académico y en el de investigación de sus aplicaciones. De ahí nuestro interés en hacer esta revisión, describiendo las bases teóricas que las sustentan, y difundir las aplicaciones existentes.

OBJETIVO GENERAL

Hacer una revisión de la aplicación de la microscopía Raman y Microscopía de Fuerza atómica (AFM) en el estudio de la muerte celular mediada por apoptosis y necrosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Hacer una revisión de los diferentes mecanismos de muerte celular y los métodos para su estudio.
2. Describir el fundamento y la aplicación de la microespectroscopía Raman y microscopía de fuerza atómica en apoptosis y necrosis.
3. Investigar y correlacionar el valor biológico del estudio de apoptosis mediante AFM-Raman.

CAPÍTULO 1. MUERTE CELULAR

Las células mueren por distintas razones, se ha observado que siguen diferentes caminos para lograr su objetivo. Entre los procesos más comunes de muerte celular se encuentran la apoptosis y necrosis. El término apoptosis (del griego: caída) fue propuesto inicialmente por botánicos, pero a inicios de 1970, los científicos escoceses Kerr, Wyllie y Currie lo retomaron para describir la muerte de células en el hígado, que después de encogerse y deteriorarse se desprendían de este órgano. En el año de 1972 se concluyó que la muerte celular debía tener un origen genético, en este proceso se observaban cambios en la morfología celular los cuales llevaban a su muerte. Se observó que en este proceso participaban fagocitos, dándosele el nombre de apoptosis.(Kvansakul, Caria, and Hinds 2017; Rahbar Saadat et al. 2015)

1.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso activo regulado de manera genética que lleva a la realización de procesos vitales y patológicos que concluye con cambios en la morfología de las células y a su consecuente muerte.(Derakhshan and Derakhshan 2015)

La apoptosis actúa como un proceso de muerte celular programado, lo que la convierte en una acción esencial para el removimiento de células infectadas, dañadas y superabundantes. Este proceso es requerido para el desarrollo normal de la composición y propiedades del tejido y poder combatir la infección. La importancia de reconocer la morfología microscópica para la diferenciación de muerte celular reside en términos médicos, debido a que esta juega un rol importante en el mantenimiento de homeostasis de tejido, trastornos degenerativos, etc.(Okamoto et al. 2017)

La morfología celular cambia durante la apoptosis, se empieza por el encogimiento de la célula y la condensación de la cromatina y la formación de protuberancias en la membrana. Posteriormente los fragmentos y organelos empiezan a formar los cuerpos apoptóticos que eventualmente son receptados por macrófagos o células vecinas resultando en su endocitosis y fagocitosis. La falta de liberación de componentes celulares al fluido extracelular evita la inflamación(Figura 1).(Abou-Ghali and Stiban 2015)

La apoptosis se inicia por un estímulo externo basado en su origen, con dos vías la intrínseca y extrínseca que conllevan una cascada de señalizaciones que activarán biomarcadores que se encargarán de llevar a cabo la muerte celular. (Abou-Ghali and Stiban 2015)

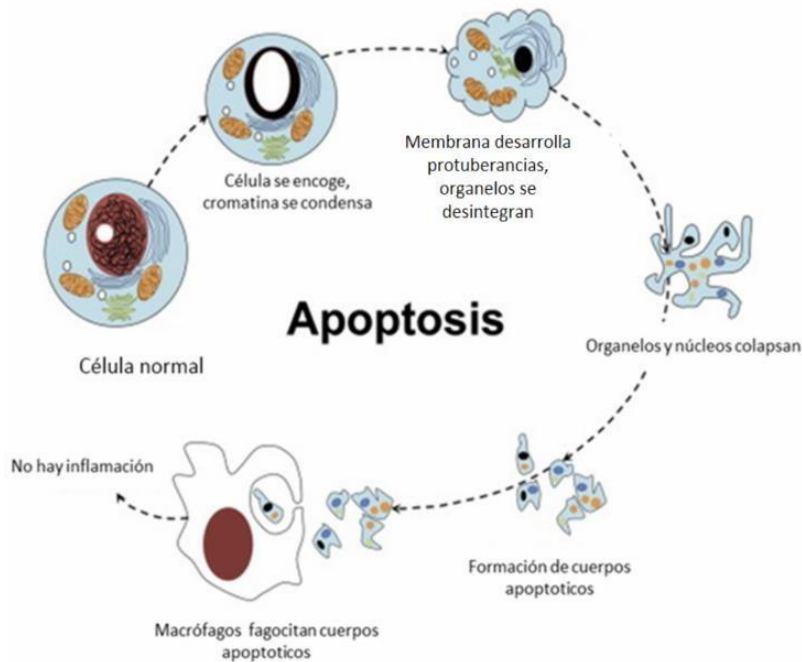


Figura 1. Cambios morfológicos de célula en apoptosis.

Fuente:(Abou-Ghali and Stiban 2015)

1.1.1 Vía Intrínseca

La vía intrínseca es precedida por diferentes estímulos como daño genético causado por radiaciones electromagnéticas como son: los rayos ultravioletas, radiaciones gamma y agentes quimioterapéuticos(Figura 2).(Zeestraten et al. 2013)

En este proceso los reguladores primarios son la familia de proteínas Bcl-2 (célula-B de linfoma 2), estas tienen la función de mantener vivas las células, así como la capacidad de determinar si una célula llevará a cabo el proceso de muerte celular o, en su caso sobrevivirá. Por otra parte dentro de los miembros que promueven el deceso celular se encuentran BAX (BCL-2 asociado a X), BAK (BCL-2 homólogo antagonista / asesino) BOK (Bcl-2-relacionado ovario asesino) estos posibilitan la permeabilización de la membrana de la mitocondria, lo cual provoca que se libere citocromo C hacia el citosol, el cual se combina con Apaf-1 (factor de activación de proteasas en apoptosis) para reclutar la caspasa-9 que ayuda a formar el apoptosoma, que subsecuente activa la caspasa-9 y se estimula la actividad de la caspasa-7 y caspasa-3, que rompen sus sustratos

para permitir a la célula realizar otras funciones. (Zeestraten et al. 2013). De los substratos más importantes se encuentra el inhibidor de la caspasa-activada desoxirribonucleasa, que al fraccionarse permite su activación y provocara un cambio en el genoma de la célula conocido como fragmentación del ADN que es un fenómeno recurrente en células en proceso de apoptosis.(Novaleski et al. 2017)

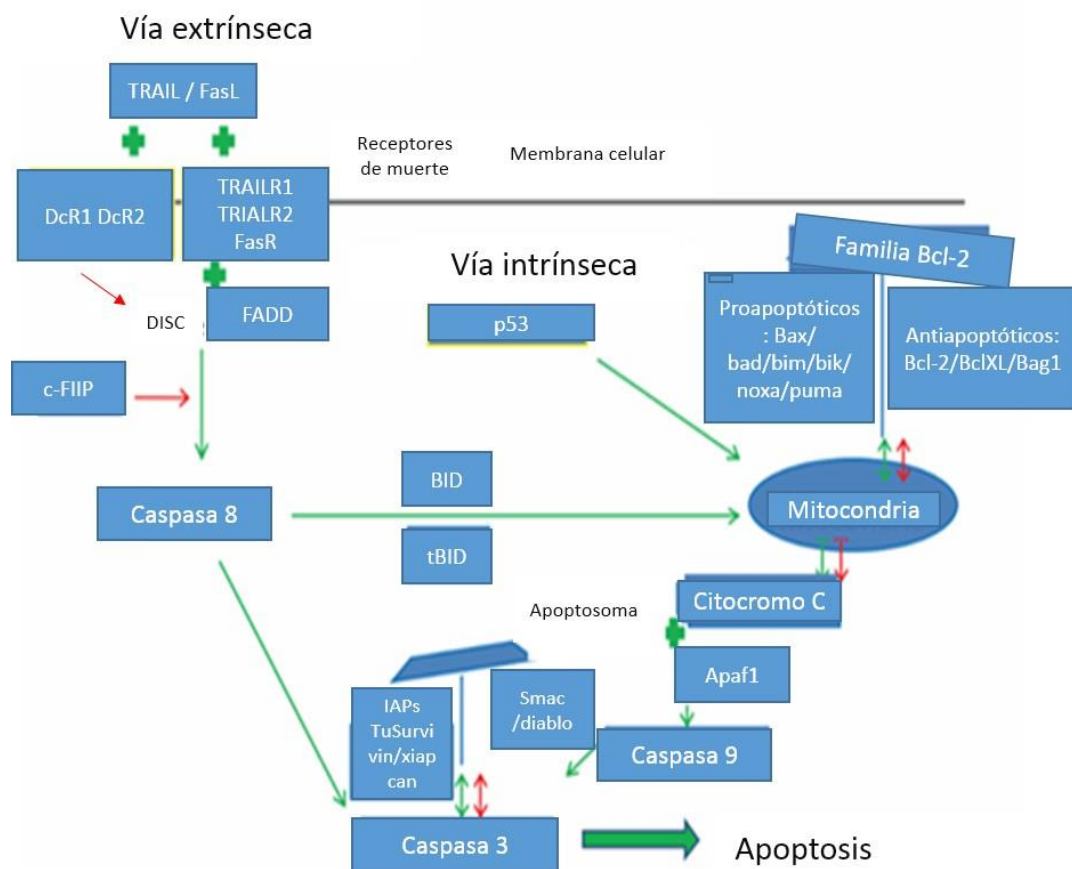


Figura 2. Vías de la apoptosis.

Fuente (Zeestraten et al.2013)

Es importante mencionar que la actividad de promotores de apoptosis como son: BAX y BAK es contrarrestada por las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (BCLW (Proteína 2 similar a Bcl-2), BCLXL (Linfoma de células B extragrande), MCL1 (Leucemia de células mieloides 1) y A1, que previenen su la apoptosis y la homomultimerización de proteínas apoptóticas. BAX es un blanco transcripcional de p53 mientras que Bcl-2 es negativamente regulada por este. (Okamoto et al. 2017)

En la vía intrínseca se ve afectado en núcleo de la célula, donde existe un daño en el código genético, estrés oxidativo y otros estímulos. Al involucrarse la mitocondria y el retículo endoplasmático, estos estímulos causan la activación de vías señalización provocando un desbalance entre señales que estimulan o inhiben la apoptosis, provocando la porosidad de la membrana mitocondrial y se liberen enzimas internas que causaran que se lleve a cabo el proceso de apoptosis. (Jiang and Yue 2014)

1.1.2 Vía Extrínseca

Otra de las rutas que inician el proceso de apoptosis es la vía extrínseca, esta es activada debido a respuestas inmunes causada con la interacción de los receptores de muerte celular y sus ligandos. La vía extrínseca es activada en respuestas inmunes causada por la interacción de los receptores de muerte celular y sus ligandos. (Kim et al. 2017) En este proceso se lleva a la formación de un complejo de señalización de muerte celular que posteriormente se une a FADD (Fas-asociado a proteína con domino de muerte) que es una proteína de señalización que a su vez contiene proteínas como el dominio efector de muerte que se encarga de reclutar a la caspasa-8 para activar la cascada de señalización de caspasas. Lo cual llevara a la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria que permitirán la liberación del citocromo C al espacio intermembranal activando caspasas, lo que termina en una muerte celular apoptótica. (Okamoto et al. 2017)

El proceso llevado a cabo en esta vía ocurre de manera muy rápida, los ligandos activan a las caspasas en cuestión de segundos. Al unirse los ligandos con los receptores provocan la trimerización de estos últimos lo que amplifica la señalización que se requiere para llevar a cabo el proceso de apoptosis. (Pećina-Šlaus 2010)

Dentro de la célula los niveles de calcio son un factor importante en su supervivencia, se ha convertido en un mensajero fundamental que realiza gran cantidad de funciones fisiológicas como son el acople excitación-contracción en las fibras musculares, la comunicación celular, la

secreción, el crecimiento, los niveles de este ion influyen en muerte celular ya que es dependiente de calcio, donde la sobrecarga de este puede mediar la apoptosis intrínseca en la mitocondria y el retículo endoplásmico. En la mitocondria tBid (BID truncado) promueve la oligomerización de BAX y BAK, las cuales permeabilizan la membrana y hacen que se libere citocromo C hacia el citosol. (Bruce 2018)

Las características microscópicas del proceso de apoptosis incluyen la marginación y condensación de cromatina, fragmentación nuclear, fruncimiento de la membrana plasmática, la cual mantiene su estructura hasta las fases finales del proceso. Los macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales llevan a cabo el proceso de fagocitosis en la apoptosis.(Caruso et al. 2014)

En los últimos 40 años, la apoptosis ha sido considerada como el único tipo de muerte celular programada. En cambio su contraparte, la necrosis, es una muerte celular pasiva no deseada, no susceptible a manipulación terapéutica que es causada por la exposición a un estrés físico, químico o radioactivo.(Cho 2014)

1.2 Necrosis

La necrosis es una serie de eventos que llevan a la ruptura de la membrana citoplasmática y a la consecuentemente fuga del material intracelular que logra desencadenar una reacción inflamatoria. Es una forma de daño celular que causa la muerte prematura de las células en el tejido vivo. La necrosis es causada por factores externos a la célula o tejido, como infecciones, toxinas o trauma, que dan lugar a la digestión no regulada de componentes de la célula. Este fenómeno promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y favorece la dispersión de patógenos en un hospedero susceptible. La necrosis inducida por deficiencias de adenosina trifosfato (ATP) ocurre en las alteraciones de flujo sanguíneo como isquemia y cuando hay alteraciones de las funciones dependientes de oxígeno y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. (Ramírez Agudelo and Rojas López 2010)

La necrosis ocurre también como consecuencia de estrés psicoquímico severo, como el calor, choque osmótico, estrés mecánico, ciclo hielo-deshielo y una alta concentración de peróxido de hidrógeno. En estas condiciones, la muerte celular ocurre rápidamente debido al efecto directo del estrés celular y por lo tanto este tipo de muerte celular se define como accidental y descontrolado. (Vanden Berghe et al. 2013)

El proceso para inducir la muerte celular necrótica sigue una serie de pasos y eventos de señalización como con la interacción de receptores RIPK1 y RIPK3 o también conocidos como receptores de interacciones proteína-quinasa.(Vanden Berghe et al. 2013)

La necrosis es resultado de un desbalance grave del equilibrio celular que afecta el metabolismo celular con disminución radical del contenido energético celular en forma de ATP, perturbación del contenido iónico, incremento del volumen mitocondrial y celular, y con activación de proteasas intracelulares. Este proceso termina con el rompimiento de la membrana celular y liberación del contenido celular que promoverá una reacción inflamatoria secundaria. El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica. Durante el proceso de necrosis la célula experimenta 3 fases principales: necrobiosis, necrofanerosis y necrolisis. Las principales características de la necrosis, es que sucede de manera accidental traumática y es inducida por un daño celular o tisular. La célula sufre un hinchamiento, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegra de forma desordenada. El rompimiento de la membrana lleva a la liberación del contenido celular al espacio extracelular, asociada con inflamación. La necrosis es caracterizada por una hinchazón celular en lugar de condensación, floculación de cromatina, agrandamiento de la mitocondria y el retículo endoplasmático, rompimiento de la membrana plasmática y la separación del contenido citoplasmático al espacio extracelular con una seguida inflamación. El núcleo no se condensa, ni la cromatina es procesada, a diferencia de la apoptosis. El DNA se degrada, de manera más tardía y da como resultado un muestrario de fragmentos más continuo en cuanto al tamaño, en lugar del efecto "escalera" de la apoptosis que se observa en los corrimientos electroforéticos de ADN de células que murieron por apoptosis. La activación de las nucleasas se realiza por otro mecanismo (Figura 3).(Caruso et al. 2014)

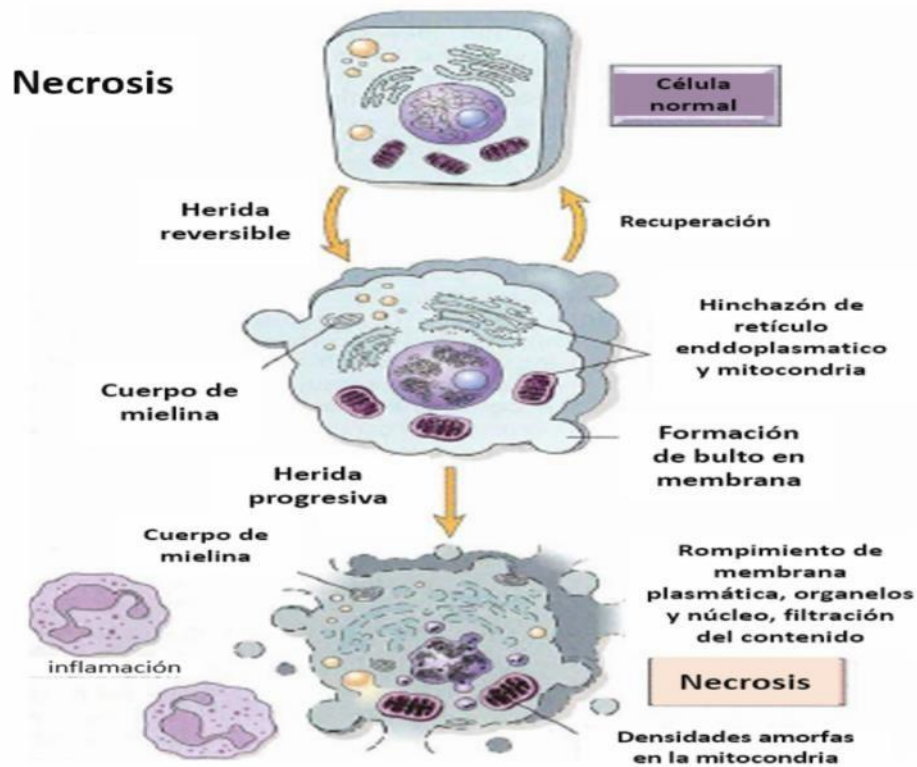


Figura 3. Cambios morfológicos de la célula en necrosis.

Fuente:(Proskuryakov, Konoplyannikov, and Gabai 2003)

Estos cambios se deben a eventos moleculares definidos que incluyen la elevación de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, mayor consumo en los canales de calcio, activación de proteasas no apoptóticas, hinchamiento de la mitocondria, agrupamiento perinuclear de organelos y destrucción enzimática de los cofactores necesarios para que se produzca ATP, lisis de células e inflamación. Estas discapacidades se aumentan mutuamente. Son prácticamente irreparables e irreversibles. (H. Vázquez-Nin, Luisa Escobar, and M. Echeverría 2011)

La mitocondria tiene un sistema de permeabilidad de membrana asociado a necrosis, llamado poro de transición de permeabilidad (PTP), al abrir este se incrementa la permeabilidad de tanto la membrana mitocondrial externa, como interna llevando a cabo la liberación de solutos con un peso molecular menor a 1500 Da (Dalton) y llevando al equilibrio de estos solutos en la membrana mitocondrial.(Arakawa et al. 2015)

La necrosis regulada puede ocurrir a través de varios eventos como necroptosis, *ferroptosis*, piroptosis. La necroptosis requiere la interacción de las cinasas RIPK1 y RIPK3 (Receptores de

interacción proteína-cinasa), y la fosforilación de MLKL (Dominio de linaje cinasa o pseudocinasa) bajo condiciones donde la caspasa-8 no esté activada. La ferroptosis ocurre con incremento en la peroxidación lipídica hierro-dependiente causando la reducción del glutatión y su inhibición por la ferrostatina-1.(Martin-Sanchez et al. 2018)

La necroptosis, sin embargo es un proceso que no todos los tipos de células pueden llevar a cabo el proceso, debido a que dependerá, si existe, o no, la presencia de RIPK3, que dicta la habilidad de una célula para someterse a necrosis programada, por lo tanto a las células sin RIPK3 como HeLa y Hek293 serán incapaces de activar el proceso de necroptosis.(Iorga, Dara, and Kaplowitz 2017)

La necrosis puede ser mediada por PARP1 polimerasa Poli-(ADP-ribosa), esta cataliza la transferencia de ADP-ribosa de la NAD⁺ hacia varias proteínas nucleares. La activación excesiva de PARP1, como en una herida de isquemia, puede llevar a una inhibición glucolítica y eso causa la paralización de producción de ATP a través del metabolismo de glucosa. La reducción del ATP llevará a la subsecuente disminución de viabilidad celular. (Ying and Padanilam 2016)

Anteriormente se pensaba que la necrosis era un evento accidental y no regulado, sin embargo, nueva evidencia demuestra que puede llegar a ser un evento regulado. La necrosis regulada es llamada necroptosis. La necrosis programada puede ser inducida por receptores de muerte asociados a membrana plasmática de la superfamilia de TNF (factor de necrosis tumoral), receptores tipo T y receptores tipo Toll. (Chan 2014)

