



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“Detección de HER2 en células de carcinoma de
mama mediante sustratos funcionalizados”**

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias (Química)

presenta

M. en C. Alexandro Téllez Plancarte

Asesor: Dr. Nikola Batina Skeledzija

Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Área Electroquímica,
Departamento de Química, CBI, UAM-I.

Coasesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Biología de la Reproducción,
CBS, UAM-I.

Jurado Evaluador

Dr. Nikola Batina Skeledzija

Dra. Dolores Silvia Solís Mendiola

Dr. Ulises Páramo García

Dr. Iván Rafael Quevedo Partida

Dr. Ulises Arellano Sánchez

Presidente

Secretaria

Vocal

Vocal

Vocal

Ciudad de México, a 8 de enero de 2019



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00155

Matricula: 2131800294

Detección de HER2 en células de carcinoma de mama mediante sustratos funcionalizados.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 8 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA
DR. ULISES ARELLANO SANCHEZ
DR. ULISES PARAMO GARCIA
DR. IVAN RAFAEL QUEVEDO PARTIDA
DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: ALEXANDRO TELLEZ PLANCARTE



ALEXANDRO TELLEZ PLANCARTE
ALUMNO

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

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA

VOCAL

DR. ULISES ARELLANO SANCHEZ

VOCAL

DR. ULISES PARAMO GARCIA

VOCAL

DR. IVAN RAFAEL QUEVEDO PARTIDA

SECRETARIA

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

Agradecimientos

Agradezco el apoyo económico del CONACyT, por medio de la beca (CVU/Número de becario: 507572/286007) otorgada para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias (Química) en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Estoy muy agradecido con el Dr. Nikola Batina y Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura por haberme acogido en sus respectivos equipos de trabajo y por sus invaluable conocimientos científicos que adquirí en el transcurso de mi estadía en sus diferentes laboratorios de investigación.

Al Dr. Emmanuel Haro Poniatowski y al Dr. Michel Picquart por su invaluable apoyo en la preparación de los sustratos nanoestructurados, así como por sus comentarios y correcciones para la mejora del artículo.

Al M. en C. José Morales Méndez por su ayuda en la preparación de los sustratos nanoestructurados por deposición de láser pulsado.

Al Dr. Luis Escobar Alarcón del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por su apoyo incondicional en la realización de los espectros Raman, así como por sus comentarios y correcciones para la mejora del artículo.

A la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) por la alícuota de células SKBR3 que nos donó para los experimentos.

Al Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar por su ayuda en la preparación de las muestras para inmunocitoquímica y su visualización a través de la cámara de fluorescencia ZOE.

A mis amigos, Carlos Lara Cruz, Israel Morales Reyes Elia Karina Velázquez Mejía, Paulina Hernández Garcés, Gregorio Nicolás Juárez Luna y María Cristina Acosta García con quienes compartí varias experiencias en el laboratorio durante nuestra estadía en el posgrado.

A mis amigos de trabajo Luis Fernando García Melo, Verónica Santamaría Dávila, Rosa Natali Pineda Cruces y Jorge Alfredo Ramírez Campoy (NanoTeam) con los cuales compartí muchos momentos inolvidables.

A Alma Delia Antonio Pascual por su amistad y su ayuda con las correcciones ortográficas de mis reportes de investigación

A mi novia, Jessica del Rocío Arrieta Aguirre, por brindarme ánimo en cada momento, compartir bellos recuerdos, ser incondicional en todo momento y por ser mi correctora de estilo. ¡Infinitas gracias!

A mis padres Camerino y Eloísa, ya que, pese a carecer de educación superior, siempre enfatizaron sobre la importancia de superarme profesionalmente.

A mi hermano Kevin, para quien espero ser un ejemplo de dedicación y deseo el mayor de los éxitos.

A mis sinodales:

Dr. Nikola Batina Skeledzija	Departamento de Química, UAM-Iztapalapa
Dra. Dolores Silvia Solís Mendiola	Departamento de Química, UAM-Iztapalapa
Dr. Ulises Páramo García	División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Ciudad Madero
Dr. Iván Rafael Quevedo Partida	Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana
Dr. Ulises Arellano Sánchez	Departamento de Química, UAM-Iztapalapa

Con los cuales estoy muy agradecido por sus valiosos comentarios y observaciones, así como por su amable disponibilidad para que la presente tesis estuviera en tiempo y forma.