1.2.1 Necrobiosis

La necrobiosis es un proceso celular que oscila entre el momento en que la célula muere y el instante en que se presenta la necrofanerosis. Durante este periodo no existen cambios morfológicos observables usando la microscopía común y corriente; este proceso tiene una duración aproximada de 6 a 8 horas. Usando la microscopía de fase contrastada son observables algunas alteraciones nucleares a las 2 horas ocurrida la muerte celular y a las 4 horas: núcleo granular y núcleo con halo brillante, respectivamente. En cambio, usando microscopio electrónico las primeras alteraciones irreversibles aparecen en las primeras 2 horas iniciadas una isquemia experimental en el epitelio hepático y tubular renal y de 20 a 60 minutos en las fibras miocárdicas. El concepto de necrobiosis nació de la microscopía de luz. (Cassiani Miranda and Borrero Varona 2013)

1.2.2 Necrofanerosis

La necrofanerosis es resultado del fracaso energético agudo, alteración de la morfología celular y, finalmente, lisis con desencadenamiento de procesos inflamatorios. En este tipo de necrosis existen procesos que permiten la activación de enzimas proteolíticas características de la vía apoptótica.(Cassiani Miranda and Borrero Varona 2013)

La morfología característica de necrofanerosis es observable completamente con microscopía óptica, se presenta después de 6 horas de ocurrida la muerte celular y pueden persistir días o semanas e incluso meses. Las alteraciones morfológicas que pueden ser visualizadas en el citoplasma son hipereosinofilia, desintegración de membrana, mientras que en el núcleo se observa picnosis, cariólisis, cariorexis. El proceso de necrolisis consiste en la desintegración y disolución de la célula necrótica, evento que en ciertas condiciones se acompaña de infiltración de células polinucleares y remoción del detritus celular por macrófagos.(de Castro del Pozo and Arellano 2006)

En bioquímica, los eventos apoptóticos está la translocación de fosfatidilserina del lado citoplasmático de la membrana hasta el extracelular, activación de las cascadas de caspasas, liberación de factores mitocondriales (citocromo c) hacia el citoplasma, un proceso activo dependiente de ATP y una fragmentación del ADN de longitud mono y *oligonucleosomales*. Las características necróticas no requieren aporte de energía, pérdida de la regulación de homeostasis iónica, digestión espontánea y una fragmentación pos-lítica de ADN.(Wang 2014)

1.2.3 Necrolisis

Se conoce como el proceso donde la célula necrótica se desintegra y disuelve, que en condiciones específicas se acompaña de infiltración de células polinucleares y la remoción del detritus celular por medio de fagocitosis por parte de los macrófagos.(Kinoshita and Saeki 2017)

Aunque los mecanismos y morfología de apoptosis y necrosis difieren, estas coinciden en ciertas características, ambos tienen una disminución de en la disponibilidad de caspasas y ATP intracelular. El tipo de muerte celular que experimentara la célula depende de varios factores como el tipo de tejido, etapa de desarrollo y ambiente fisiológico. Al usar histología convencional, no siempre es fácil distinguir entre apoptosis y necrosis, ya que pueden ocurrir

simultáneamente dependiendo de la intensidad y duración del estímulo, la extensión de la disminución de ATP y la disponibilidad de las caspasas. (Elmore 2007)

Existe evidencia que sugiere que ambos sistemas de muerte celular pueden ser expresiones morfológicas de un mismo canal bioquímico llamado "*apoptosis-necrosis continuum*". En el sentido de muerte celular por apoptosis la manipulación genética o farmacología de los sucesos dentro de la célula, tales como la inhibición química de las caspasas o alteraciones del sistema Redox es mediado a través de la disminución de glutatión interno por *Butionina Sulfoximina*, o también se promueve al ser incubado con componentes prooxidantes como el peróxido de hidrogeno, y así cambiar el tipo de muerte celular. Sin embargo, el conocimiento de la posibilidad de cambiar el fenotipo de una célula en necrosis a apoptosis se mantiene como incógnita. (García-Belinchón et al. 2015)

CAPÍTULO 2. MÉTODOS COMUNES PARA EVALUAR APOPTOSIS Y NECROSIS

La evaluación de la apoptosis ha ido adquiriendo más interés en los últimos años tanto en la rama de la biología como en la toxicología, una detección a tiempo de apoptosis puede ayudar en el diagnóstico temprano de enfermedades relacionadas y la evaluación continua de fármacos. Por lo tanto, es indispensable desarrollar métodos que permitan su evaluación. Además, la demanda por el estudio de las etapas tempranas de apoptosis está llevando a soluciones para monitorear las muertes cinéticas en tiempo real. La observación de apoptosis por la microscopía electrónica es considerada el estándar de oro para caracterizarla. Sin embargo, se requiere de un profesional con mucha experiencia y habilidad en la preparación de muestras para llevarlo a cabo de manera correcta. El análisis cuantitativo no puede realizarse, lo que podría limitar su aplicación a gran escala. Varias estrategias alternativas han sido exploradas, por ejemplo las caspasas, una familia de proteínas que está relacionada con muerte celular, se usa como marcadores de apoptosis.(Hasanzadeh, Shadjou, and de la Guardia 2017)

La microscopía electrónica tiene varias desventajas para su uso en el estudio de apoptosis, como que el tiempo invertido y el equipo resultan más costosos. Sin embargo, tiene un gran poder de resolución, por lo tanto, provee información mucho más detallada de la morfología celular. Este método es considerado como el más acertado para la distinción de apoptosis y necrosis en cultivos celulares. La preparación de las células muertas para el microscopio electrónico no es adecuada, debido a que estas se separan de su substrato y la manipulación de estas células podría alterar su morfología. La detección de las modificaciones citomorfológicas por apoptosis incluye la condensación del núcleo y citoplasma de las células. Para poder detectar estos cambios las células deben ser tratadas con hematoxilina y eosina y visualizadas bajo la luz del microscopio. La morfología de necrosis es caracterizada por el hinchamiento de la célula y de los organelos citoplasmáticos, así como una pérdida acelerada de la integridad de la membrana plasmática. La morfología del núcleo se mantiene intacta hasta etapas tardías.(Vanden Berghe et al. 2013)

2.1 Citomorfología

La apoptosis se puede observar en bordes enteros de embriones o tejidos usando colorantes como naranja de acridina, sulfato de Nilo azul y rojo neutro (Figura 4). Estos colorantes tienen propiedades acidófilas, que se concentran en áreas de alta actividad lisosomal y fagocítica. Sin embargo, no son suficientes para la detección de apoptosis porque los colorantes no pueden distinguir entre lisosomas degradando restos apoptóticos de otros microorganismos, por lo tanto se debe de hacer uso de otras técnicas más especializadas. (Elmore 2007)

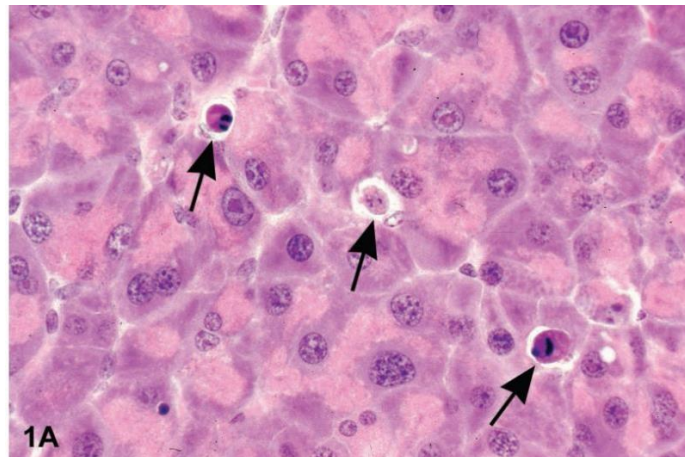


Figura 4. Imagen de una sección de páncreas de ratón B6C3F1. Las flechas indican células apoptóticas que se encogen con citoplasma condensado y el núcleo se fragmenta.

Fuente: (Elmore 2007)

2.2. Citometría de Flujo: Ensayo de Anexina V y Fosfatidilserina

En las etapas tempranas de la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular, que siempre han sido complicados de reconocer. Una de estas alteraciones es la translocación de la fosfatidilserina de la capa interna a la externa, donde esta porción queda expuesta en la superficie externa de la célula. La Anexina V es una proteína dependiente de calcio que se une al fosfolípido. Esta translocación también ocurre durante la muerte celular necrótica, sin

embargo, en las primeras etapas de apoptosis la membrana celular se mantiene intacta mientras que en el momento que ocurre la necrosis la membrana pierde su integridad y se agujera. Por lo tanto, la medición de Anexina V que se une a la superficie celular es indicativa de apoptosis y tiene que ser llevada a cabo en conjunto con la exclusión de tinte para establecer si la membrana celular mantiene su integridad (Figura 5). (Vermes et al. 1995)

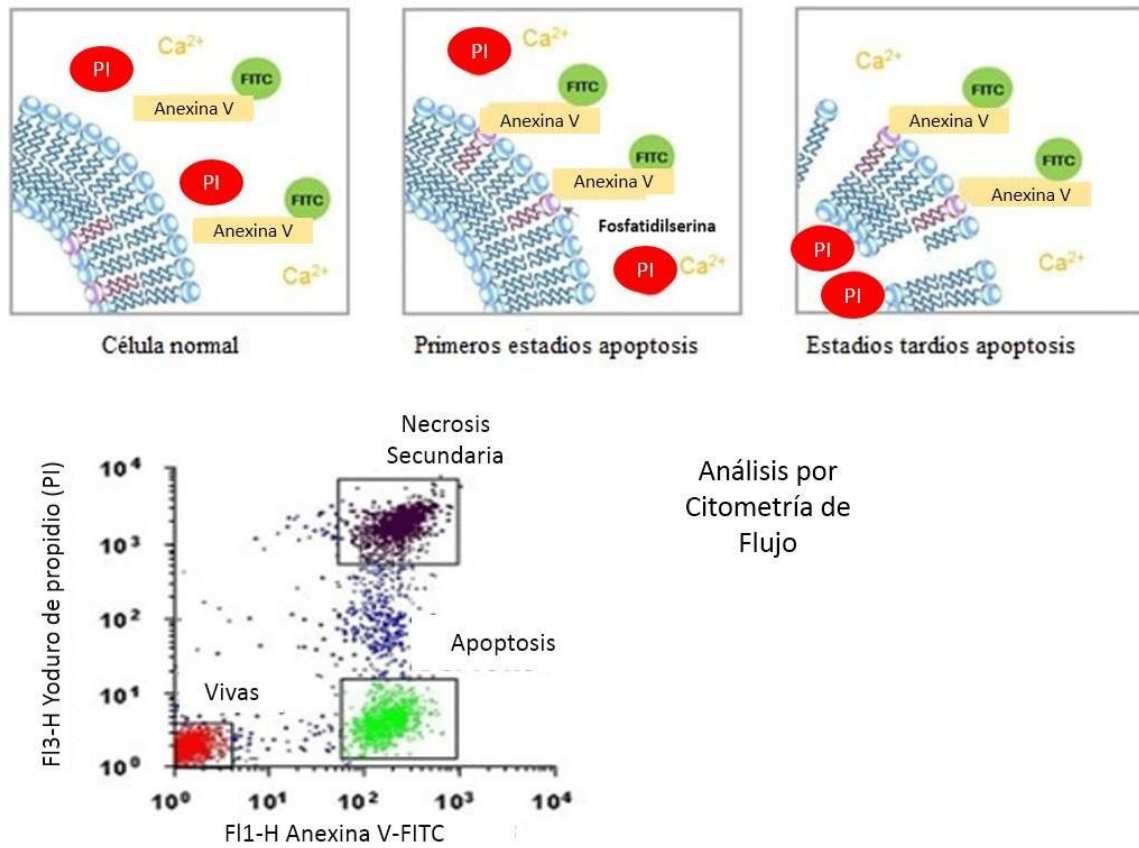


Figura 5. Detección de apoptosis mediada por yoduro de propidio (PI) y Anexina V con citometría de Flujo. En los primeros estadios de apoptosis se externaliza la fosfatidilserina y se marca con Anexina V-FITC. En los estadios más tardíos, la membrana celular de permeabiliza lo que permite la entrada del IP al interior celular y así marcar el ADN.

Fuente: (Dominguez Gortaire 2017)

Este método es utilizado para contar el número de células que están llevando a cabo el proceso de apoptosis, esta será detectada inicialmente tiñendo las células con Anexina V, prosiguiendo con una solución de yoduro de propidio seguido por el análisis de citometría de flujo. Este método está basado en el principio de que las células son hidrofóbicas en la

naturaleza mientras expresan fosfatidilserina en la membrana interna y cuando las células llevan a cabo la apoptosis, esta membrana se invierte exponiendo la fosfatidilserina. Esta es detectada por la Anexina V, mientras que el yoduro de propidio tiñe a las células muertas que tienen ADN fragmentado y ayudan a diferenciar las células apoptóticas y necróticas. (Lakshmanan and Batra 2013)

Se utilizan fluoróforos que son conjugados por la Anexina V que permiten el marcado eficiente de las células apoptóticas. La salida de la fosfatidilserina hacia el espacio extracelular es uno de los eventos tempranos que suceden en la apoptosis. También se utilizan colorantes de unión al ADN como 7-aminoactinomicina o yoduro de propidio, los cuales penetran la membrana celular durante las etapas tardías de la apoptosis y necrosis. Este proceso permite la diferenciación entre células sanas y células en proceso de apoptosis temprana o tardía y necrosis. (Bozza et al. 2016)

2.3 Ensayo Cometa

El ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales se utiliza para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio entre otros. Este ensayo se caracteriza por ser sencillo, sensible, versátil, rápido y económico. (Rodríguez-Rey, Noris-García, and Fundora Torres 2016)

Es una poderosa técnica que se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ADN después que las células son puestas en agarosa, lisadas y se someten a una electroforesis alcalina. La elongación de la fragmentación del ADN que ocurre durante la apoptosis permite que la mayoría del ADN se aleje del núcleo. Los núcleos se someten a electroforesis y se tiñen generalmente con bromuro de etidio. El ADN fragmentado avanza impulsado por el campo eléctrico, generando una imagen similar a la cola de un cometa. Esa imagen puede ser observada por microscopía de fluorescencia. Las células que no presentan fragmentación, no generan esta imagen. (Rodríguez-Rey, Noris-García, and Fundora Torres 2016)

Los núcleos dañados se pueden distinguir de los no dañados por su apariencia distintiva, ya que se observa casi una migración total de ADN del núcleo o también llamada, la cabeza de cometa hacia la cola del cometa (Figura 6). (Muñoz Aristizábal 2009)

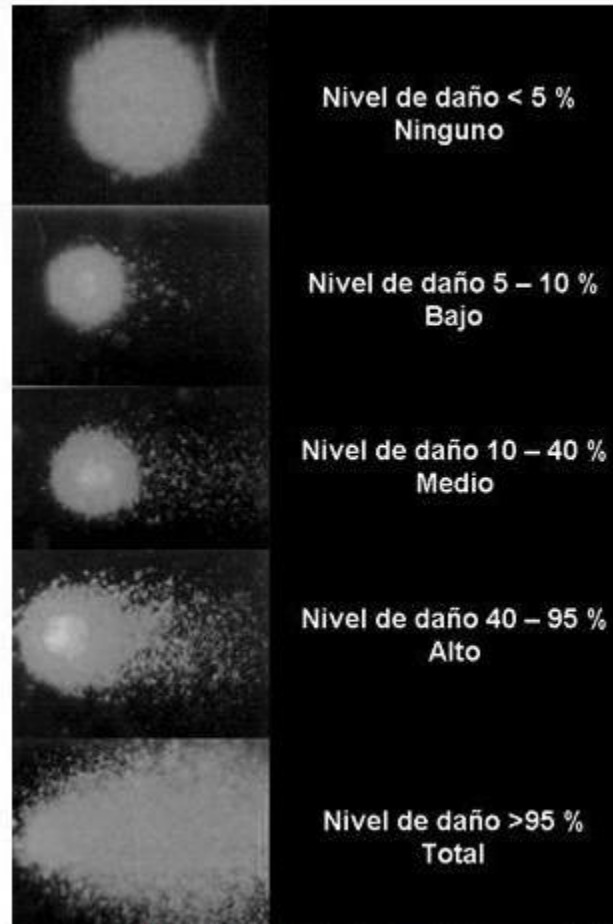


Figura 6. Clasificación de la morfología del núcleo según el nivel de daño al ADN.

Fuente: (Muñoz Aristizábal 2009)

Las muestras de ADN o extractos totales se desnaturalizan con un buffer de carga y se calientan a 95°C durante 5 minutos. Luego las muestras se cargan en una cámara en el gel de agarosa desnaturalizado al 10, 12 ó 15%. Después, se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder y durante un periodo determinado por el usuario se deja pasar la corriente eléctrica, usualmente se corre a 70 Voltios para un gel de agarosa y 25 mA para un gel de agarosa durante una hora. Una vez terminada la corrida, el gel es teñido con una solución específica para visualizar las moléculas separadas. Por lo general se usa azul de Coomassie para la tinción de proteínas y bromuro de etidio para ácidos nucleicos. Posterior a la tinción el gel es escaneado y con la ayuda de un software se mide la concentración de las moléculas separadas de manera individual, obteniéndose como resultado bandas debidas a la muerte

celular, ya sea apoptótica o necrótica asemejara una escalera. (O'Callaghan, Woods, and O'Brien 2001)

Este método es rápido y sensible para la detección del daño de ADN en células individuales, que es inducido por una gran variedad de agentes genotóxicos. Este método fue introducido por primera vez en 1984 por O'stling y Johanson. El análisis provee tres parámetros importantes para cada cometa: longitud de cola, intensidad de la fluorescencia de cola y momento de cola. (Shaker and Melake 2012) Este ensayo se utiliza para cuantificar el daño en el ADN en células de mamíferos y es compatible con la detección de una amplia gama de agentes que dañan el ADN. El porcentaje del ADN fragmentado en la cola de cometa es directamente proporcional al daño que ha sufrido el ADN (Brunborg et al. 2014)

2.4 Activación de Caspasas

Los principales sustratos de las caspasas iniciadoras suelen ser las caspasas con predominio pequeño, conocidas como caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). Estas últimas son las que desmontan las estructuras celulares, hacen apetitosa a la célula para los macrófagos y dan lugar al fenotipo apoptótico. Por ejemplo, la caspasa-3 rompe a la proteína inhibidora de CAD (DNasa Activada por Caspasas) con lo que CAD realiza la degradación oligonucleosomal del ADN (patrón en "escalera") típica de la apoptosis. Los productos de la degradación del DNA son fragmentos nucleosomales u oligonucleosomales que generan el característico patrón en escalera en electroforesis de geles de agarosa. (; Villamor 2004)(; Villamor 2004)(; Villamor 2004)(; Villamor 2004)(; Villamor 2004)(; Villamor 2004)

La activación de caspasas es profundamente regulada por polipéptidos de transcripción y antiapoptóticos. De los diferentes métodos el análisis de la actividad de caspasa es el análisis de pro-caspasa por "inmunoblotting", estudio de la actividad de enzimas anclando sustratos sintéticos y el "inmunoblotting" de la unión de caspasas. Para poder analizar la actividad de las caspasas es importante la detección de su blanco la enzima PARP por "inmunoblotting". Esta proteína nuclear está involucrada en la reparación de ADN y es unida por la caspasa-3 durante la apoptosis. La técnica fue descrita inicialmente por Pennington y Thornberry. Se necesitan fluoróforos que personifican un sitio de unión específica que poder ser detectados. Los métodos son colorimétricos, lumínicos o fluorimétricos. (Haq 2017)

Las caspasas juegan un papel importante en la apoptosis y su activación es usada como marcador. Para poder observar la actividad de las caspasas se utilizan anticuerpos específicos

que ayudan a monitorear la apoptosis en modelos *in vitro* e *in vivo*. A lo largo de los años se ha intentado incrementar la sensibilidad, reproducibilidad y automatización de estos ensayos usando inhibidores de caspasas marcados con fluorocromos (FLICA), estos son ligandos que se unen covalentemente al sitio activo de la caspasa. Las células marcadas pueden ser detectadas usando microscopía de fluorescencia (Figura 7). Debido a que las caspasas reconocen y se unen a secuencias de aminoácidos específicas en proteínas, los péptidos pueden servir como biosensores para la detección de apoptosis. Los fluorocromos 7-amino-4-metilcomarina (AMC), 7-amido-4-trifluorometilcoumarina (AFC) o rodamina 110 han sido conjugados covalentemente a péptidos de caspasas. Cuando se une covalentemente a un péptido se detiene la fluorescencia total, la señal de fluorescencia no se detecta hasta cuando se active las caspasas, el sustrato se une y se libera el fluoróforo del péptido. Al momento de inducción de apoptosis y la activación de caspasa, los péptidos sustratos son unidos. (Bozza et al. 2016)

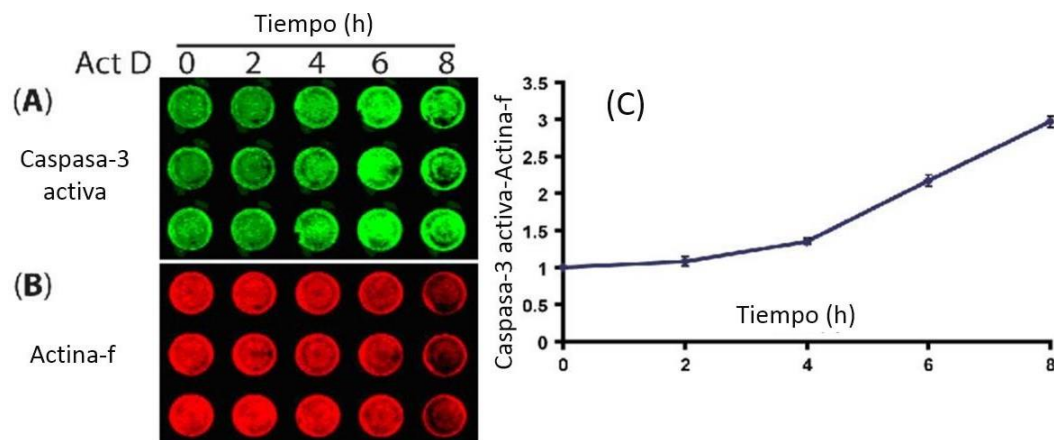


Figura 7. Ensayo de caspasas donde a células se les indujo apoptosis con actomicina D. (A) muestra a la caspasa-3 activa en los pocillos. (B) muestra la tinción de actina-f como control para normalizar el número celular. (c) muestra el comportamiento del ensayo vs tiempo.