¡Esta vez es hora de emprender el vuelo y dar lo mejor!

Glosario

Todos estos términos son citados en el presente trabajo y se muestran para una mejor comprensión de la lectura. Las siglas se derivan del inglés, sin embargo, se preservan en el texto.

PLD: Deposición de láser pulsado

SAMs: Monocapas autoensambladas

4-MBA: Ácido 4-mercaptopbenzoico

CLSM: Microscopía confocal de barrido láser

AFM: Microscopía de fuerza atómica

SERS: Dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie

FSNP: Placas nanoestructuradas de plata funcionalizada

FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

HER2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

P-gp: Glicoproteína de permeabilidad

GTF2b: Factor de transcripción general IIB

EDIL3: Proteína 3 con dominio parecido a discoidina I y repeticiones parecidas al factor de crecimiento epidérmico

EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial

ACS: Sociedad americana del cáncer

BI-RADS: Reporte de imágenes de mama y sistema de datos

ATCC: Colección americana de tipos de cultivo

EDC-HCl: Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

NHS: Hidrocloruro de etanolamina, N-hidroxisuccinimida

DAPI: 4',6-diamidino-2- fenilindol

AOTFs: Filtros sintonizables acusto-ópticos de alta velocidad

SDS: Dodecil sulfato de sodio

PBS: Solución buffer de fosfato

RMS: Raíz cuadrática media

AgNPs: Nanopartículas de plata

ATR: Reflectancia total atenuada

Resumen

Los biosensores presentan un gran potencial para la detección de cáncer a través del uso de biomarcadores moleculares asociados a tumores. En este trabajo, se presenta la inmovilización del anticuerpo monoclonal anti-HER2 recombinante humanizado (trastuzumab) sobre una placa nanoestructurada de plata preparada por deposición de láser pulsado (PLD), sobre una película delgada de Au(111), por ser este el material que presentó mayor adherencia con las nanoestructuras de plata.

La inmovilización se realizó a través de monocapas autoensambladas de ácido 4-mercaptobenzoico (4 MBA SAMs) que se activaron con los reactivos de acoplamiento (EDC/NHS). Una combinación de imágenes de inmunofluorescencia y análisis z-stack por Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) permitió detectar la presencia y distribución de HER2 en las membranas celulares de las diferentes líneas celulares analizadas.

Cuatro líneas celulares de cáncer de mama que expresan HER2 en diferentes proporciones (SKBR3 +++, MCF-7 +/-, T47D +/-, MDA-MB-231 -) se incubaron durante 24 horas en placas nanoestructuradas de plata funcionalizada (FSNP) y también sobre películas planas de Au(111). Las células se fijaron por medio de un tren de deshidratación por etanol, luego se caracterizaron por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS). Los resultados de SERS mostraron una tendencia similar que los hallazgos por CLSM (SKBR3 > MCF-7 > T47D > MDA-MB-231), especialmente cuando se monitoreó el pico Raman asociado con el aminoácido de fenilalanina a 1002 cm^{-1} .

Debido a la alta selectividad y alta sensibilidad de SERS con una placa nanoestructurada de plata funcionalizada (FSNP), se propone este método para identificar la presencia de HER2 en células de cáncer de mama. Es importante señalar que SERS es una técnica novedosa que podría complementar a las técnicas convencionales para la identificación de HER2.

Abstract

Biosensor technology has great potential for the detection of cancer through tumor-associated molecular biomarkers. In this work, we describe the immobilization of the recombinant humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) on a silver nanostructured plate made by pulsed laser deposition (PLD), over a thin film of Au(111).

Immobilization was performed via 4-mercapto benzoic acid self-assembled monolayers (4-MBA SAMs) that were activated with coupling reagents. A combination of immunofluorescence images and z-stack analysis by confocal laser scanning microscopy (CLSM) allowed us to detect HER2 presence and distribution in the cell membranes. Four different HER2-expressing breast cancer cell lines (SKBR3 +++, MCF-7 +/-, T47D +/-, MDA-MB-231 -) were incubated during 24 h on functionalized silver nanostructured plates (FSNP) and also on Au(111) thin films.