Fuente: (Bond, Primrose, and Foley 2008)

2.5 Ensayos Mitocondriales

La permeabilización de la membrana mitocondrial es otro de los cambios morfológicos en la célula utilizados para detección de apoptosis. Aunque se ha utilizado el microscopio electrónico para observar este evento, está limitado en base a automatización y cuantificación. Sin

embargo, durante el análisis de la redistribución de proteínas que comúnmente se encuentra en el espacio intracelular de la mitocondria sirve para realizar el estudio de apoptosis (Bozza et al. 2016)

Esta técnica es comúnmente realizada por detección de las proteínas del espacio intermembranal como factor inductor de apoptosis (AIF, por sus siglas en ingles) y citocromo c por inmunofluorescencia. Se ha creado un ensayo basado en ELISA para la detección del citocromo c. De manera similar, la cromatografía líquida ha sido usada para detectar los metabolitos mitocondriales que han sido difundidos durante la permeabilización. Existen técnicas que se usan para monitorear la actividad de la cadena respiratoria de la mitocondria. (Bozza et al. 2016)

El colorante JC-1, un marcador que entra selectivamente en las mitocondrias penetra la membrana y es usado en estudios de apoptosis para monitorear la mitocondria gracias a potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Esta es la diferencia del potencial eléctrico entre la membrana externa e interna de la membrana. Durante las primeras etapas de apoptosis, la reducción de ($\Delta\psi$), la despolarización de membrana precede la condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN. Las sondas de fluorescencia dirigidas a $\Delta\psi$ se usan para detectar células apoptóticas. El JC-1 (Ioduro 5,5', 6,6' tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina) es un catión lipofílico que entra selectivamente a la mitocondria. Este tiene un cambio de color reversible de verde a naranja en forma a incrementa potencial en la membrana. Cuando las células llevan a cabo apoptosis, los agregados de JC-1 se convierten en monómeros debido a la disipación del potencial de membrana, la emisión de fluorescencia después cambia de naranja (agregados) a verde (monómero). Este puede ser detectado por citometría de flujo. (Sun and Zong 2016)

2.6 Fragmentación de ADN

La apoptosis está definida por cambios característicos en la morfología del núcleo incluyendo la condensación y fragmentación de la cromatina, encogimiento de la célula y formación de cuerpos apoptóticos. Entre los muchos marcadores de la apoptosis la fragmentación del ADN es una muy importante. Existen varios métodos para detectar la fragmentación del ADN por

apoptosis incluyendo varios kits, identificación morfológica, observación de escalera de ADN, ensayos de citometría de flujo y fluorescencia. (Rahbar Saadat et al. 2015)

La técnica de TUNEL es utilizada para la localización apoptótica de la fragmentación de ADN *in situ*. Esta técnica fue descrita en 1992. Se trata de un ensayo de marcación del extremo terminal con dUTP por medio de la deoxinucleotidil transferasa, y permite identificar daño real en la hebra de ADN. La técnica se basa en la adición de una deoxiuridina marcada con un fluorocromo al extremo 3'-OH de la cadena afectada. La señal se incrementa a mayor número de roturas en la cadena de ADN y puede medirse tanto por citometría de flujo como por fluorescencia (Figura 8). (Kyrylkova et al. 2012)

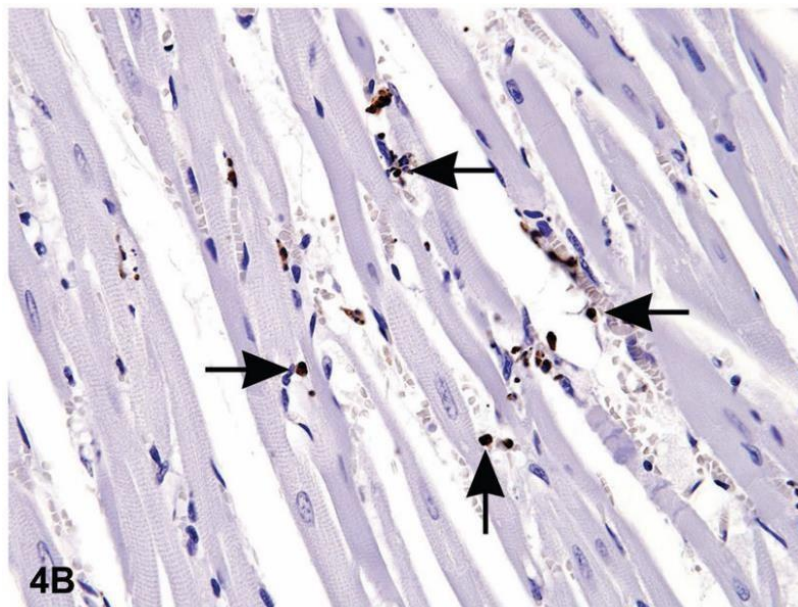


Figura 8. Imagen del miocardio de rata de 14 semanas tratada con Efedrina y cafeína. Hay múltiples células apoptóticas que han sido teñidas por el método de TUNEL.

Fuente:(Elmore 2007)

La enzima cataliza la adición de dUTPs marcado a un terminal hidroxilo que puede visualizarse usando técnicas inmunohistoquímicas. Las variables involucradas en este método son: la concentración del reactivo, fijación de tejido, extensión de la proteólisis y la accesibilidad de las cadenas rotas de ADN. Por lo tanto, es importante utilizar controles positivos y negativos (regiones de tejido tratadas con DNAsa y sin tratamiento con TdT, respectivamente).

Este método se basa en la detección del daño en el ADN, evento que también puede ocurrir en el proceso de necrosis, por lo tanto, es mejor utilizar otro método independiente para confirmar la caracterización de apoptosis. Las células son analizadas por citometría laser que combina las ventajas de citometría de flujo e imagen y permite una medición rápida con alta sensibilidad y exactitud de las células.(Kyrylkova et al. 2012). El patrón escalera es otro estudio que evalúa la fragmentación del ADN. Este método es simple, sensible, efectivo, rápido para estimar la apoptosis de células individuales (Figura 9)

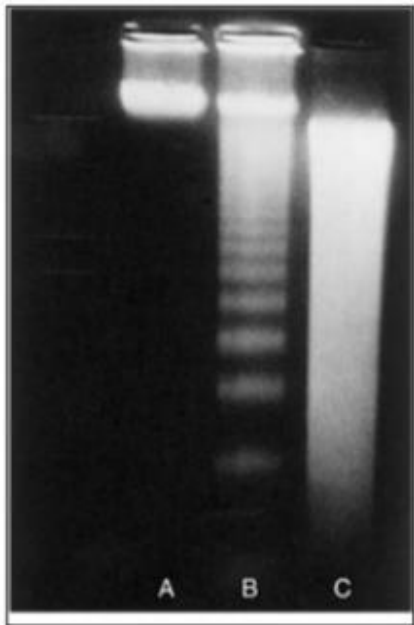


Figura 9. Imagen del patrón de escalera de ADN en gel de agarosa. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de células en cultivo (tinción con Bromuro de etidio, fotografía con luz ultravioleta). A) cultivo control, B) cultivo en apoptosis por calor, C) cultivo en necrosis.

Fuente:(Tomei and Cope 1991)

El ensayo de ADN fragmentado más comúnmente utilizado involucra la separación del material genético siguiendo el método de aislamiento de ADN con fenol-cloroformo. Sin embargo, tiene ciertas desventajas debido a que necesita una muestra de mayor tamaño, pérdida de pequeños fragmentos durante la precipitación y es un proceso con más consumo de tiempo. (Suman, Pandey, and Chandna 2012).

La degradación del ADN durante la apoptosis esta mediada por la endonucleasa y prosigue con una serie de etapas empezando con la producción de porciones de ADN de 300 kb las cuales son degradadas a fragmentos de 50 kb , estos son degradados en algunas pero no todas las células a piezas de 10 a 40 kb liberando los fragmentos de oligonucleosoma que son detectados como escalera de ADN característicos en geles de agarosa convencionales.(Walker et al. 1999) Esta técnica permite una diferenciación entre apoptosis y necrosis.

La fragmentación del ADN y consecuente la formación de fragmentos de ADN de gran peso molecular. Se utilizan técnicas basadas en la electroforesis de gel de agarosa. Sin embargo estas técnicas consumen mucho tiempo y no permiten el análisis celular individual (Vanden Berghe et al. 2013).

2.7 Ensayos Colorimétricos

El ensayo de succinato deshidrogenasa ayuda determinar viabilidad celular. Este tipo de ensayo mide la actividad metabólica de las células, la cual es considerada una relación directa con la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el del MTT o Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.(Angulo Molina et al. 2014)(El MTT es un sustrato amarillo pálido que se reduce por la succinato deshidrogenasa a formazan de color azul oscuro en las células vivas que precipita cristales. El Succinato deshidrogenasa es parte de un complejo en la membrana interna y el ciclo de Krebs. El ensayo da una perspectiva en la viabilidad celular y el estado de actividad de mitocondria (Figura 10). Las células muertas con mitocondrias no funcionales son capaces de reducir grandes cantidades de MTT. La mayor desventaja de estos métodos es que las células muertas aún tienen la actividad deshidrogenasa parcialmente intacta en especial en las etapas tempranas de la apoptosis.

Existen algunas condiciones y compuestos que pueden afectar la actividad del succinato deshidrogenasa que reduce la actividad respiratoria. Por lo tanto se recomienda usar otros métodos para monitorear la muerte celular.(Patravale, Dandekar, and Jain 2012)

Otra técnica utilizada por espectrometría es la de coloración de cristal violeta. El principio de esta técnica es que el cristal violeta tiñe el ADN de las células sobrantes unidas, debido a las células desprendidas son eliminadas por múltiples lavados. Esto podría causar que se desprendan células vivas. (Vanden Berghe et al. 2013)

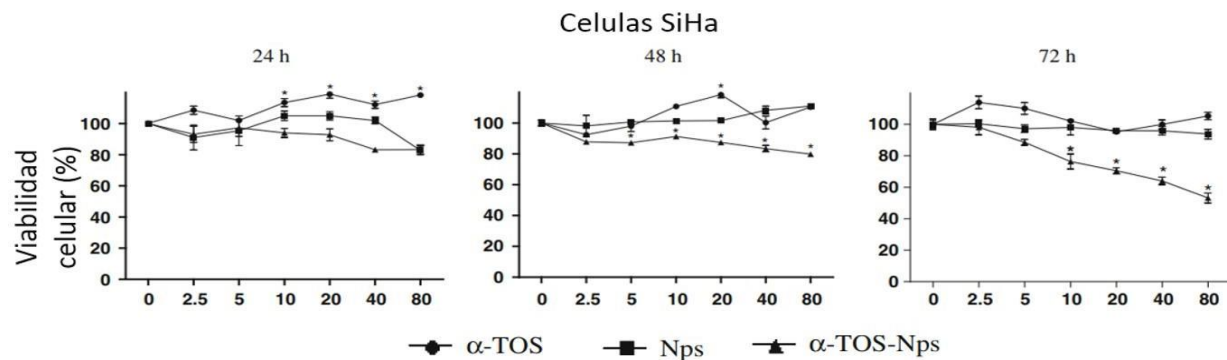


Figura 10. Ensayo MTT de la viabilidad celular de células SiHa al ser expuestas a nanopartículas de magnetita, alfa TOS y alfa TOS-Np de magnetita por 24, 48 y 72 horas.

Fuente: (Angulo Molina et al. 2014).

Otra técnica colorimétrica es el ensayo de citocromo c para la detección de apoptosis. El citocromo c es un biomarcador importante en el proceso de lisis en etapas tempranas del proceso apoptótico. La vía intrínseca de la apoptosis consiste en la generación de poros en la membrana mitocondrial externa y la liberación de citocromo c al citosol que puede utilizarse como indicador de que se está llevando a cabo el proceso apoptótico. El citocromo c por su contenido de hierro juega un papel crucial en el proceso de transferencia de electrones entre el complejo III y UV de la cadena respiratoria localizada en la membrana interna de la mitocondria. (Shamsipur et al. 2016)

Sin embargo, durante la activación del proceso apoptótico, es liberado de la mitocondria hacia el citosol donde puede tomar dos caminos ya sea que desencadenar la activación de la cascada de caspasas en la vía intrínseca de la apoptosis o está involucrado en la amplificación de la señalización de la vía extrínseca apoptótica. (Kulikov et al. 2012)

Existe una gran variedad de técnicas que se utilizan para el análisis de citocromo c. Estas incluyen técnicas fluorimétricas electroforéticas, espectrometrías, quimiluminicentes y cromatográficas. Estos métodos poseen alta sensibilidad, sin embargo, la implementación de estas técnicas es limitada debido a costo de equipos, requieren alta experiencia y el tiempo de

análisis. La mayoría de estos métodos requieren lisis e inmovilización de las muestras celulares, las cuales no son adecuadas para la detección de células vivas. La medición de citocromo c puede ayudar a entender mejor las enfermedades a nivel celular y el desarrollo de candidatos potenciales de medicamentos. (Shamsipur et al. 2016)

CAPÍTULO 3. FUNDAMENTACIÓN DE LA MICROESPECTROSCOPIA RAMAN.

La Espectroscopía Raman es una técnica analítica no invasiva la cual tiene un proceso rápido y normalmente no destructivo que combina las ventajas de la especificidad molecular de la espectroscopía vibracional con la resolución espacial alcanzando el límite de difracción dado por la microscopía confocal óptica. (Moudříková et al. 2017)

Se utiliza una fuente de luz para excitar las moléculas y la expansión no flexible de luz es detectada para el análisis molecular. En las últimas décadas esta técnica ha sido utilizada para el análisis de tejidos biológicos y diagnóstico de enfermedades. Otra ventaja de esta técnica es que da información acerca de las vibraciones moleculares usando microscopios que operan en regiones espectrales visibles e infrarrojas. La espectroscopía Raman se ha beneficiado debido a grandes avances de la tecnología de láser de alto poder, microscopía óptica, fibra óptica y detectores de alta eficiencia en este rango de espectro.

Un Sistema Raman Convencional consiste mayoritariamente de cuatro componentes principales (Figura 11):

1. Luz de excitación (Láser).
2. Iluminación de la muestra y recolección óptica de la luz.
3. Selector de la longitud de onda (Filtro o Espectrofotómetro).
4. Detector (CCD).

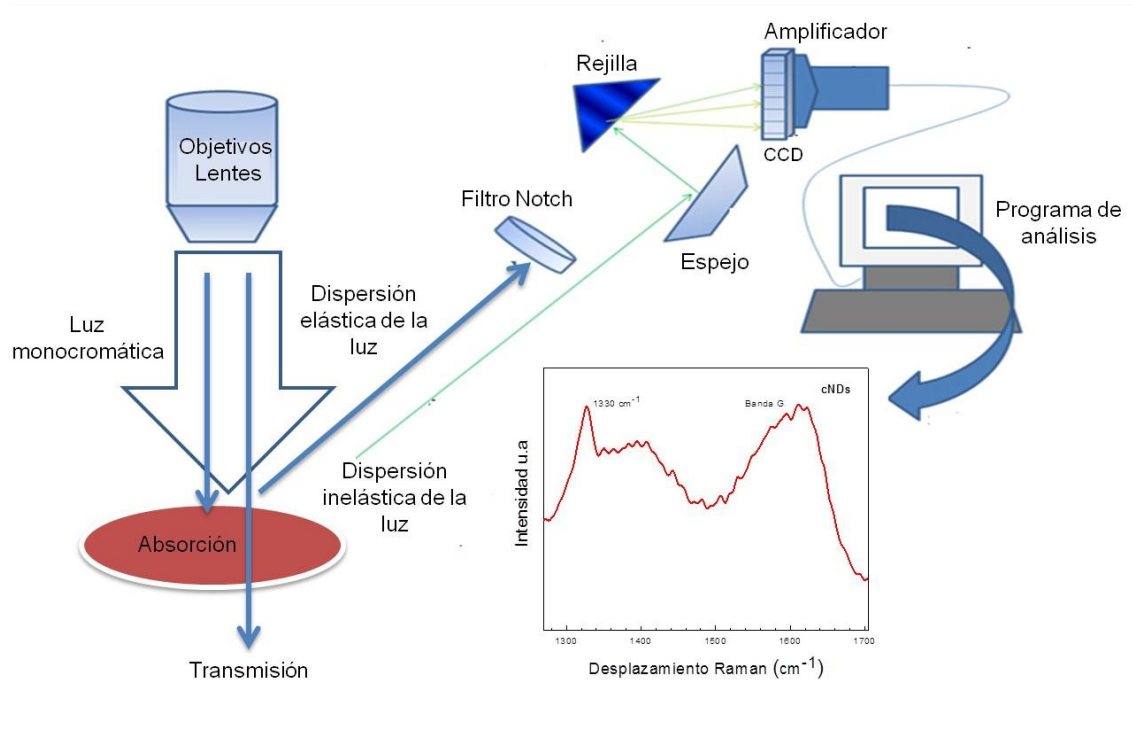


Figura 11. Esquema del proceso para la toma de espectros Raman. La mayor parte de la luz dispersada se dispersa elásticamente, lo que significa que es la misma longitud de onda que la fuente de excitación. Un filtro de limpieza se utiliza para eliminar la luz dispersada elásticamente, para dejar pasar los fotones dispersados de forma inelástica o la señal débil Raman ($\sim 1/10^6$ fotones dispersados) se detecta mediante una CCD. Se muestra un espectro Raman de cNDs. Fuente: (Acosta-Elías et al. 2015)

3.1 Principios de la Microscopía Raman

Cuando la luz interacciona con la materia ocurren varios procesos, los importantes para la microscopía Raman son la dispersión: Rayleigh y Raman. En la dispersión Rayleigh, dispersión de tipo elástica, es el proceso más frecuente ya que la luz dispersada es de la misma frecuencia que la fuente de excitación, donde la energía de la luz no cambia. En cambio, la dispersión Raman es del tipo inelástica siendo este proceso menos probable, es decir cuando hay cambio de la energía incidente. Esta diferencia de energía entre el incidente y los fotones dispersos corresponde a la energía requerida para generar una vibración molecular, la detección de los fotones dispersos producirá un espectro Raman con diferentes bandas que corresponderán a las frecuencias vibracionales de diferentes grupos funcionales de la muestra analizada.

Por lo tanto cada molécula tendrá un espectro característico dependiendo de sus uniones químicas(Ferraro 2003). Existen dos tipos de dispersión Raman, Stokes y Anti-Stokes.

El Espectro Raman es de tipo Stokes cuando la dispersión involucra la activación de un modo vibracional del material, en este proceso el fotón incidente pierde energía, generando un fotón con mayor longitud de onda y por lo tanto la luz pierde energía (zona stokes del espectro), y será dispersión anti-stokes cuando la molécula de interés se encuentre en un estado vibracional mayor que dará la emisión de un fotón de menor longitud de onda (Figura 12).⁵⁶

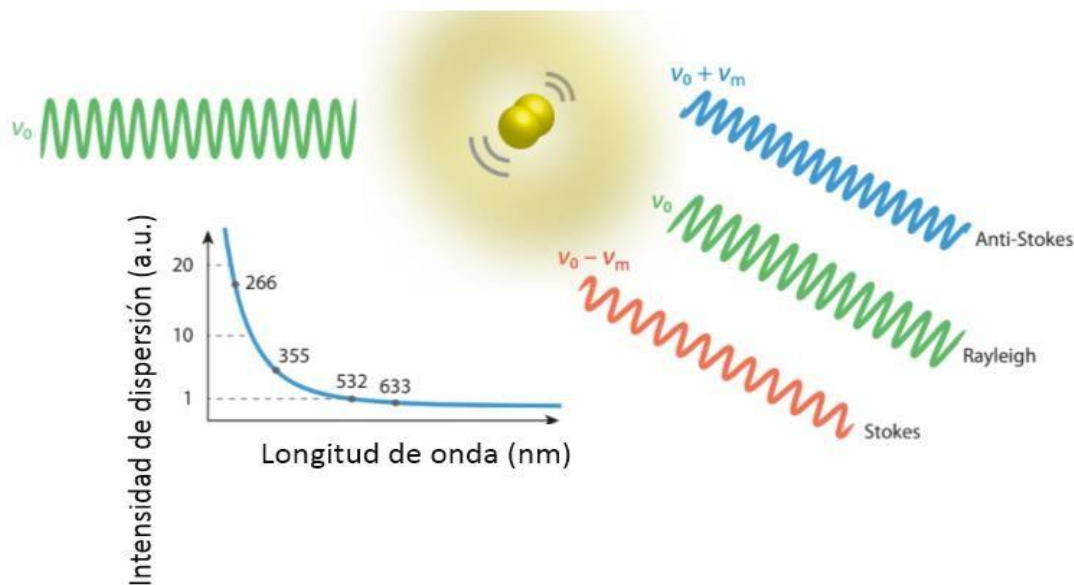


Figura 12. Dispersión Raman (inelástico) y Rayleigh (elástico) en una molécula, la intensidad de la dispersión depende la longitud de onda de la luz dispersa.