The cells were fixed by means of an ethanol dehydration train, then characterized by atomic force microscopy (AFM) and surface-enhanced Raman scattering (SERS). SERS results showed the same tendency as CLSM findings (SKBR3 > MCF-7 > T47D > MDA-MB-231), especially when the Raman peak associated with phenylalanine amino acid (1002 cm^{-1}) was monitored. Given the high selectivity and high sensitivity of SERS with a functionalized silver nanostructured plate (FSNP), we propose this method for identifying the presence of HER2 and consequently, of breast cancer cells.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Glosario.....	iii
Resumen.....	2
Abstract.....	3
1. INTRODUCCIÓN	
Introducción.....	6
1.1 Antecedentes.....	10
1.2 Hipótesis.....	11
1.3 Justificación.....	11
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos particulares.....	12
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
2.1 Reactivos.....	13
2.2 Funcionalización de placas nanoestructuradas de plata.....	14
2.2.1 Objetivo particular 1.....	14
2.2.2 Materiales y Métodos.....	14
2.2.2.1 Diseño de placas nanoestructuradas de plata funcionalizada (FSNP).....	14
2.2.2.2 Deposición por Láser Pulsado (PLD).....	16
2.2.3 Resultados y Discusión.....	17
2.2.3.1 Análisis de PLD y FSNP.....	17
2.3 Análisis de la presencia de HER2 en células de cáncer de mama.....	18
2.3.1 Objetivos particulares 2 y 3.....	18
2.3.2 Materiales y Métodos.....	18
2.3.2.1 Cultivos de líneas celulares de carcinoma de mama.....	18
2.3.2.2 Análisis de expresión de HER2 por Inmunocitoquímica.....	19
2.3.2.3 Análisis por Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) y <i>Z-stack</i>	20
2.3.2.4 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	39

2.3.2.5 Cuantificación de la rugosidad superficial ($RMS_{[Rq]}$) de las membranas plasmáticas de células cancerosas por AFM.....	48
2.3.3 Resultados y Discusión.....	52
2.3.3.1 Análisis de la presencia de HER2 por CLSM y <i>Z-stack</i>	52
2.3.3.2 Análisis de la rugosidad superficial por AFM.....	54
2.4 Caracterización por dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS) y por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	55
2.4.1. Objetivo particular 4.....	55
2.4.2 Materiales y Métodos.....	55
2.4.2.1 Visualización por microscopía óptica de las células adheridas al FSNP.....	55
2.4.2.2 Caracterización por SERS.....	56
2.4.2.3 Caracterización por FTIR.....	65
2.4.3 Resultados y Discusión.....	68
2.4.3.1 Análisis de la visualización celular por microscopía óptica.....	68
2.4.3.2 Análisis por SERS.....	68
2.4.3.3 Análisis por FTIR.....	71
3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	72
4. REFERENCIAS.....	74
5. APÉNDICE.....	80
Publicación	

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y, de acuerdo a los análisis de los perfiles de expresión génica, se ha clasificado en al menos cinco diferentes subtipos con propiedades biológicas diferentes [1]. En la práctica, la clasificación del cáncer de mama depende de la expresión de receptores nucleares de estrógenos y de progesterona, así como la expresión del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2; por las siglas en inglés de Human Epidermal growth factor Receptor, type 2) [2,3].

Los receptores celulares son responsables de transducir las señales del exterior al interior de la célula. Estas señales le indican a la célula que crezca, prolifere y sobreviva y su activación está fuertemente regulada en las células normales [4]. La familia ErbB está formada por cuatro miembros estructuralmente relacionados, los cuales son EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4. Los miembros de esta familia son capaces de homo- o heterodimerizar, así que son posibles múltiples combinaciones entre ellos (*e.g.* HER2-HER3, HER2-HER4, etc.). HER2 es el compañero de dimerización preferido para todos los miembros de esta familia, ya que existe en una conformación abierta que está dinámicamente accesible [4-6]. Adicionalmente, HER2 está implicado en muchos cánceres humanos (*e.g.* mama, ovario, gástrico, colorrectal, páncreas, endometrio) [7,8].

HER2 pertenece a la familia de receptores con actividad enzimática de tirosina cinasa (RTKs) y juega un rol esencial en el crecimiento, diferenciación y motilidad celular, adicionalmente median la transducción de señales a través de la membrana plasmática vía dimerización, lo que regula su actividad [9]. Cabe señalar que HER2 es considerado receptor “huérfano”, debido a que no se conoce su ligando y su activación es independiente de éste.

La sobreexpresión de receptores HER2 (número muy superior al normal), debido a una amplificación génica (mayor número de copias de genes) aumenta la probabilidad de interacciones causales y de la formación de homo- o heterodímeros [10]. La expresión del protooncogén HER2 en células epiteliales de mama da origen a una glicoproteína transmembrana de 185 kDa cuya sobreexpresión se encuentra implicada en 20-30% de los

diferentes subtipos de cánceres de mama, adicionalmente, se correlaciona con tumores muy agresivos y una pobre prognosis [11]. La sobreexpresión de HER2 es causada por la amplificación del gen *c-erbB-2*, el cual da lugar a 1-2 millones de receptores HER2 por célula, comparado a los 20,000-50,000 receptores que se expresan sobre la superficie de células epiteliales de mama normales [12].

Un biosensor es un dispositivo analítico que tiene un bioreceptor (e.g. anticuerpo) anclado sobre su superficie, el cual al interactuar con una molécula denominada analito (e.g. antígeno) lleva a cabo una reacción bioquímica o unión específica, y mediante un transductor de señal (e.g. óptico) la interacción bioreceptor-analito que resulta se convierte en una señal eléctrica medible. Para que el biosensor pueda ser útil, la intensidad de la señal generada debe ser directamente proporcional a la concentración del analito. Los bioreceptores pueden ser inmovilizados sobre un soporte sólido a través de: fisisorción (e.g. superficie catiónica/aniónica o superficie hidrofílica/hidrofóbica) o quimisorción (e.g. monocapas autoensambladas de moléculas heterobifuncionales) [13].

Un tipo de biosensor es el inmunosensor, que se basa en la habilidad de un anticuerpo para formar un complejo estable con su correspondiente antígeno [14]. Nuevos métodos sensibles y específicos para la detección de cáncer, tales como los nanobiosensores con biomarcadores moleculares confiables son útiles para lograr la detección temprana de la enfermedad. Por ejemplo, Chandra *et al.* diseñaron un nanobiosensor amperométrico para la detección de la “bomba” molecular llamada glicoproteína de permeabilidad (P-gp), la cual se expresa sobre las membranas de células tumorales resistente a múltiples fármacos y que está implicada en la expulsión de quimiofármacos de las células [15]. Por otro lado, Soler *et al.* construyeron un nanobiosensor plasmónico para la detección de los autoanticuerpos séricos GTF2b (Factor de transcripción general IIB) y EDIL3 (Proteína 3 con dominio parecido a discoidina I y repeticiones parecidas al factor de crecimiento epidérmico), los cuales están implicados en el desarrollo del cáncer de colon en etapas tempranas, mientras que Pallela *et al.* desarrollaron un nanobiosensor amperométrico para la detección de la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), la cual se sobreexpresa en células metastásicas de cáncer (e.g. colorectal, tiroides, ovario, endometrio, gástrico) [16,17].

El trastuzumab (anti-HER2) es un anticuerpo monoclonal recombinante (inducido en ratón y posteriormente humanizado para que no pueda ser reconocido por el sistema inmune humano como algo extraño), que se une selectivamente con alta afinidad al subdominio IV del dominio extracelular de HER2, bloquea la ruptura del dominio extracelular, lo que previene la formación de la forma truncada del receptor HER2 (p95-HER2) la cual está asociada con supervivencia libre de enfermedad muy corta, bloquea la heterodimerización HER2-HER3 (la más activa con respecto a la fosforilación inducida por ligando y activación de la cascada de señalizaciones corriente abajo), inhibe las rutas de transducción de señales de HER2, desencadena las respuestas mediadas por el sistema inmune contra las células que sobreexpresan HER2 para producir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, inhibiendo así la proliferación celular y aumentando la supervivencia de mujeres con tumores que expresan HER2 [18].