Fuente: (Opilik, Schmid, and Zenobi 2013)

Habitualmente se trabaja en el rango de Raman Stokes y las unidades se expresan en cm^{-1} siendo su origen en la energía del haz incidente(Solé, Bausa, and Jaque 2005). Para que ocurra la dispersión Raman, la interacción de la radiación electromagnética con la molécula debe provocar un cambio en la polarizabilidad, es decir que mediante la aplicación de un campo electromagnético externo, los electrones pueden ser inducidos a moverse dentro de una molécula(Long 1977). Estos modos están ligados a los tipos de átomos, sus enlaces y a la simetría del material y lo que la posiciona como una técnica que proporción información estructural.

La diferencia de frecuencia entre los fotones incidentes y dispersados es debido al nivel de energía vibracional de la molécula y es denominado desplazamiento Raman (Figura 13).(Moura et al. 2016)

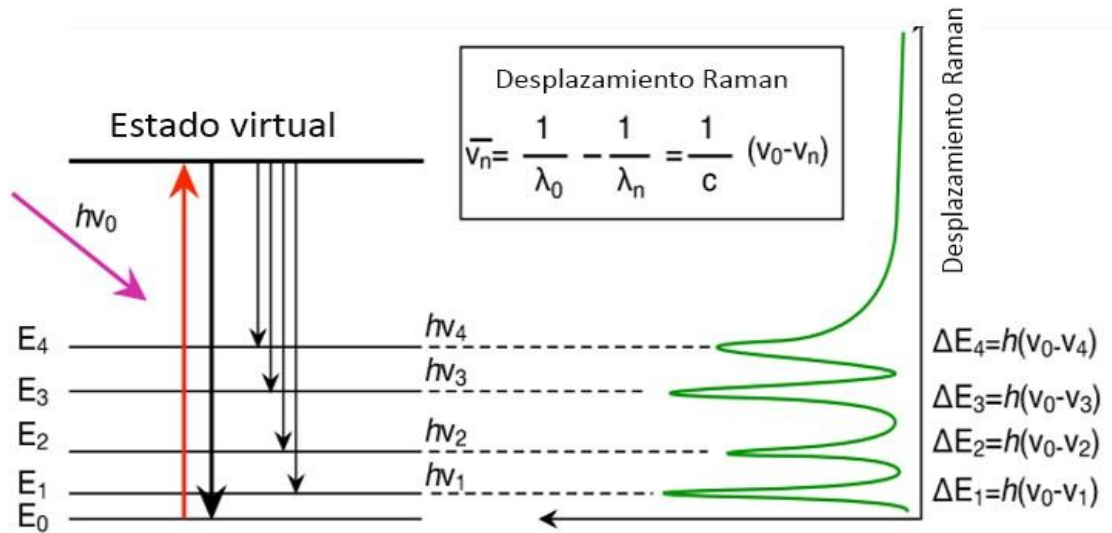


Figura 13. Principios básicos de Raman. Un fotón de cierta energía y frecuencia induce transiciones vibracionales de la molécula examinada, donando una porción de su energía. La transición ocurre a través de un estado virtual, creado debido a la polaridad de la molécula estudiada. El fotón dispersado tiene menor energía que el incidente y la diferencia de energía es medida por el detector.

Fuente: (Pyrgiotakis et al. 2009)

El proceso inelástico se describió por primera vez en 1923 por el físico Austriaco Adolf Smekal. El experimento se realizó usando un telescopio que enfocaba la luz solar sobre una muestra, que podía ser un líquido purificado, ó bien, un gas libre de polvo. La radiación dispersada en el material era recolectada por una lente y mediante el uso de filtros ópticos se comprobó la existencia de luz dispersada con frecuencia diferente de la luz de excitación. Uno de los mayores desafíos en la espectroscopía Raman es evitar la sobreposición de su señal con la señal Rayleigh. Los filtros notch tienen la capacidad de filtrar aproximadamente 100 cm^{-1} de la longitud de onda del láser (Román 2012).

3.2 Microespectroscopía Raman en Sistemas Biológicos.

Varios estudios científicos posicionan a la técnica de Espectroscopía Raman como una herramienta de análisis estructural con gran potencial, la cual nos proporciona información no invasiva de una gran diversidad de muestras biológicas (Santacruz-Gomez et al. 2016; Spiro and Streckas 1974; Spiro 1974) , por lo tanto será una de nuestras herramientas de estudio. Una gran ventaja para la microespectroscopía Raman en el análisis de células vivas es que las señales de otros compuestos como es el agua son significativamente más débiles comparadas a las obtenidas de células, por lo tanto, este método puede utilizarse para medir las propiedades moleculares de células en cultivos celulares. La microespectroscopía Raman combina el sistema de análisis de espectrometría con el de microscopía. Microscopios ópticos invertidos son útiles para obtener imágenes en tiempo real debido a que las células pueden ser cultivadas en celdas celulares cerradas que permiten una recolección eficiente de luz dispersada Raman mientras mantiene las células en medio de cultivo y evita contaminación bacteriana. Su análisis se basa en la medición de un mapa celular detallado con la finalidad de obtener información química dentro de las células con resolución espacial hasta el límite de difracción (Ghita et al. 2015). Del espectro Raman de células individuales, se puede detectar la distribución y la serie de cambios en la composición química de las células. Las señales Raman son el resultado de la dispersión de la luz causada por las interacciones entre vibraciones moleculares y la luz. Las señales del espectro Raman revelan información sobre la composición química, de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos en los especímenes biológicos.(Takanezawa et al. 2015)

Recientemente ha habido un gran interés de la espectroscopía Raman en diversas áreas de investigación, debido a su gran versatilidad, facilidad en la preparación de las muestras y la importancia de la documentación química que brinda. En el diagnóstico analítico, el Raman se puede aplicar para evaluar la capacidad para estudiar la composición química *in vivo* e *in-vitro* de muestras de tejido biológico sin alterar la muestra resulta muy valiosa. La combinación de mediciones no destructivas, sin contacto y la capacidad para proporcionar discriminación espacial convierte la espectroscopía Raman una herramienta poderosa para la investigación biomédica y proporcionar información para diagnóstico. (Castro-Ramos 2013)

De sus aplicaciones biomédicas importantes incluyen: estudios *in-vivo* e *in-vitro* de epidermis, estudios de transferencia transdérmica de fármacos, hallazgo de diferentes tipos de cáncer (piel, oral, de mama, de cuello uterino, colorectal), estudios de composición de hueso,

estudios en dientes y ojos. En el ámbito forense las áreas de aplicación incluyen la capacidad de analizar compuestos tanto orgánicos (cabellos) como inorgánicos (fibras, virutas de pinturas y tintas). En la industria petrolera el espectro Raman se puede aplicar para monitorear la pureza química y operación de la columna de destilación, además de medir espectros de materiales sólidos, líquidos, gases, en forma de vapor o en suspensión.(Castro-Ramos 2013)

Las aplicaciones de la espectroscopía Raman en la industria farmacéutica son diversas y se extienden a partir del examen de detección en fase temprana de ensayos del producto final en la fabricación. Identificación de las materias primas en el muelle, en el dispensario y en el almacenaje, seguimiento en tiempo real de granulación, mezcla, secado y recubrimiento, análisis no destructivos de tabletas, cápsulas de gel, y formulación líquida.

La microscopía Raman *in situ* puede utilizarse para evaluar y controlar el nivel de cristalinidad de un polímero durante diversos procesos, o bien identificar las diferentes fases dentro de una mezcla de polímeros. La información sobre el tamaño, longitudinal y radio, se puede inferir a partir del espectro, todas estas son propiedades que ayudan a caracterizar moléculas nanométricas. En la industria alimentaria se utiliza para determinar la presencia de macro-componentes tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y agua.(Castro-Ramos 2013)

Todas estas aplicaciones, pueden ser posibles gracias al avance acelerado en el estudio de los procesos bioquímicos en las células y tejidos y se debe a la invención y perfeccionamiento de técnicas para el estudio de sistemas biológicos como el Raman, que ayudan a enriquecer y complementar la información permitiendo una mejor comprensión de los fenómenos moleculares que ocurren en los seres vivos. Los estudios celulares tienen importantes implicaciones en la biomedicina, ya que evalúan el estado bioquímico de la célula, hace uso de bandas además de identificar los componentes orgánicos de la célula.(Barraza-Garza et al. 2013)

3.3 Microespectroscopía Raman en Apoptosis y Necrosis

Las poblaciones celulares tienen propiedades características y se encuentran en etapas particulares del ciclo celular. Estas contienen células en diferentes estados, ya sea viables, necróticas o apoptóticas. Sin embargo, para distinguir las unas de otras no es suficiente con los métodos estándar para su estudio como lo son la electroforesis de ADN, el Western blot o ensayos colorimétricos enzimáticos. Por lo tanto, es importante contar con una serie de diferentes ensayos. La citometría de flujo y microscopía de fluorescencia son técnicas alternativas para investigar poblaciones celulares heterogéneas. Los procedimientos estándar

utilizados para monitorear el proceso de apoptosis son la técnica de ioduro de propidio y Anexina V conjugado con Isotiocianato de fluoresceína que ya se presentó en un capítulo anterior. Además, este método no puede discriminar entre etapas tardías apoptóticas y células necróticas tempranas. Para identificar las etapas de apoptosis, es necesario el análisis en tiempo real y el ensayo de caspasas. Otros métodos de tñido usan anticuerpos fluorescentes, las cuales se unen específicamente a marcadores intracelulares apoptóticos. La desventaja de estas técnicas es que requieren fijación y permeabilización de las muestras, por lo tanto, el monitoreo en tiempo real de la apoptosis no es posible.

Además de que algunos colorantes utilizados pueden interferir con análisis o tienen efectos citotóxicos con la muestra. Por lo tanto, la espectrometría Raman es una tecnología que permite el análisis continuo de muerte en células individuales donde se analiza las constituciones moleculares en el ambiente fisiológico. Esta tecnología no depende de marcadores celulares y se puede adaptar a poblaciones celulares heterogéneas. La implementación de láser permite la caracterización de células vivas sin causar daño celular foto-inducido.(Nagarkatti et al. 2010).

El estudio de Brauchle et al, 2014, fue uno de los primeros reportes que diferenciaron células en apoptosis y necrosis usando la tecnología Raman y la compararon con otros métodos más conocidos. Para ello, utilizaron cultivos celulares de Osteosarcoma (Saos-2) y Condrosarcoma (SW-1353) expuestos a temperatura (20-21 °C) de 4 a 7 días. Al exponer a las células a calor no fisiológico, se provoca un estímulo que causa inmediatamente muerte celular debido a una desnaturalización proteica que induce necrosis primaria. Las células son tratadas así para después ser calentadas en agua a 55 °C por 90 minutos aproximadamente (Brauchle et al. 2014). Se obtuvieron diferencias en los espectros Raman de células vivas en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. El espectro Raman de apoptosis temprana de células Saos-2 mostró una banda a 1375 cm^{-1} y esta señal fue mayor en apoptosis tardía, en esta última se encontró una disminución en los espectros a 1003 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} comparado con las células vivas. Un pico en 1658 cm^{-1} de amida I fue observado en células vivas y apoptóticas y este disminuyó en células necróticas (Figura 14). Se observaron grandes desviaciones en las bandas 780-800 cm^{-1} en las células en apoptóticas y necróticas. El incremento de señal Raman a 1375 cm^{-1} se identificó por primera vez en apoptosis temprana, aunque no se ha descrito este pico en células en proceso de muerte celular. Sin embargo esta señal ha sido reportada en estudios hematológicos en el espectro de células sanguíneas periféricas y cromosomas

aislados, donde se conocen que están presentes estructuras de cromatina de alta densidad (Brauchle et al. 2014)

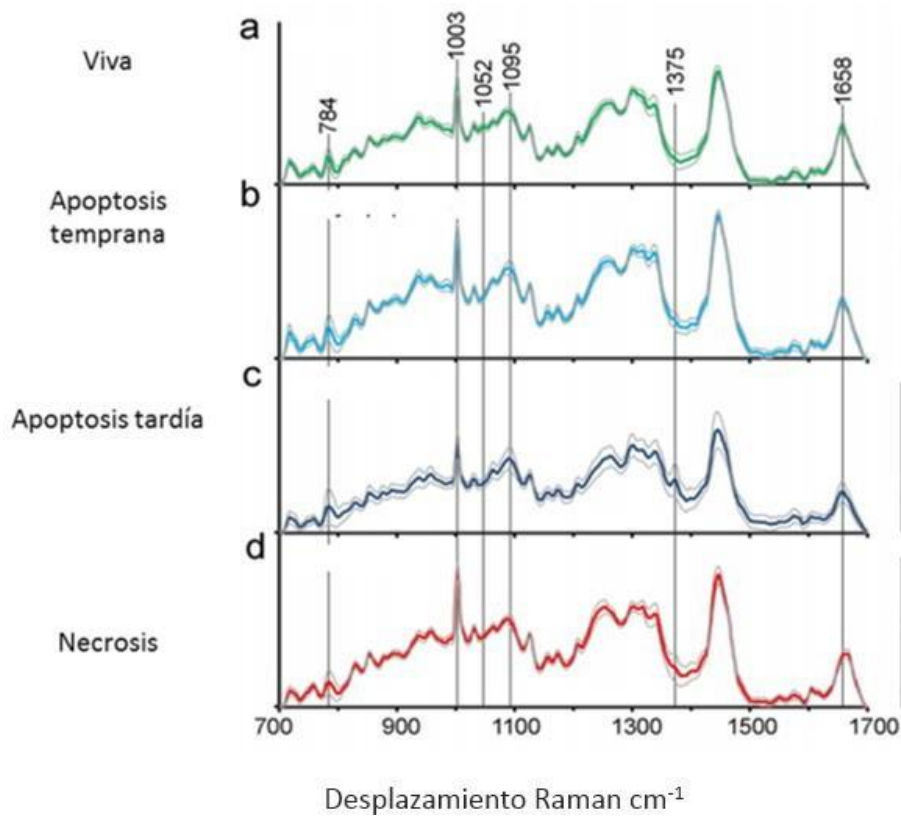


Figura 14. Espectro Raman de células Saos-2. a) Vivas (Anexina V-FITC⁻/Pi⁻), b) en apoptosis temprana (Anexina V-FITC⁺/Pi⁻), c) apoptosis tardía (Anexina V-FITC⁺/Pi⁺), d) necrosis.

Fuente: (Brauchle et al. 2014)

En la línea celular SW-1353 se encontró una disminución en los picos 1003 cm^{-1} y 1658 cm^{-1} en apoptosis temprana comparado con las células vivas. Las células necróticas mostraron un incremento en las señales a 1375 cm^{-1} . En consistencia con el espectro Raman medido de las células Saos-2 colapsadas el pico con 1052 cm^{-1} se encontró disminuido en apoptosis y necrosis en células SW-1353. En ambas líneas celulares, las bandas nucleares en el rango de $780\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ se vieron disminuidas durante apoptosis.

En otros estudios se ha sugerido que una disminución podría relacionarse con el progreso de división de ADN internucleosomal. El espectro Raman de ambas líneas celulares en apoptosis tardías mostraron picos proteicos disminuidos, especialmente en 1003 cm^{-1} por otra parte en apoptosis tardía en las células SW--1353, se mostró un incremento lipídico en la señal a 1437 cm^{-1} , lo que se relaciona con una disminución de proteínas (Figura 15). Los picos asociados a proteínas (1003 cm^{-1}) se incrementaron significativamente en ambas líneas celulares en un proceso de necrosis, este incremento de señales proteicas podría ser causado por la liberación de proteínas nucleares hacia el citosol en este tipo de muerte celular. También se puede asociar a los cambios conformacionales de las proteínas, así como a la formación de agregados proteicos debido a la alta temperatura a la que se exponen las células, lo cual podrían contribuir a la alteración de las señales proteicas en las señales Raman. (Brauchle et al. 2014)

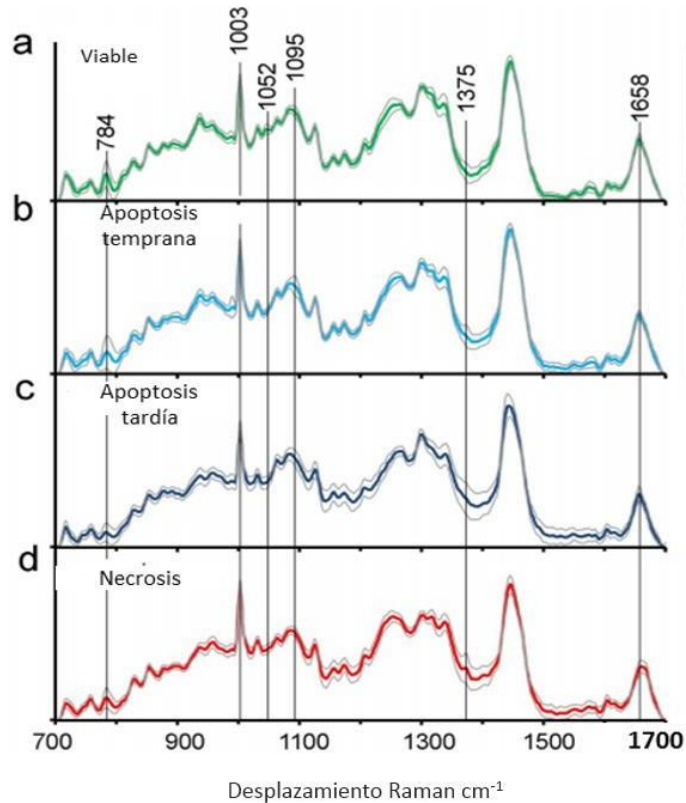


Figura 15. Espectro Raman de células SW-1353. a) Vivas (Anexina V-FITC⁻/Pi⁻), b) en apoptosis temprana (Anexina V-FITC⁺/Pi⁻), c) apoptosis tardía (Anexina V-FITC⁺/Pi⁺), d) necrosis. Fuente: (Brauchle et al. 2014)

Es importante considerar que el análisis de las intensidades de un solo pico no es suficiente para entender el complejo del desplazamiento de picos, por lo tanto, se realizó un análisis de componente principal (PCA, por sus siglas en inglés), que es una herramienta muy útil para encontrar variaciones espectroscópicas al calcular los componentes principales, la cual disuelve las varianzas entre un conjunto de espectros. Al realizar el análisis de PCA se encontró que la reducción de la señal a 1047 cm⁻¹ fue indicativa de muerte apoptótica en células Saos-2. En contraste, en el segundo análisis de componente principal se encontró un incremento a 1003 cm⁻¹ en los desplazamientos Raman en las células Saos-2 y una disminución a 784 cm⁻¹ y 1315 cm⁻¹. Mientras que el análisis de células SW-1353 vivas y en apoptosis temprana indicó una disminución a 1047 cm⁻¹, pero un incremento a 1375 cm⁻¹, comparado con las células SW-1353 vivas se identificó una disminución el pico 786 cm⁻¹ y un incremento en 1437 cm⁻¹, en el análisis PCA1 se denotó un incremento en los picos 1003 cm⁻¹ y 1244 cm⁻¹, mientras que las señales en

1437 cm^{-1} y 1658 cm^{-1} se vieron disminuidas en muerte celular por necrosis de células SW-1353(tabla). Por todo lo anterior podemos decir que espectro Raman refleja la modalidad y las etapas de muerte celular. (Brauchle et al. 2014)

En otro estudio se aplicó espectroscopía Raman para el análisis de apoptosis en células de cáncer gástrico. Su objetivo era probar si esta tecnología podría distinguir entre células cancerígenas en apoptosis, de las células vivas. Las células apoptóticas mostraron intensidades de banda menores en 782, 1092, 1320, 1340, 1576 y en 1655 cm^{-1} que corresponde al enlace de Amida I en proteínas, esto sugiere que la apoptosis podría causar una disminución en la cantidad de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Figura 16). Esto se asocia al hecho de que la cromatina del núcleo de la célula y otros componentes celulares se fragmentan durante apoptosis de células cancerígenas. (Yao et al. 2009)

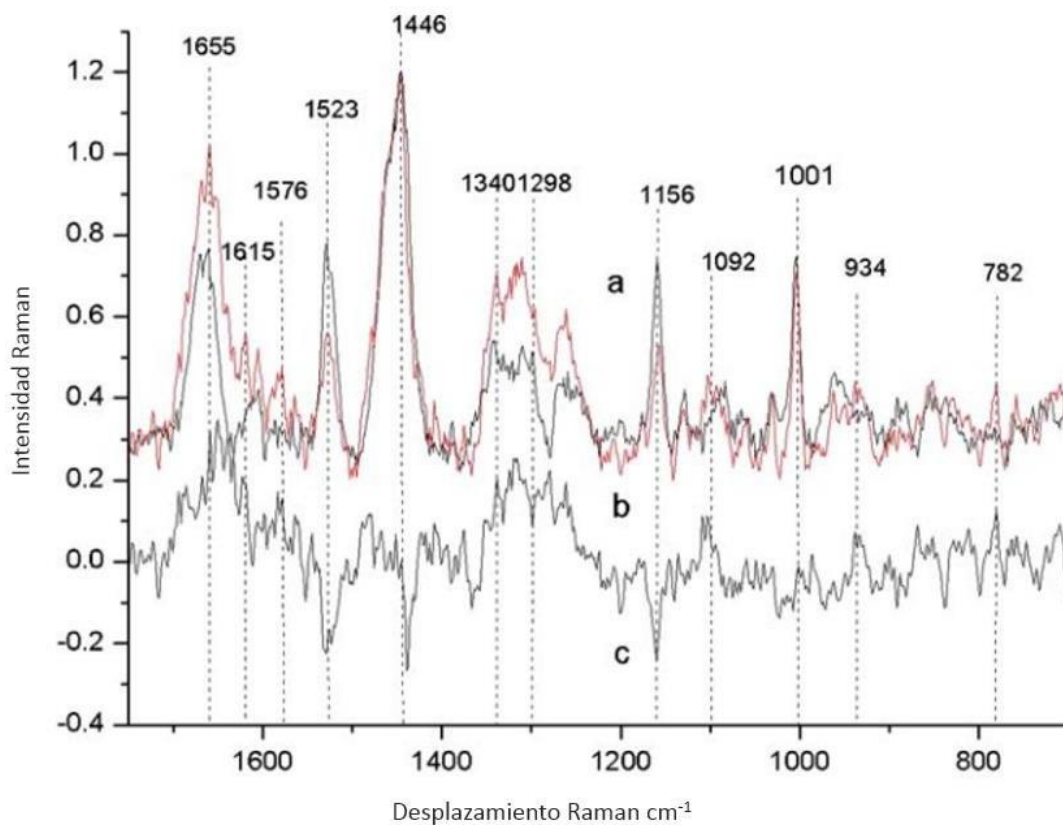


Figura 16. Espectro Raman de células no tratadas(a) y apoptóticas (b), la curva (c) es la diferencia del espectro entre a y b. Se denotaron los espectros en 782, 934, 1001, 1092, 1156, 1298, 1340, 1446, 1523, 1576, 1615 y 1655 cm^{-1} .}Fuente: (Yao et al. 2009)

Otra de las aplicaciones encontradas del uso de microespectroscopía Raman para la diferenciación de muerte celular en células de ovario de hámster chino (CHO) en dicho estudio se analizaron células vivas, apoptóticas, y necróticas (Figura 17).

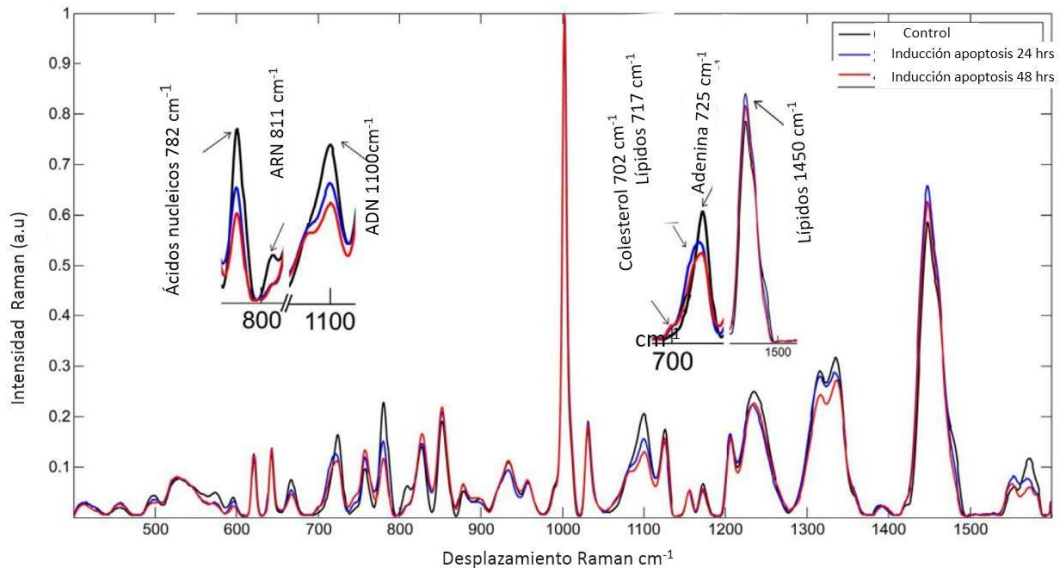


Figura 17. Media del espectro Raman de las células control vs células con apoptosis, revela cambios en los espectros de varios picos debido a cambios en la composición celular. La línea gris en el primer pico muestra el error representativo estándar en el espectro. Todos los errores de los demás son de una misma magnitud.

Fuente: (Shreyas et al. 2018)

En las células en apoptosis se encontró una disminución en los picos 667, 725, 782, 811, 1,100 y 1,575 cm^{-1} , todas relacionadas a vibraciones de ácidos nucleicos. Se encontró un incremento en los picos de vibraciones lipídicas en 702, 717 y 1,450 cm^{-1} . Así mismo se analizaron espectros Raman de necrosis primaria y secundaria para entender los cambios de espectro que ocurren una vez que la célula ha llegado a su punto final. (Shreyas et al. 2018)

La necrosis primaria se indujo por la privación de oxígeno y glucosa por 24 horas, mientras que la necrosis secundaria fue inducida después de ser expuestas 72 horas a camptotecina (fármaco citotóxico). En ambas etapas se encontró una disminución en los picos 667, 725, 782, 811, 1,094–1,102 y 1,235 cm^{-1} , siendo menor en la necrosis secundaria. Esta última mostró un aumento en los picos lipídicos en 702, 717–725 y 1,450 cm^{-1} (Figura 18). (Shreyas et al. 2018)

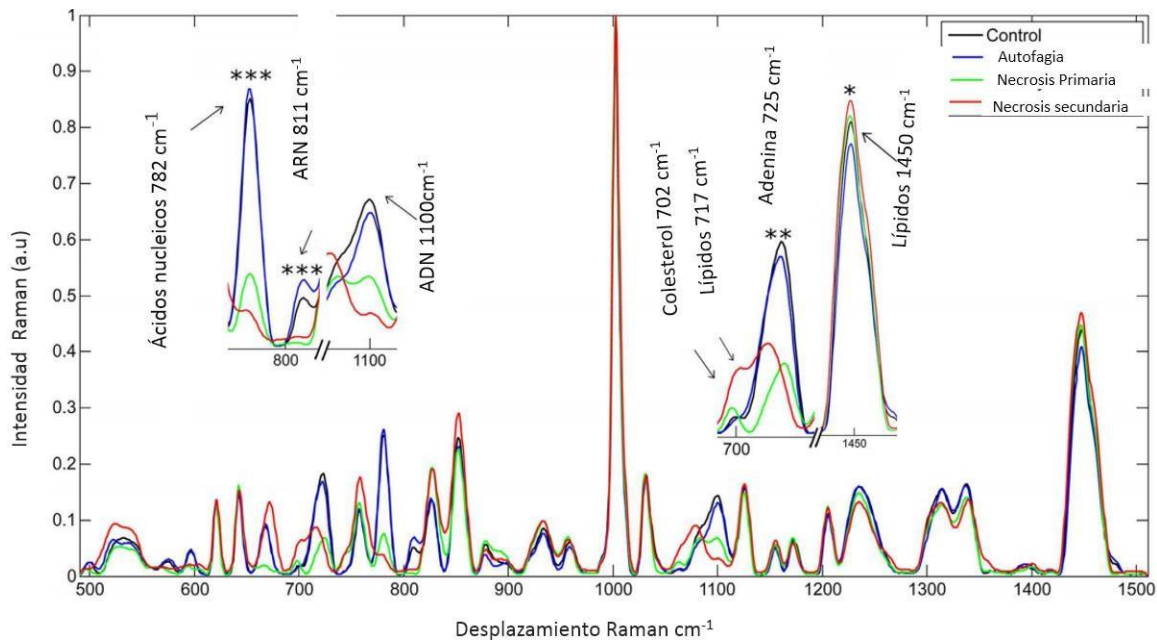


Figura 18. Media del espectro Raman de células en necrosis primaria, secundaria y autofagia. Fuente:(Shreyas et al. 2018)

En otro estudio se utilizó la espectroscopía Raman con pinzas ópticas para entender los cambios de espectro en la mitocondria en tiempo real de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y macromoléculas de la mitocondria en el proceso de apoptosis de levaduras después de sufrir estrés por ácido acético, en el estudio se hizo uso de técnicas emergentes. (Figura 19). (Li et al. 2015)

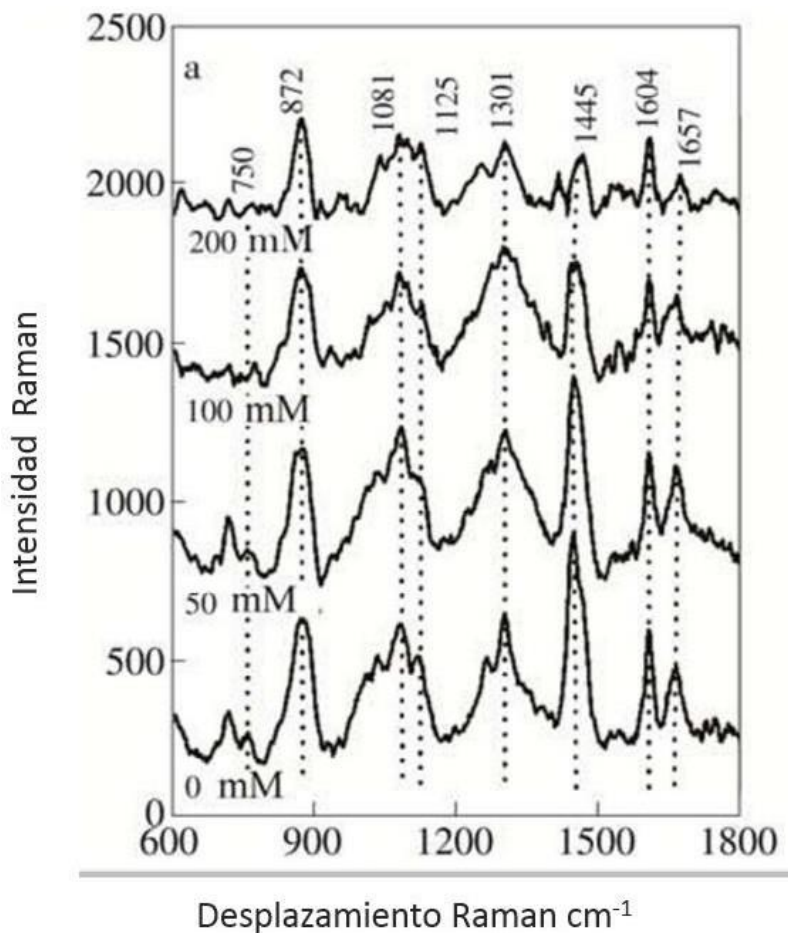


Figura 19. Espectro Raman de mitocondria de levadura después de ser expuesta in vivo a diferentes concentraciones de ácido acético por 60 min.

Fuente:(Li et al. 2015)

El espectro Raman obtenido de la mitocondria de la levadura después de ser tratada con 200mM de ácido acético en diferentes tiempos mostro una disminución en los picos de ácido nucleico en 1081 y 1301 cm⁻¹, los proteicos en 872, 1445, 1604 y 1657 cm⁻¹, los lipídicos en 1125, 1301, 1445 y 1657 cm⁻¹ y el pico de mitocondria respiratoria a 1604 cm⁻¹(Figura 20). (Li et al. 2015)

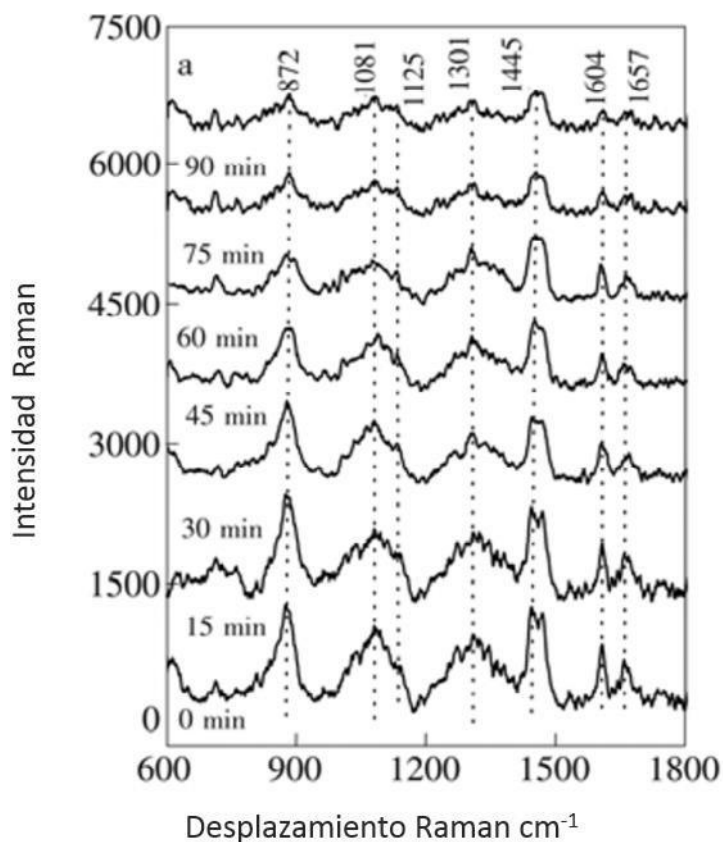


Figura 20. Espectro Raman de mitocondria de levadura después de ser expuesta in vitro a 20 mM de ácido acético a diferentes tiempos.

Fuente:(Li et al. 2015)

Por otra parte, la microscopía Raman ofrece información sobre edad celular, ciclo celular, ritmos metabólicos creando heterogeneidad a nivel fenotípico, lo cual le brinda ventajas sobre otras técnicas microscópicas como microscopía de contraste de fase o diferencial o microscopía de luz polarizada. Estas técnicas son capaces de mostrar heterogeneidad celular, pero requieren ciertas condiciones especiales como cambios en densidad óptica o variaciones en índice de refracción (Hermelink et al. 2009). Diversas investigaciones en espectroscopía Raman han publicado picos o bandas características asociados a distintas etapas de apoptosis o necrosis, siendo asociadas a un aumento o disminución o desplazamiento de picos: los picos lipídicos, cambios en la estructura de proteínas, fragmentación de ADN, entre otros. (Tabla 1)

Tabla 1. Tabla comparativa de tipo de muerte celular y picos característicos

Artículo	Tipo de Muerte Celular	Tipo de célula	Picos Raman característicos (cm ⁻¹)
Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy.	Apoptosis Temprana	Saos-2	Disminución: 780, 1003,1052, 1658. Aumento: 795, 1375.
Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy.	Apoptosis Temprana	SW-1353	Aumento: 1375
Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy.	Apoptosis Tardía	Saos-2 y SW-1353	Aumento: 1375. Disminución: 1003, 1047, 1052.
Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy	Apoptosis	Células de ovario de hámster chino	Disminución: 667, 725, 782, 811, 1100, 1575. Aumento: 702, 717, 1450.
Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells.	Apoptosis	Células cancerígenas gástricas	Disminución: 782, 1092, 1320, 1340, 1576.
Raman Spectra Analysis for Single Mitochondrias after Apoptosis Process of Yeast Cells Stressed by Acetic Acid.	Apoptosis	Levadura seca	Disminución: 750 872, 1081, 1125, 1301, 1445, 1604 y1657,

Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy.	Necrosis	Saos-2 y SW-1353	Aumento: 1003. Disminución: 1052, 1315, 1658
Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy	Necrosis primaria	Células de ovario de hámster chino	Disminución: 667, 725, 782, 811, 1094–1102 y 1235
Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy	Necrosis secundaria	Células de ovario de hámster chino	Disminución: 667, 725, 782, 811, 1094–1102, 1235. Aumento: 702, 717–725, 1450.

Fuente: (Brauchle et al. 2014), (Yao et al. 2009), (Li et al. 2015), (Shreyas et al. 2018)

CAPÍTULO 4. FUNDAMENTACIÓN DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.

4.1 Principios de Microscopía de Fuerza Atómica.

La Microscopía de Fuerza Atómica mejor conocido como AFM por sus siglas en inglés, es un instrumento óptico-mecánico que tiene la capacidad de detectar fuerzas del orden de piconewton. Mediante una sonda (cantiléver) recopila información de su topografía (Figura 21).

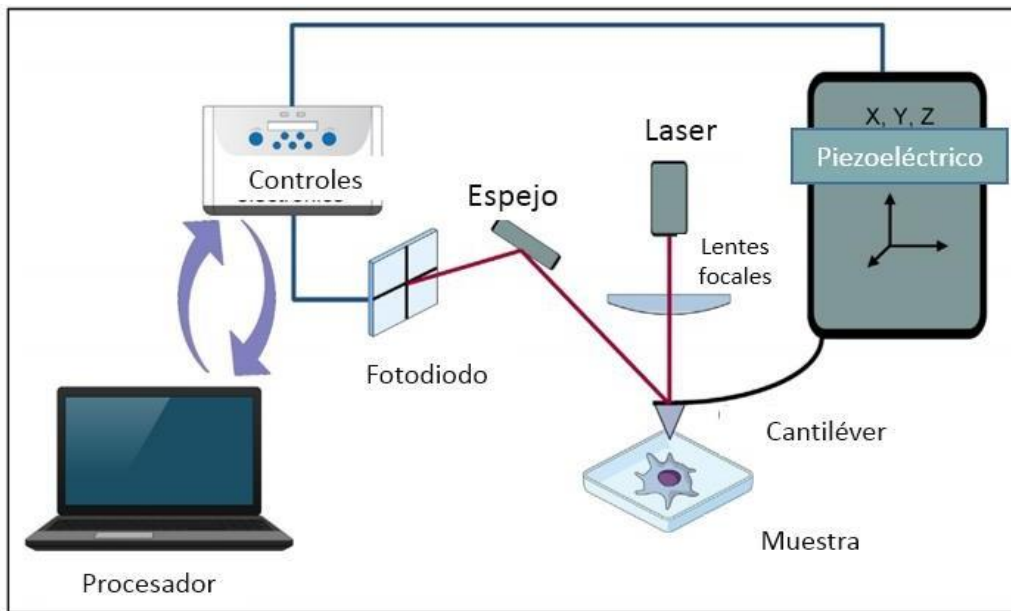


Figura 21. Diagrama de AFM y principio. La punta montada en el voladizo escanea y sondea la muestra. Los movimientos del cantiléver controlado por un piezoeléctrico hacen que la muestra se mueva en direcciones diferentes (X, Y, Z). Durante la interacción de los especímenes con el voladizo, este se dobla, sus deflecciones son registradas por un sistema óptico compuesto de una fuente de láser, lentes focales, espejos y un detector fotodiodo. Los controles electrónicos proveen una respuesta que permite el ajuste de la separación de la punta con la muestra. Fuente:(Borin et al. 2017)

Los principales componentes del AFM son cantiléver, láser, punta, fotodetector y el piezoeléctrico (Last et al. 2010). El cantiléver es un instrumento flexible, que está compuesto en su mayoría de silicio, que se flexiona según las fuerzas que existan entre la punta y la muestra. La punta es la herramienta que se utiliza para escanear la superficie de la muestra, es uno de los aspectos que determinan la resolución de las imágenes obtenidas por AFM. Las puntas con mayor grado de resolución tienen un radio de curvatura de aproximadamente 5 nm.

Además, se utiliza un láser de longitud de onda de 633 nm que incide sobre el cantiléver el cual detecta sus cambios, los cuales son directamente proporcionales al ángulo de reflexión del láser que incide sobre el fotodetector.(Vahabi, Nazemi Salman, and Javanmard 2013) La distancia entre los átomos de la punta del cantiléver y los de la superficie de la muestra, determinará el tipo de interacción, ya sea de atracción o repulsión, la cual permitirá medir la superficie de la muestra. La detección de la fuerza entre los átomos de la superficie de la muestra y los del cantiléver da como resultado el movimiento del cantiléver. Esta flexión del cantiléver se puede cuantificar por la desviación de un haz que incide sobre el cantiléver y lo detecta un fotodetector de 4 cuadrantes que tendrá gran sensibilidad a la posición. Debajo de la muestra se encuentra un piezoeléctrico el cual se mueve en dirección X, Y, Z. Este escanea repetidamente la muestra línea por línea, mientras que la señal en el fotodetector servirá para establecer un punto secuencial de retroalimentación que controla el movimiento vertical del escáner del cantiléver a través de la superficie de la muestra.

El AFM trabaja en tres modos: contacto, no contacto y contacto intermitente. En el modo de contacto, la punta recorre la superficie de la muestra, aplicando una fuerza de tipo repulsiva constantemente. Sus ventajas radican en la alta velocidad de barrido, resolución atómica y cambios bruscos en topografía. Las desventajas son que generan fuerzas laterales que causa distorsión de imagen, posible aparición de fuerzas normales fuertes, la combinación de las fuerzas anteriores podría ocasionar una disminución en la resolución espacial y el daño de muestras blandas. El modo de contacto intermitente mide la topografía acercando y alejando la punta de la superficie de manera que una punta oscilante está tocando la muestra. Es ideal para las muestras blandas debido a que se eliminan las fuerzas laterales, lo que causa un incremento en la resolución lateral. Entre sus desventajas esta la menor velocidad de barrido comparado con el modo contacto. (Vahabi, Nazemi Salman, and Javanmard 2013)

En el modo no contacto se realiza una medición de la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta. La punta vibra cerca de la superficie sin tocarla a una distancia entre 10-100 Å. (Vahabi, Nazemi Salman, and Javanmard 2013)

En los últimos años el microscopio de fuerza atómica se ha convertido en una de las técnicas más usadas en la caracterización de superficies, así como de propiedades mecánicas a nivel de nanoescala de especímenes biológicos incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, virus, células, etc., siendo una herramienta indispensable en el campo de ciencia y nanotecnología debido a su incomparable resolución (Zapletalová 2016)

Es importante mencionar que el microscopio puede discriminar y crear imágenes en diferentes medios como vacío, aire o líquido. La creación de imagen en vacío, en teoría debería dar la mayor resolución de imagen, pero necesita un sistema sofisticado que no es muy común en la mayoría de los laboratorios. En el caso del aire, la formación resulta la opción más rápida y sencilla, sin embargo, la capa delgada de agua que cubre la muestra y la punta del aparato genera fuerzas capilares que elevan de manera dramática la interacción que tiene la punta y la muestra y causa alteraciones en la formación de imagen de las moléculas. En la formación de imagen de aire solo se puede usar para explorar conformaciones moleculares estáticas. En el caso de líquidos, permite la observación de muestras biológicas en condiciones casi fisiológicas, aunque la muestra debe ser absorbida en un sustrato para su observación. Es posible modificar la composición química del medio líquido durante la observación y para acceder a la respuesta dinámica de las muestras investigadas. En las primeras etapas de experimentación con AFM se usaba el modo de contacto en aire. En este sistema la punta se encuentra en contacto constante con la muestra y aplica una fuerza vertical y lateral. El componente vertical viene de la deformación del cantiléver que mantiene la punta en contacto con la muestra, mientras que el componente lateral está presente por su desplazamiento de la muestra durante el escaneo. (Kasas and Dietler 2018)

En este modo de observación, las muestras planas y rígidas, no se deformarán mientras que las muestras blandas serán deformadas y desplazadas durante el escaneo. La deformación de la muestra reducirá la resolución del instrumento, mientras que el desplazamiento provocará que la muestra no sea visible en el microscopio. Por esto fue necesario la actualización de estas técnicas, en respuesta a esto se desarrolló el modo de contacto intermitente. El desarrollo de este modo permite la creación de imágenes de moléculas de forma individual.

En el modo intermitente los diferentes parámetros pueden ser desplegados, como la amplitud o la fase del cantiléver. La señal de amplitud corresponde a la magnitud de la respuesta del cantiléver por la fuerza motriz. Este parámetro disminuye cuando el cantiléver toca la superficie de la muestra donde la fase de señal mide el retraso del ángulo entre el piezoeléctrico y el movimiento del cantiléver. Este parámetro refleja las propiedades elásticas de la muestra. Uno de los usos que se le puede atribuir al modo contacto intermitente es el análisis de moléculas de ADN pobremente unidas a la superficie de la muestra (Kasas and Dietler 2018).

Desde la invención de métodos intermitentes, el uso del modo contacto ha sido reducido debido a sus inconvenientes, sin embargo, tiene la ventaja de ser un método sencillo. El limitado uso de parámetros facilita su uso y por lo tanto la toma de imágenes y su interpretación no requiere de un avanzado conocimiento teórico. Su utilización generalmente se reserva a muestras que no sean susceptibles a la rápida destrucción por parte de la punta que está en contacto constante. Se utiliza en muestras como metales, óxidos de metales, grafito y muestras inorgánicas rígidas. Una de sus aplicaciones más importantes es el estudio de conductividad eléctrica de muestra. Para ello, se utilizan puntas convencionales de silicio, pero revestidas con algún metal o aleación de metales como platino-iridio. (Sahin et al. 2007)

El microscopio realiza dos tipos de medidas: imagen y fuerza. Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión y permiten el estudio a nivel de una sola molécula (ej: interacción antígeno-anticuerpo, interacción entre hebras complementarias de ADN) o interacciones estructurales de las biomoléculas (plegado de proteínas) así como caracterizar la elasticidad de polímeros.(Sahin et al. 2007). En la innovación de esta técnica se ha integrado con otras técnicas ópticas y espectroscópicas, como microscopía de campo brillante, fluorescencia, microscopía de superficie, microscopía de escáner de laser confocal, microscopía Raman, etc. La integración de estas técnicas permite usar las capacidades de alta resolución de imagen en conjunto con las técnicas químicas de especificidad disponibles. (Last et al. 2010)

4.2 Microscopía de Fuerza Atómica en Sistemas Biológicos.

Una herramienta muy poderosa para el estudio de las morfologías y las propiedades mecánicas de las células es el microscopio de fuerza atómica por su gran resolución y alta sensibilidad. Este ha sido usado de manera exitosa como una herramienta de estudio de diferentes tipos de células biológicas como son humana, animal, plantas, bacterias y componentes subcelulares como membranas, proteínas lípidos y azúcares. El método de microscopía de fuerza atómica permite rastrear por periodos extensos los cambios en la célula después de un cambio de ambiente o a la adicción de factores externos. EL AFM nos brinda información acerca de propiedades físicas de las células a estudio como son: módulo de Young, la altura celular, rigidez, dureza entre las más importantes. Sin embargo, las propiedades mecánicas como la rigidez no han sido capaz de ser exploradas a fondo. En las células estas propiedades están relacionadas fundamentalmente a la forma, motilidad celular y también considerada como biomarcador para la organización citoesquelética celular, que en su composición interna está compuesta de un canal complejo de microtúbulos. En este sentido la microscopía de fuerza atómica resulta interesante debido a que analiza en tiempo real los cambios biológicos (Liu et al. 2017).

La Microscopia de Fuerza Atómica resulta ser útil en el estudio de sistemas biológicos debido a que la preparación de la muestra es simple y no necesita congelación, revestimiento con metal, vacío o teñido. Para sistemas biológicos se utiliza el modo no contacto y el medio líquido para evitar la deformación de las células, así como establecer las condiciones fisiológicas. Sin embargo, si no se cuenta con esta modalidad se analizan las muestras fijas, utilizando técnicas de fijación estándar con formaldehído o glutaraldehído. Las muestras se tienen que depositar sobre ciertas superficies, en muestras celulares, es posible observar células vivas en crecimiento puestas en superficies de vidrio o superficies modificadas (cubiertas de Poli-lisina) sin procedimientos de fijación. En muestras bacterianas, proteínas o incluso ADN, las suspensiones de la muestra pueden ser puestas en superficies planas como mica, grafito o discos de silicio para que la muestra sea absorbida en la superficie por fuerzas débiles, como interacciones de fuerzas de van der Waals.

La mayoría de los microscopios de fuerza atómica comerciales tienen la habilidad de observar muestras en medios líquidos ya que todos adoptan el mismo método de detección óptica para monitorear el desplazamiento de la sonda. Las muestras pueden ser puestas en agua o en solución buffer y la sonda se pone directamente en el líquido para escanear las muestras.

El haz de luz láser puede penetrar el líquido para detectar cambios en la sonda del microscopio. En el caso de los virus cuyo tamaño es de aproximadamente 20-400 nm, se observan por microscopía electrónica ya que no se cuenta con tal resolución. Una de las aplicaciones de AFM ha sido la observación de la morfología de virus del mosaico del tabaco y virus de plantas en su forma cristalina, y el estudio de las superficies de virus de leucemia murina y virus de inmunodeficiencia humana. Recientes estudios han investigado el mecanismo de la transcripción de *Escherichia coli* por la observación en tiempo real de las interacciones entre ADN y ARN polimerasa, dando conocimientos de los mecanismos de la transcripción de ADN a ARN. Así mismo, se ha utilizado para el estudio de superficie de *Streptomyces coelicolor* durante el ciclo de vida, así como la visualización de filios y flagelos. Por lo tanto, el AFM resulta muy apropiado para el estudio detallado de superficies bacterianas. Una de las principales aplicaciones de AFM en cáncer ha sido en células mamíferas, en el estudio de las propiedades mecánicas de células cancerígenas, así como el análisis de morfología celular. Por esta razón las mediciones de fuerza por AFM tienen mucho potencial en estudios de membrana celular, ya que muchas de las reacciones bioquímicas como fosforilación proteica y lipídica resulta de cambios en la carga de densidad de superficie que pueden ser detectadas *in situ*. (Chang et al. 2012) Por lo tanto en los procesos vitales de las células vivas es importante el estudio de las propiedades moleculares y procesos celulares, incluyendo adhesión, migración, forma y división (Dufrêne et al. 2013).

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica en Apoptosis y Necrosis.

En el sentido de diferenciación de muerte celular, existen marcadores bioquímicos durante el proceso de apoptosis. Uno de los más comunes para la detección de apoptosis es la marcación del grupo de Anexina V. La Anexina V se une al a fosfatidilserina que se encuentra en la superficie citoplasmática, sin embargo, durante la apoptosis existe una translocación hacia fuera de la membrana y es expuesta a un ambiente externo celular. Por lo que la técnica de AFM ha llevado a un mejor entendimiento de las muestras biológicas estudiadas. Como ya se mencionó en la sección 4.2 uno de los principales componentes del microscopio es el cantiléver que es

una micropalanca que puede ser operada como un nanoindentador al controlarlo verticalmente, este actúa sobre la muestra recopilando la flexión del cantiléver y la deformación del material. Estos datos son usados para generar los valores del módulo de Young del material los cuales permiten la caracterización mecánica de las células, actuando como marcadores biomecánicos generando información sobre la estructura. Las células apoptóticas llevan a cabo procesos intensivos de reorganización citoesquelética incluyendo el envolvimiento de los filamentos de actina alrededor del núcleo, el cual se da al inicio de la apoptosis y el microtúbulo siendo despolimerizado. Por lo tanto, la respuesta mecánica de la fuerza de indentación sería diferente en cada tipo celular. Investigaciones recientes han reportado por medio de análisis estadístico la rigidez de células, lo cual lo posiciona como el marcador mecánico que caracterizarían el proceso apoptótico. (Yang et al. 2010)

Por otra parte, otros estudios han reportado que propiedades mecánicas y de morfología celular pueden ser usadas para describir el comportamiento de las células. Algunos estudios han evaluado el proceso de apoptosis en células SMMC-7721(Figura 22), donde reportaban un aumento del ritmo apoptótico conforme se aumentaba el tiempo y concentración de extracto de agua de raíz de ginseng, el parámetro biomecánico que evaluaron fue la rigidez celular la cual se vuelve más evidente después de que la célula sufre el proceso de apoptosis. En el mismo sentido los eventos de apoptosis no son directamente observables, por lo que se ha observado que se manifiestan cambios frecuentes en el citoesqueleto o en la membrana celular donde la técnica de AFM es utilizada. (Qu et al. 2018)

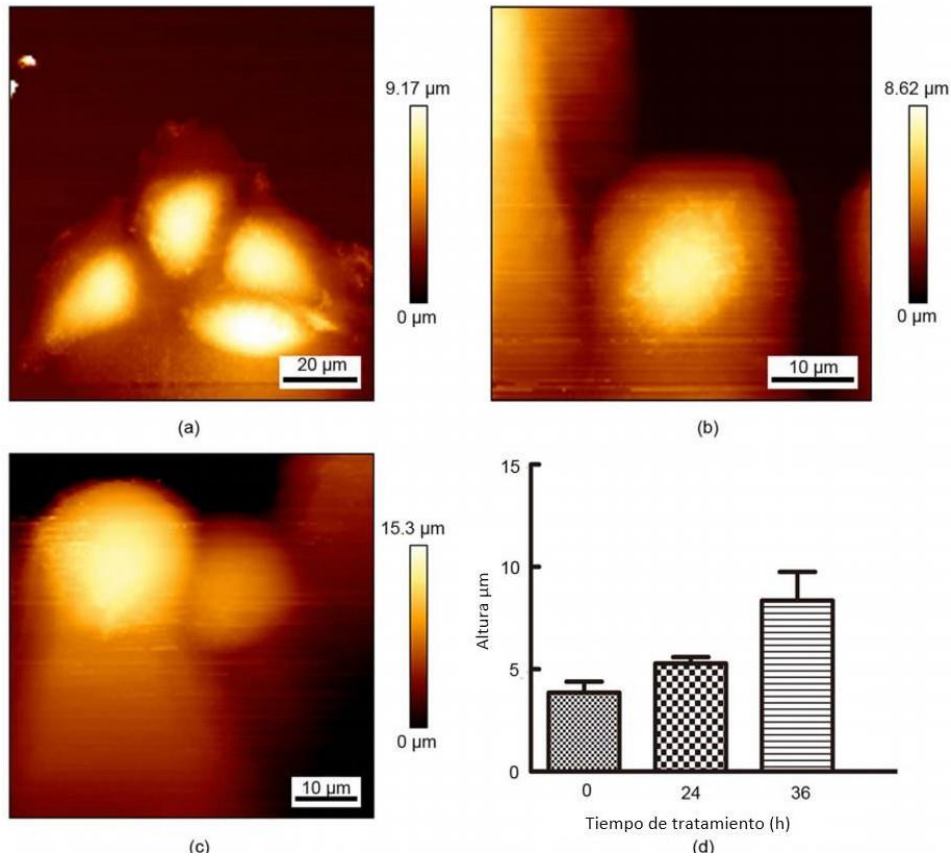


Figura 22. Topografía de superficies celulares detectado por AFM después de ser tratadas con extracto de agua de raíz de ginseng, después de (horas): a) 0, b) 24, c) 36 y el promedio de la altura de las células después de 0, 24 y 36 horas.

Fuente:(Qu et al. 2018)

Así mismos, se han reportado estudios de propiedades mecánicas y ultraestructurales de linfocitos en proceso de apoptosis los cuales se han estudiado por medio de AFM. Se ha reportado que el linfocito apoptótico es más áspero que aquellos que no se encuentran en procesos de muerte celular. Algunos estudios han encontrado que los linfocitos en apoptosis son de 2 a 3 veces más rígidos que aquellos normales lo cual se ha reportado con curvas de distancia de fuerzas espaciales.

Por otra parte, debido a que el tamaño de las células se encuentra usualmente varios micrómetros sobre el rango de escáner del AFM, aún hay obstáculos en el estudio de apoptosis, cuando se usa el volumen celular como un indicador apoptótico. Además, resulta más sencillo observar la superficie de la membrana celular que el volumen celular, con respecto al cambio de

volumen celular, la variación de la rigidez es una señal detectable antes de la apoptosis celular, lo que la convierte en candidata como indicador de apoptosis temprana.(Hu et al. 2009)

Otros estudios han analizado la línea celular KB del carcinoma epidermoide humano con estaurosporina para inducir apoptosis y se determinó que después de 3 horas de exposición, la altura celular disminuía 32%, el volumen celular 50% y el diámetro cambio un 15%. Dada las capacidades experimentales de AFM sería una modalidad ideal en combinación con otras técnicas para investigar la dinámica que acompañan la cascada de apoptosis.(Taatjes, Sobel, and Budd 2008)

Un estudio donde se evaluó la eficiencia de la fotosensibilización de la línea celular MCF-7, se demostró la habilidad de detección de respuesta de apoptosis del microscopio de fuerza atómica a nivel molecular de ADN. Cuando se daña el ADN por apoptosis, fragmentos del material genético son observables. En este caso se observan estructuras similares de fibras largas donde no se pudo determinar longitud de fragmentos individuales (Figura 23). (Zapletalová 2016)

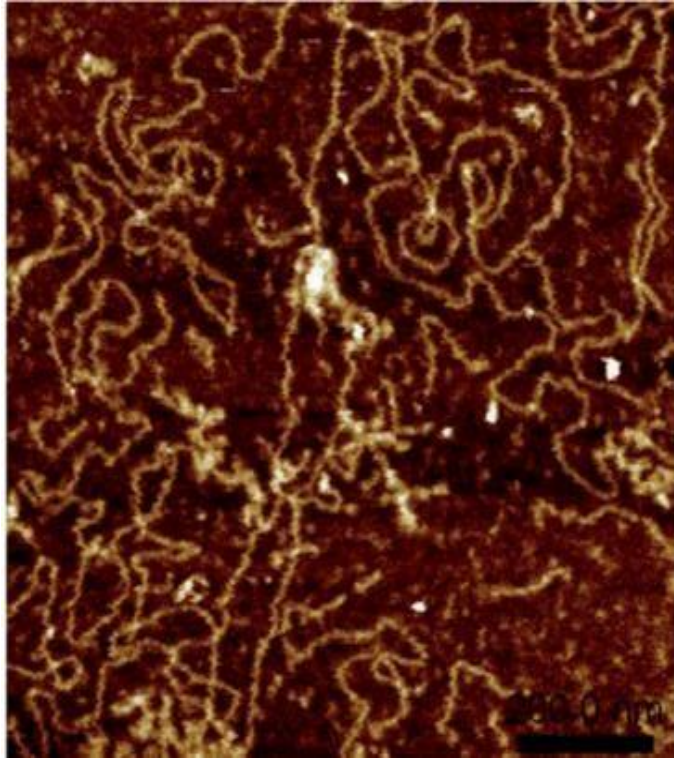


Figura 23. Imagen AFM de fragmentos de ADN aislados de células MFC- 7 tratadas con TMPyP.
Fuente:(Zapletalová 2016).

CAPÍTULO 5 VALOR BIOLÓGICO DE LA CORRELACIÓN AFM-RAMAN.

El uso de la microespectroscopía Raman ha resultado muy útil para conocer la composición de los materiales orgánicos, inorgánicos, polímeros, sólidos y líquidos. Otra técnica como es la Microscopía de Fuerza Atómica complementa la información derivada de los espectros Raman. Ambas pueden ser consideradas como técnicas de escaneo no invasivas, que en conjunto brindan información acerca de la caracterización morfológica, topográfica, estructural, así como de las propiedades físicas de muestras biológicas. Siendo el AFM el instrumento que provee información topográfica de la muestra con una resolución nanométrica, obteniendo información acerca de la dureza de la muestra, que está directamente relacionada con la fuerza aplicada y la profundidad de indentación. Recientes estudios biológicos han combinado la microscopía Raman y AFM para obtener información más detallada y complementaria de los procesos biológicos, por ejemplo, en células de cáncer de mama en tumores de los vasos sanguíneos de tejido de seno y con cáncer en los cuales identificaron alteraciones bioquímicas y mecánicas las cuales fueron analizadas por Raman y AFM respectivamente (Figura 24).

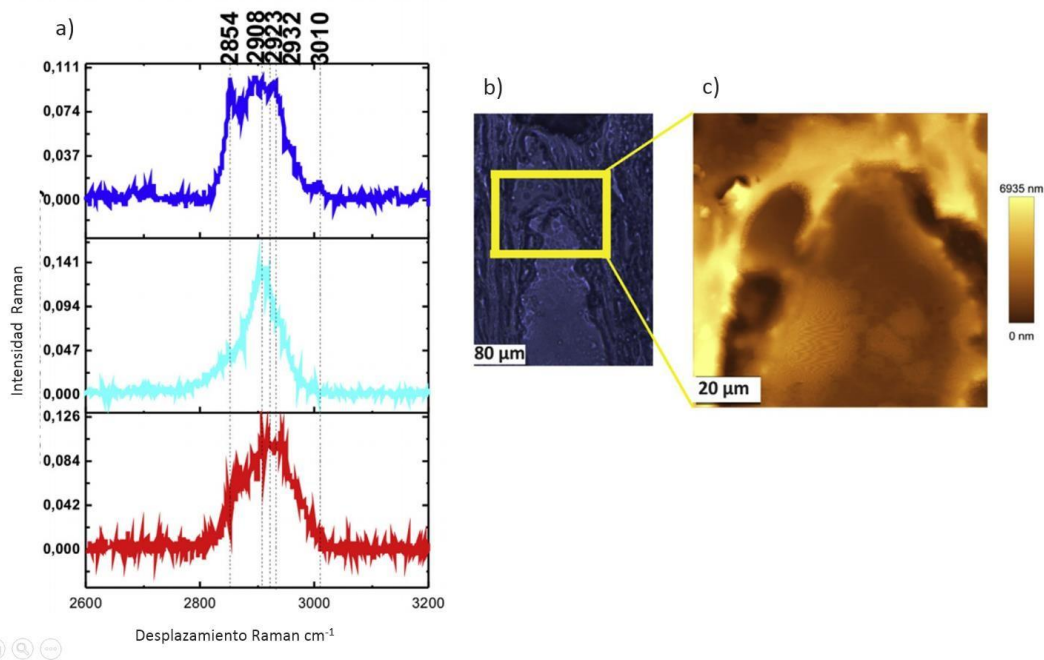


Figura 24. Imagen de espectro Raman(a), imagen Raman (b) y AFM(c) de masa tumoral en tejido de seno. Fuente:(Kopeć and Abramczyk 2018)

Por lo que esta combinación de “huellas” bioquímicas y topográficas ofrecen el potencial de biomarcadores predictores de cáncer y blancos celulares en el desarrollo de cáncer para el tratamiento. La alta resolución de AFM y Raman muestran que la rigidez de la matriz en la progresión del tumor es debido a una alteración de la composición bioquímica del microambiente del tumor compuesto de compartimentos celulares (vasculares e intersticiales) y no celulares. (Kopeć and Abramczyk 2018)

5.1 Aplicación en Necrosis

Pocos estudios se han realizado en combinación de Raman y AFM por lo que es un área con gran potencial de estudio. Por lo que se describirá individualmente cada uno y estableceremos una relación. Para la evaluación de necrosis mediante AFM se monitorean cambios morfológicos como es la rigidez de la superficie. En un estudio se monitorearon los cambios morfológicos de las células tratadas con taxol, este fármaco induce necrosis en células del tejido endotelial. La necrosis es caracterizada por la hinchazón citológica, pérdida de integridad de membrana(Figura 25).(Wang et al. 2008)

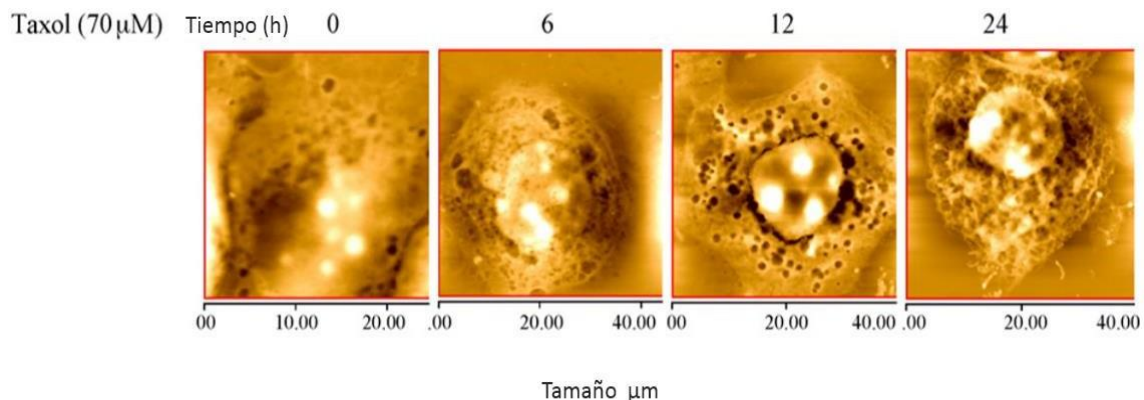


Figura 25. Imagen AFM de superficie de células ASTC-a-1 después del tratamiento con 70 mM de taxol después de 0, 6, 12,24 horas.

Fuente:(Wang et al. 2008)

En otro estudio se reportó que las células de adenocarcinoma de pulmón padecían hinchazón debido a su tratamiento con paclitaxel, resultando en un incremento de la altura celular y una disminución de la rigidez de la superficie (Figura 26). (Derely et al. 2011) En células Ishikawa y HeLa, se reportaron mostraron una morfología más blanda que las células no tratadas y una disminución en rigidez conforme pasaba el tiempo de exposición. Los autores concluyeron que el uso de AFM para la observación de los cambios morfológicos y biofísicos en células cancerígenas podría funcionar como un método potencial para evaluar la actividad de medicamentos anti-cáncer. (Kim et al. 2012)

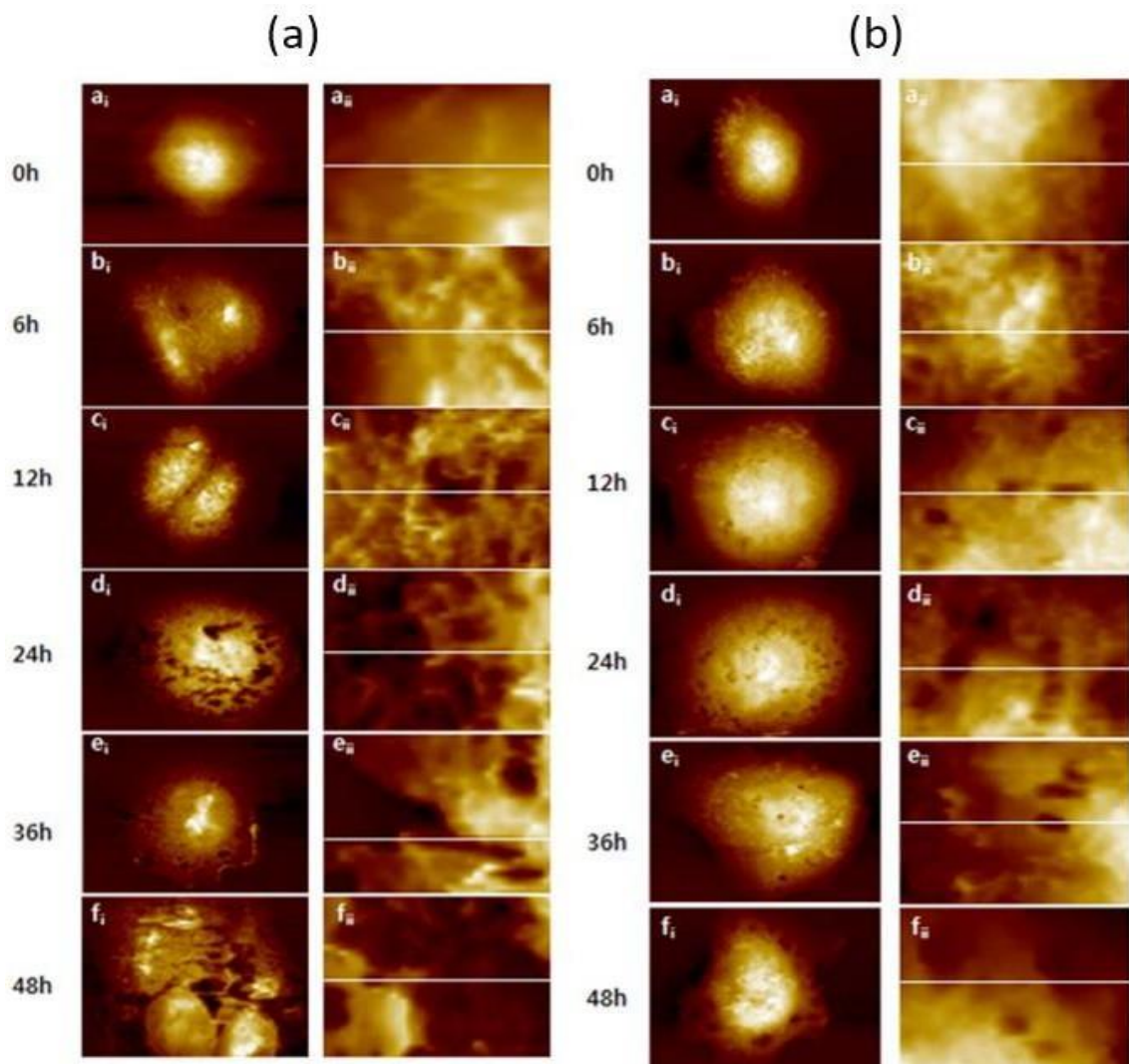


Figura 26. Imágenes AFM de células: a) Ishikawa, b) HeLa después de ser tratadas con paclitaxel en un tiempo (horas): 0, 6, 12, 24, 36, 48.

Fuente: (Kim et al. 2012)

Algunos estudios han reportado espectros Raman de células necróticas los cuales están asociados a un aumento o disminución de ciertos picos o bandas características para información más detallada ver Tabla 1.

En ese sentido, en este trabajo proponemos una correlación de Raman/AFM para brindar información biomecánica y estructural de los cambios en muerte por necrosis. Cuando ocurra una disminución de la rigidez, hinchazón celular o un incremento de altura celular podrá asociarse a aumentos o disminución de picos Raman característicos de un proceso de necrosis tales como, 667, 702, 717–725, 782, 811, 1003, 1047, 1052, 1,094– 1,102, 1,235, 1315, 1375, 1450 y 1658 cm^{-1} (Figura 27).(Brauchle et al. 2014)

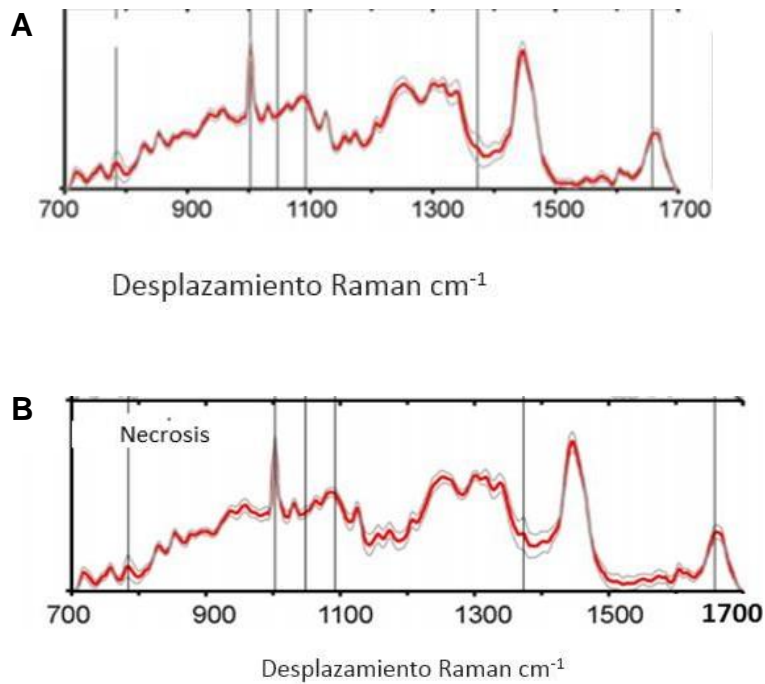


Figura 27. Espectro Raman de células en muerte celular por necrosis. A) Saos-2, B) SW-1353. Fuente:(Brauchle et al. 2014)

5.2 Aplicación en Apoptosis

Estudios recientes combinan las técnicas de Raman y AFM para obtener información de muerte celular por apoptosis. Un proceso que induce la apoptosis es la polimerización de tubulina y la inhibición del desmontaje de microtúbulos causando la muerte celular al interrumpir la función de microtúbulos requerida para la división celular y el proceso vital de interfase. Esta interferencia con la función de microtúbulos induce apoptosis en células cancerígenas y células secuestradoras de tubulina libre. En un estudio analizaron los cambios biomecánicos y estructurales de las células cuando mueren por apoptosis inducida por el fármaco Paclitaxel que actúa sobre mecanismos celulares y es importante para monitorear su acumulación en compartimientos celulares. Cuando una célula muere por apoptosis se han registrado cambios en la morfología celular, contracción citoplasmática, hinchazón de membrana plasmática, condensación de cromatina, fragmentación de ADN, así como la activación de muerte celular por la vía de las caspasas. (Derely et al. 2011)

El estudio de AFM mostró que las células se vuelven ovaladas, con un tamaño de 20-30 μm y un diámetro de 40-50 μm . En las imágenes de AFM se encontraron agujeros los cuáles incrementaban la aspereza de la capa externa. Para monitorear el efecto de paclitaxel en las propiedades mecánicas se llevó a cabo un análisis de las medidas elásticas, por el módulo de Young que es una medida de compresibilidad. El aumento del módulo de Young corresponde con células más rígidas (Figura 28) (Derely et al. 2011). El análisis AFM muestra el núcleo de la célula más blando que el citoplasma. Al comparar los datos de las células antes y después de ser tratadas se encontró una disminución significativa del módulo de Young en el núcleo y citoplasma. Los hallazgos de AFM demostraron el efecto de paclitaxel en células MCF7 que induce cambios mecánicos y morfológicos. (Derely et al. 2011)

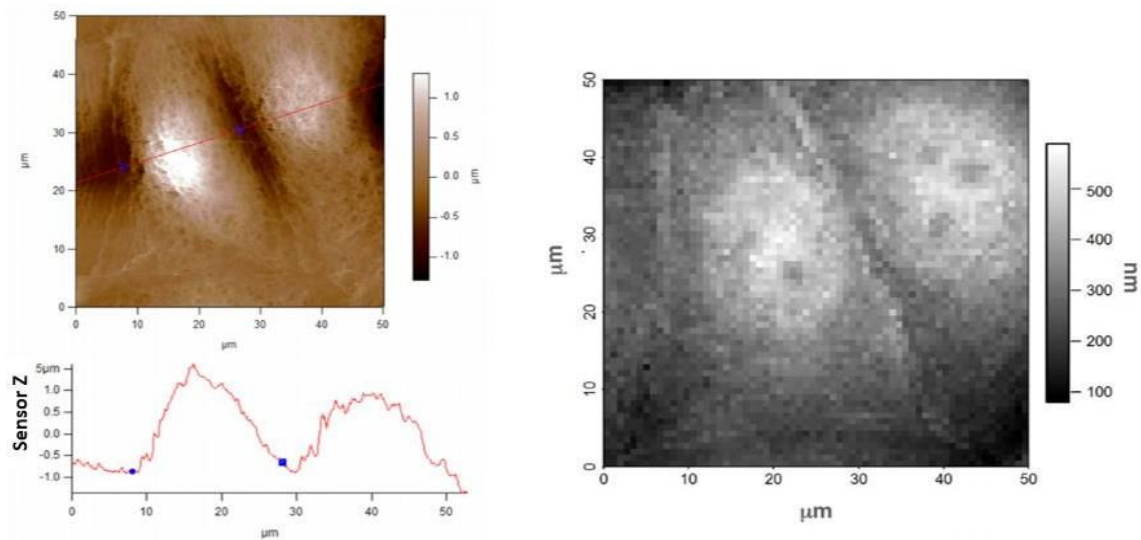


Figura 28. Análisis AFM de la altura y el mapeo de deformación elástica de las células MCF7 después de 3 horas de incubación con paclitaxel.

Fuente:(Derely et al. 2011).

Así mismo en este estudio se monitoreo el depósito de paclitaxel mediante espectroscopía Raman localizando el depósito de este fármaco en distintas áreas de la célula. La microscopía Raman reveló la aparición de paclitaxel en la célula, se encontró mayoritariamente en el citoplasma lo que coincide con una disminución con el módulo de Young en el citoplasma que lo hace más rígido (Figura 29). (Derely et al. 2011)

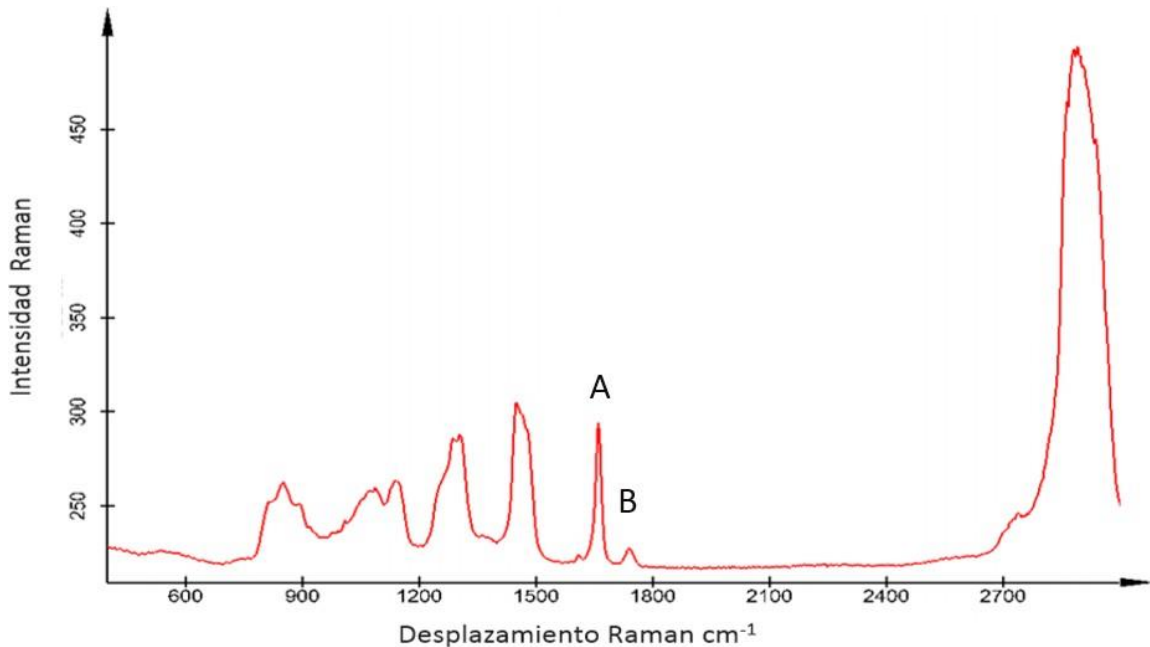


Figura 29. Espectro Raman de paclitaxel. Se registraron dos bandas. A) 1650 cm^{-1} que correspondía un anillo aromático y B) 1750 cm^{-1} que se registró como enlace peptídico. Fuente: (Derely et al. 2011)

Esto sugiere una correlación entre el efecto químico de la acumulación de paclitaxel en la red de microtúbulos y las modificaciones mecánicas observadas en el mapeo de deformación elástica. Estos métodos proveen una investigación en tiempo real de los componentes celulares debido a las vibraciones Raman. Las desventajas de este método son su sensibilidad al ruido y la baja intensidad de los picos seleccionados. Sin embargo, el análisis de microespectroscopía Raman ha sido una herramienta valiosa para la identificación de la composición química de muestras biológicas. (Derely et al. 2011). El estudio anterior nos muestra que es importante la combinación de las técnicas de espectroscopía Raman y AFM ya que nos ayudan a relacionar eventos de muerte celular, se logró localizar el paclitaxel, así como el efecto biomecánico en la célula.

Tabla 2. Espectro Raman de células MCF-7 tratadas con paclitaxel.

Aminoácido, proteína, enlace covalente	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Picos Raman de la célula asociados a
Triptófano	758	Proteína
Timina, citocina, fosfato	785-810	Núcleo
C-H	2800	Todos los compartimientos
Triptófano, tirosina	1619	Proteína
Amida I	1658	Proteína

Fuente: (Derely et al. 2011)

Tabla 3. Tabla comparativa de número de espectros y total de células analizadas.

Artículo	Células	Picos Raman (cm⁻¹)	No. de espectro por célula	Total de células analizadas
Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy	Saos-2	1003, 1047, 1375 1450 y 1658.	20	3-4
Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy	SW-1353	780-800, 1003, 1375 y 1658.	20	3-4
Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells.	Célula cancerígenas gástricas	782, 1092, 1320, 1340, 1576 y 1655.	1	20
Raman Spectra Analysis for Single Mitochondrias after Apoptosis Process of Yeast Cells Stressed by Acetic Acid.	Levadura seca	872, 1081, 1125, 1301, 1445, 1604 y 1657.	1	30

Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy.	Células de ovario de hámster chino	667, 702, 717–725, 782, 811, 1094, 1102, 1235, 1450 y 1575.	Nota. Cada espectro analiza 10 células aproximadamente	630
---	---	--	---	------------

Fuente: (Brauchle et al. 2014), (Yao et al. 2009), (Li et al. 2015), (Shreyas et al. 2018).

Tabla 4. Tabla comparativa de total de células analizadas y número de imágenes por célula.

Artículo	Células	Tipo de muerte celular	Total de células analizadas	No. de imágenes AFM por célula
Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization in human lung adenocarcinoma cells.	Células ASTC-a-1	Necrosis	30	4 para obtener altura celular
AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells.	Células Ishikawa y HeLa	Apoptosis	5-12	7 para obtener la altura y rigidez celular
AFM-detected apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by American ginseng root water extract.	Células cancerígenas hepatocelulares (SMMC-7721)	Apoptosis	8	3 para obtener el módulo de Young y altura celular

Fuente:(Wang et al. 2008), (Kim et al. 2012), (Qu et al. 2018)

CONCLUSIONES

En esta revisión, los artículos científicos muestran de forma muy clara que la microscopía Raman y el microscopio de fuerza atómica no han sido muy utilizados en el análisis de identificación y discriminación de apoptosis y necrosis.

En general, en el caso de microscopía Raman se han determinado los cambios en el espectro que sufren células vivas al inducirles muerte celular y cómo los picos del espectro pueden disminuir o aumentar según sea el caso. También se muestra, la relación de esa huella orgánica predeterminada y tratan de explicarlo con algún evento, ya sea por ejemplo la fragmentación de ADN de la apoptosis o en necrosis, en la destrucción de la célula.

En el caso de AFM se determina el tipo de muerte celular al observar los cambios morfológicos en la superficie de la célula que se observe considerando la rigidez, dureza, altura, módulo de Young, etc.

En todos los estudios de investigación la muerte celular siempre se comprobó con métodos convencionales ya que resultan, aunque menos precisos, más sencillos. Aun así, la necesidad de uso y especialización de nuevas tecnologías debería permitir estandarizar las tecnologías que son AFM y Raman. Los datos que nos pueden brindar ambas técnicas pueden ser muy valiosos a la hora de detallar los posibles mecanismos de muerte celular, en etapas más tempranas que la que nos brindan los métodos convencionales.

Los datos proporcionados por la combinación Raman-AFM nos pueden brindar información sobre posibles marcadores biológicos relacionados con el cáncer y otras enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Ghali, Majdouline, and Johnny Stiban. 2015. 'Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 760-72.
- Acosta-Elías, Monica, Andre Sarabia, Seidy Pedroso-Santana, Erika Silva-campa, Karla Santacruz-Gomez, Aracely Angulo Molina, B. Castaneda, Diego Soto, Marcelino Barboza-Flores, R. Melendrez, Susana Alvarez-Garcia, and Martin Pedroza-Montero. 2015. *Carboxylated nanodiamond and re-oxygenation process of gamma irradiated red blood cells*. *Physica status solidi*, 212, 2437-2444.
- Angulo Molina, Aracely, Miguel Angel Mendez-Rojas, Teresa Palacios, Oscar Edel Contreras-Lo'pez, Gustavo Alonso Hirata-Flores, Juan Flores-Alonso, Saul Merino-Contreras, Olivia Valenzuela, Jesu's Hernandez, and Julio Reyes-Leyva. 2014. *Magnetite nanoparticles functionalized with a-tocopheryl succinate (a-TOS) promote selective cervical cancer cell death*.
- Arakawa, Satoko, Ikuko Nakanomyo, Yoko Kudo-Sakamoto, Hiroshi Akazawa, Issei Komuro, and Shigeomi Shimizu. 2015. 'Identification of a novel compound that inhibits both mitochondria-mediated necrosis and apoptosis', *Biochemical and biophysical research communications*, 467: 1006-11.
- Barraza-Garza, Guillermo, Laura A. de la Rosa, Alejandro Martínez-Martínez, Hiram Castillo-Michel, Marine Cotte, and Emilio Alvarez-Parrilla. 2013. 'La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos', *Revista latinoamericana de química*, 41: 125-48.
- Bond, David, David A. Primrose, and Edan Foley. 2008. 'Quantitative Evaluation of Signaling Events in Drosophila S2 Cells', *Biological Procedures Online*, 10: 20-28.
- Borin, Daniele, Ilaria Pecorari, Brisa Pena, and Orfeo Sbaizero. 2017. *Novel insights into cardiomyocytes provided by atomic force microscopy*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 73, 4-12.
- Bozza, William, Julianne Twomey, Su-Ryun Kim, and Baolin Zhang. 2016. *Detection of Apoptosis: From Bench Side to Clinical Practice*. *Apoptosis Methods in Toxicology*, 13-29
- Brauchle, Eva, Sibylle Thude, Sara Y. Brucker, and Katja Schenke-Layland. 2014. 'Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy', *Scientific Reports*, 4: 4698.
- Bruce, Jason I. E. 2018. 'Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival()', *Cell Calcium*, 69: 28-36.
- Brunborg, Gunnar, Petra Jackson, Sergey Shaposhnikov, Hildegunn Dahl, Amaya Azqueta, Andrew R. Collins, and Kristine B. Gutzkow. 2014. 'High throughput sample processing and automated scoring', *Frontiers in Genetics*, 5: 373.
- Caruso, Rosario A., Giovanni Branca, Francesco Fedele, Eleonora Irato, Giuseppe Finocchiaro, Antonio Parisi, and Antonio Ieni. 2014. 'Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review)', *Oncology Letters*, 8: 1397-402.
- Cassiani Miranda, Carlos Arturo, and Mayra Tatiana Borrero Varona. 2013. 'Isquemia cerebral experimental y sus aplicaciones en la investigación en neurociencias', *Revista Salud Uninorte*, 29: 430-40.
- Castro-Ramos, Jorge. 2013. *Raman spectroscopy and its applications*. *Optica Pura y Aplicada*, 46, 83-95
- Chan, Francis. 2014. *Programmed Necrosis/Necroptosis: An Inflammatory Form of Cell Death*. *Cell death: Mechanism and disease*, 211-228.
- Chang, Kai-Chih, Yu-Wei Chiang, Chin-Hao Yang, and Je-Wen Liou. 2012. 'Atomic force microscopy in biology and biomedicine', *Tzu Chi Medical Journal*, 24: 162-69.

- Cho, Young Sik. 2014. 'Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (review)', *International journal of molecular medicine*, 33: 1401-06.
- Chtcheglova, Lilia A., and Peter Hinterdorfer. 2018. 'Simultaneous AFM topography and recognition imaging at the plasma membrane of mammalian cells', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73: 45-56.
- de Castro del Pozo, S., and J.L.P. Arellano. 2006. *Manual de patología general* (Masson). Ed.7, 908.
- Derakhshan, Mohammad, and Reza Derakhshan. 2015. 'Fasting and apoptosis: a mini review', *Journal of Fasting and Health*, 3: 166-68.
- Derey, L., P.-Y. Collart Dutilleul, Sylvain Michotte de Welle, V. Szabo, C. Gergely, and F. J. G. Cuisinier. 2011. "Raman confocal microscopy and AFM combined studies of cancerous cells treated with Paclitaxel." In *SPIE BiOS*, 8. SPIE.
- Dominguez Gortaire, Jose Antonio. 2017. *Caracterización in vitro de un profármaco derivado de la camptotecina para el tratamiento del Glioblastoma Multiforme*. Maestría en biotecnología y bioingeniería, 18-43.
- Dufrêne, Yves F., David Martínez-Martín, Izhar Medalsy, David Alsteens, and Daniel J. Müller. 2013. 'Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM', *Nature Methods*, 10: 847.
- Elmore, Susan. 2007. 'Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death', *Toxicologic Pathology*, 35: 495-516.
- Ferraro, John R. 2003. *Introductory raman spectroscopy* (Academic press).
- García-Belinchón, Mercè, María Sánchez-Osuna, Laura Martínez-Escardó, Carla Granados-Colomina, Sònia Pascual-Guiral, Victoria Iglesias-Guimaraes, Elisenda Casanelles, Judit Ribas, and Victor J. Yuste. 2015. 'An Early and Robust Activation of Caspases Heads Cells for a Regulated Form of Necrotic-like Cell Death', *The Journal of Biological Chemistry*, 290: 20841-55.
- Ghita, Adrian, Flavius Pascut, Virginie Sottile, Chris Denning, and Ioan Notingher. 2015. *Applications of Raman micro-spectroscopy to stem cell technology: label-free molecular discrimination and monitoring cell differentiation*. The journal EPJ Techniques and Instrumentation 2, 6.
- H. Vázquez-Nin, Gerardo, María Luisa Escobar, and Olga M. Echeverría. 2011. *Cell Death in Mammalian Ovary*. Cell Death in Mammalian Ovary, 221-232.
- Haq, Taseen Gul and Ehtishamul. 2017. 'Methods for the detection of apoptosis', *Research journal of life sciences, bioinformatics, pharmaceutical, and chemical sciences*, 3: 161.
- Hasanzadeh, Mohammad, Nasrin Shadjou, and Miguel de la Guardia. 2017. 'Early stage diagnosis of programmed cell death (apoptosis) using electroanalysis: Nanomaterial and methods overview', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93: 199-211.
- Hermelink, Antje, Angelika Brauer, Peter Lasch, and Dieter Naumann. 2009. 'Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy', *Analyst*, 134: 1149-53.
- Hu, Mingqian, Jiongkun Wang, Hongxia Zhao, Shisong Dong, and Jiye Cai. 2009. 'Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: From resting, activated to apoptosis', *Journal of Biomechanics*, 42: 1513-19.
- Iorga, Andrea, Lily Dara, and Neil Kaplowitz. 2017. 'Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis', *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- Jiang, Peiyue, and Ying Yue. 2014. 'Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review)', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7: 3-7.
- Kasas, S., and G. Dietler. 2018. 'DNA-protein interactions explored by atomic force microscopy', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73: 231-39.
- Kim, Jee-Eun, Jung Hyun Lim, Gye Sun Jeon, Je-Young Shin, Suk-Won Ahn, Seung Hyun Kim, Kwang-Woo Lee, Yoon-Ho Hong, and Jung-Joon Sung. 2017. 'Extrinsic Apoptosis Pathway Altered by Glycogen

- Synthase Kinase-3β Inhibitor Influences the Net Drug Effect on NSC-34 Motor Neuron-Like Cell Survival', *BioMed Research International*, 2017: 10.
- Kim, Kyung Sook, Chang Hoon Cho, Eun Kuk Park, Min-Hyung Jung, Kyung-Sik Yoon, and Hun-Kuk Park. 2012. 'AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells', *PLoS ONE*, 7: e30066.
- Kinoshita, Yuri, and Hidehisa Saeki. 2017. 'A review of toxic epidermal necrolysis management in Japan', *Allergology International*, 66: 36-41.
- Kopeć, Monika, and Halina Abramczyk. 2018. 'Angiogenesis - a crucial step in breast cancer growth, progression and dissemination by Raman imaging', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 198: 338-45.
- Kulikov, A. V., E. S. Shilov, I. A. Mufazalov, V. Gogvadze, S. A. Nedospasov, and B. Zhivotovsky. 2012. 'Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 1787-97.
- Kvansakul, Marc, Sofia Caria, and Mark G. Hinds. 2017. 'The Bcl-2 Family in Host-Virus Interactions', *Viruses*, 9: 290.
- Kyrylkova, Kateryna, Sergiy Kyryachenko, Mark Leid, and Chrissa Kioussi. 2012. 'Detection of Apoptosis by TUNEL Assay.' in Chrissa Kioussi (ed.), *Odontogenesis: Methods and Protocols* (Humana Press: Totowa, NJ). *Methods in Molecular Biology*, 887, 41-47.
- Lakshmanan, Imayavaramban, and Surinder K. Batra. 2013. 'Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method', *Bio-protocol*, 3: e374.
- Last, Julie A., Paul Russell, Paul F. Nealey, and Christopher J. Murphy. 2010. 'The Applications of Atomic Force Microscopy to Vision Science', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51: 6083-94.
- Li, Bing, Ming-Qian Lu, Qiao-Zhen Wang, Gui-Yu Shi, Wei Liao, and Shu-Shi Huang. 2015. 'Raman Spectra Analysis for Single Mitochondrias after Apoptosis Process of Yeast Cells Stressed by Acetic Acid', *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43: 643-50.
- Lin, Shanshan, Aiguo Ren, Linlin Wang, Yun Huang, Yuanyuan Wang, Caiyun Wang, and Nicholas Greene. 2018. 'Oxidative Stress and Apoptosis in Benzo[a]pyrene-Induced Neural Tube Defects', *Free Radical Biology and Medicine*, 116: 149-58.
- Liu, Huiqing, Nan Wang, Zhe Zhang, Hongda Wang, Jun Du, and Jilin Tang. 2017. 'Effects of Tumor Necrosis Factor- α ; on Morphology and Mechanical Properties of HCT116 Human Colon Cancer Cells Investigated by Atomic Force Microscopy', *Scanning*, 2017: 7.
- Long, Derek Albert. 1977. 'Raman spectroscopy', *New York*: 1-12.
- Martin-Sanchez, Diego, Jonay Poveda, Miguel Fontecha-Barriuso, Olga Ruiz-Andres, María Dolores Sanchez-Niño, Marta Ruiz-Ortega, Alberto Ortiz, and Ana Belén Sanz. 2018. 'Targeting of regulated necrosis in kidney disease', *Nefrología*, 38: 125-35.
- Moudříková, Šárka, Ladislav Nedbal, Alexei Solovchenko, and Peter Mojzes. 2017. *Raman microscopy shows that nitrogen-rich cellular inclusions in microalgae are microcrystalline guanine*. *Algal Research*, 23,216-222.
- Moura, Catarina, Rahul Tare, Richard Oreffo, and Sumeet Mahajan. 2016. *Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: Prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration*. *The Journal of the Royal Society Interface* 13(118).
- Muñoz Aristizábal, Andrés Felipe. 2009. 'EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN EN DOS POBLACIONES COLOMBIANAS DE AGRICULTORES Y FLORICULTORES', *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12: 7-16.
- Nagarkatti, Mitzi, Sadiye Amcaoglu Rieder, Dilip Vakharia, and Prakash S. Nagarkatti. 2010. 'Evaluation of Apoptosis in Immunotoxicity Testing', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 598: 241-57.
- Novalleski, Carolyn K., Bruce D. Carter, M. Preeti Sivasankar, Sheila H. Ridner, Mary S. Dietrich, and Bernard Rousseau. 2017. 'Apoptosis and Vocal Fold Disease: Clinically Relevant Implications of Epithelial Cell Death', *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*, 60: 1264-72.

- O'Callaghan, Yvonne C., Julie A. Woods, and Nora M. O'Brien. 2001. 'Limitations of the single-cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol', *Abbreviations: TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labelling of fragmented nuclear DNA in situ; 7 β OHC, 7 β -hydroxycholesterol; EtBr, Ethidium bromide*, *Biochemical Pharmacology*, 61: 1217-26.
- Okamoto, Toru, Tatsuya Suzuki, Shinji Kusakabe, Makoto Tokunaga, Junki Hirano, Yuka Miyata, and Yoshiharu Matsuura. 2017. 'Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection', *Viruses*, 9: 243.
- Opilik, Lothar, Thomas Schmid, and Renato Zenobi. 2013. 'Modern Raman Imaging: Vibrational Spectroscopy on the Micrometer and Nanometer Scales', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6: 379-98.
- Patravale, Vandana, Prajakta Dandekar, and Ratnesh Jain. 2012. '4 - Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles.' in, *Nanoparticulate Drug Delivery* (Woodhead Publishing). 123-155
- Pećina-Šlaus, Nives. 2010. 'Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review', *Cancer Cell International*, 10: 22-22.
- Proskuryakov, Sergey Y. a, Anatoli G. Konoplyannikov, and Vladimir L. Gabai. 2003. 'Necrosis: a specific form of programmed cell death?', *Experimental Cell Research*, 283: 1-16.
- Pyrgiotakis, Georgios, O. Kundakcioglu, Kathryn Finton, Panos Pardalos, Kevin Powers, and Brij Moudgil. 2009. *Cell Death Discrimination with Raman Spectroscopy and Support Vector Machines*. *Annals of Biomedical Engineering*, 37, 1464-73.
- Qu, Yingmin, Zuobin Wang, Feihu Zhao, Jinyun Liu, Wenxiao Zhang, Jingmei Li, Zhengxun Song, and Hongmei Xu. 2018. 'AFM-detected apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by American ginseng root water extract', *Micron*, 104: 1-7.
- Rahbar Saadat, Yalda, Nazli Saeidi, Sepideh Zununi Vahed, Abolfazl Barzegari, and Jaleh Barar. 2015. 'An update to DNA ladder assay for apoptosis detection', *BioImpacts : BI*, 5: 25-28.
- Ramírez Agudelo, María Elena, and Mauricio Rojas López. 2010. 'La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular', *Iatreia*, 23: 166-77.
- Rodríguez-Rey, Alexis, Elena Noris-García, and María Teresa Fundora Torres. 2016. 'Principios y relevancia del ensayo cometa', *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35: 184-94.
- Román, Ignacio Raúl Rosas. 2012. 'Desarrollo de un Sistema Raman para el Control de Calidad de Materias Primas', *Grado de Maestro en Optomecatrónica, Centro de investigaciones en optica, A.C.*
- Sahin, Ozgur, Sergei Magonov, Chanmin Su, Calvin F. Quate, and Olav Solgaard. 2007. 'An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces', *Nature Nanotechnology*, 2: 507.
- Santacruz-Gomez, K., E. Silva-Campa, R. Melendrez-Amavizca, F. T. Arce, V. Mata-Haro, P. B. Landon, C. Zhang, M. Pedroza-Montero, and R. Lal. 2016. 'Carboxylated nanodiamonds inhibit gamma-irradiation damage of human red blood cells', *Nanoscale*, 8: 7189-96.
- Shaker, Ghada H., and Nahla A. Melake. 2012. 'Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies', *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*, 20: 221-27.
- Shamsipur, Mojtaba, Fatemeh Molaabasi, Saman Hosseinkhani, and Fereshteh Rahmati. 2016. 'Detection of Early Stage Apoptotic Cells Based on Label-Free Cytochrome c Assay Using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Fluorescent Probes', *Analytical Chemistry*, 88: 2188-97.
- Shreyas, Rangan, Kamal Sepehr, Konorov Stanislav O., Schulze Hans Georg, Blades Michael W., Turner Robin F. B., and Piret James M. 2018. 'Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy', *Biotechnology and Bioengineering*, 115: 401-12.

- Solé, Jose, Luisa Bausa, and Daniel Jaque. 2005. *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids* (John Wiley & Sons).
- Spiro, Thomas G. 1974. 'Resonance Raman spectroscopy. New structure probe for biological chromophores', *Accounts of Chemical Research*, 7: 339-44.
- Spiro, Thomas G., and Thomas C. Streckas. 1974. 'Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state', *Journal of the American Chemical Society*, 96: 338-45.
- Suman, Shubhankar, Akshay Pandey, and Sudhir Chandna. 2012. 'An improved non-enzymatic "DNA ladder assay" for more sensitive and early detection of apoptosis', *Cytotechnology*, 64: 9-14.
- Sun, Yu, and Wei-Xing Zong. 2016. 'Cellular Apoptosis Assay of Breast Cancer.' in Jian Cao (ed.), *Breast Cancer: Methods and Protocols* (Springer New York: New York, NY). *Methods in Molecular Biology* 1406, 139-149
- Taatjes, Douglas J., Burton E. Sobel, and Ralph C. Budd. 2008. 'Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis', *Histochemistry and Cell Biology*, 129: 33-43.
- Takanezawa, Sota, Shin-ichi Morita, Yukihiro Ozaki, and Yasushi Sako. 2015. 'Raman Spectral Dynamics of Single Cells in the Early Stages of Growth Factor Stimulation', *Biophysical Journal*, 108: 2148-57.
- Tomei, L.D., and F.O. Cope. 1991. *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Vahabi, Surena, Bahareh Nazemi Salman, and Anahita Javanmard. 2013. 'Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study', *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38: 76-83.
- Vanden Berghe, Tom, Sasker Grootjans, Vera Goossens, Yves Dondelinger, Dmitri V. Krysko, Nozomi Takahashi, and Peter Vandenabeele. 2013. 'Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo', *Methods*, 61: 117-29.
- Vermes, István, Clemens Haanen, Helga Steffens-Nakken, and Chris Reutellingsperger. 1995. 'A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V', *Journal of Immunological Methods*, 184: 39-51.
- Villamor, N. 2004. 'Apoptosis: mecanismos celulares e implicaciones clínicas', *Haematologica*, 89: 126-48.
- Walker, P. Roy, Julie Leblanc, Brandon Smith, Siyaram Pandey, and Marianna Sikorska. 1999. 'Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis', *Methods*, 17: 329-38.
- Wang, Kewei. 2014. 'Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis', *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 66: 351-56.
- Wang, Xiao-Ping, Tong-Sheng Chen, Lei Sun, Ji-Ye Cai, Ming-Qian Wu, and Martin Mok. 2008. *Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization in human lung adenocarcinoma cells*. *Micron* 39, 1216-1221
- Yang, Ruiguo, Carmen Kar Man Fung, Kristina Seiffert-Sinha, Ning Xi, King Wai Chiu Lai, and Animesh A. Sinha. 2010. "Real time identification of apoptosis signaling pathways using AFM-based nano robot." In, 117-20.
- Yao, Huilu, Zhanhua Tao, Min Ai, Lixin Peng, Guiwen Wang, Bijuan He, and Yong-qing Li. 2009. 'Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells', *Vibrational Spectroscopy*, 50: 193-97.
- Ying, Yuan, and Babu J. Padanilam. 2016. 'Regulation of necrotic cell death p53, PARP1 and Cyclophilin D - overlapping pathways of regulated necrosis?', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73: 2309-24.
- Zapletalová, Hana. 2016 'Combination of atomic force microscopy and comet assay for analysis of DNA damage induced by pdt', *Lékařská technika*, 46: 83-90.

- Zeestraten, Eliane C. M., Anne Benard, Marlies S. Reimers, Philip C. Schouten, Gerrit J. Liefers, Cornelis J. H. van de Velde, and Peter J. K. Kuppen. 2013. 'The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in#Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry', *Biomarkers in Cancer*, 5: 13-29.
- Zeng, Cheng, Caitlin Vitale-Sullivan, and Xiang Ma. 2017. 'In Situ Atomic Force Microscopy Studies on Nucleation and Self-Assembly of Biogenic and Bio-Inspired Materials', *Minerals*, 7: 158.