La contribución del presente trabajo de investigación es el diseño de placas nanoestructuradas de plata funcionalizada (FSNPs) capaces de reconocer, bajo condiciones pseudo-fisiológicas, el dominio extracelular de HER2 en cuatro líneas celulares de cáncer de mama (SKBR3, MCF-7, T47D, MDA-MB-231) que presentan expresión diferencial de HER2 superficial, tal reconocimiento molecular fue detectado por dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS). Varios reportes en la literatura científica han observado un aumento en la intensidad Raman de los modos de vibración asociados con el aminoácido fenilalanina en muestras de cáncer que fueron analizadas por espectroscopía Raman, por lo que en el presente estudio se propone que los picos Raman de fenilalanina podrían ser usados como una etiqueta para la identificación de la heterogeneidad de HER2 en células de carcinoma de mama.

Las diferentes técnicas usadas en el presente trabajo de investigación se resumen en la Tabla 1 para una mejor comprensión de los motivos de su elección:

Técnicas usadas en el presente trabajo	Motivos por los cuales se usaron
PLD	Embeber nanoestructuras de plata sobre un soporte de Au(111).
CLSM	Análisis de la presencia y distribución de HER2 en células de carcinoma de mama.
Z-stack	Verificación de receptores superficiales HER2 en células de carcinoma de mama.
AFM	Análisis de la rugosidad superficial de las membranas plasmáticas adheridas sobre los diferentes sustratos.
Espectroscopía Raman / SERS	Caracterización del FSNP y su interacción con las membranas plasmáticas adheridas sobre los diferentes sustratos.
FTIR	Caracterización del sustrato comercial AuTR10 funcionalizado y su interacción con las membranas plasmáticas adheridas sobre estos.

Tabla 1. Resumen de las diferentes técnicas experimentales usadas en el presente trabajo de investigación.

Fuente: Elaboración propia.

NOTA: Las imágenes que se usaron en la publicación que se anexó al final de la presente tesis fueron: Fig.: 13, 20, 23 a), 25 a), 27 a), 33, 38, 40 y Tabla 3.

1.1 Antecedentes

Trabajos previos reportados en la literatura científica	Técnica(s)
Conjugación del trastuzumab con nanocristales de $MnFe_2O_4$ para la detección de células de cáncer de mama.	Imagenología por Resonancia Magnética
Conjugación de puntos cuánticos de $CuInZn(x)S(2+x)$ con anti-HER2 como sondas para la detección de células de cáncer de mama HER2 positivas.	Microscopía Confocal
Conjugación de nanopartículas de óxido de hierro con anti-HER2 para la detección de cáncer de mama.	Imagenología por Resonancia Magnética
Terapia fotodinámica mediante nanocompuestos para la visualización teranóstica de HER2 sobreexpresado en células de cáncer de mama.	Luminiscencia, Imagenología por Resonancia Magnética
Conjugación de nanopartículas de plata con anti-HER2 para la detección de células de cáncer de mama.	SERS

Tabla 2. Algunos trabajos previos reportados en la literatura científica. **Fuente:** Elaboración propia con base en las referencias [19-23].

A pesar de que los reportes de dichas investigaciones tienen como objetivo la detección de la sobreexpresión de HER2 en células de cáncer de mama, ninguna tiene la característica de un nanobiosensor, es decir, tener un soporte sólido. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende el desarrollo de una plataforma nanoestructurada funcionalizada que sea selectiva para células de cáncer de mama HER2 positivas, haciendo uso de la dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS), para obtener una “huella dactilar” espectroscópica asociada a células HER2 positivas que permita distinguir las.

1.2 Hipótesis

El uso de una superficie nanoestructurada funcionalizada con el anticuerpo trastuzumab incrementará la sensibilidad para la identificación de HER2 en células de cáncer de mama.

1.3 Justificación

En 2012 se estimaron aproximadamente 1,676,600 de nuevos casos de cáncer de mama en mujeres a nivel global, de los cuales se esperaban 521,900 decesos debido a esta enfermedad [24].

Mientras más temprano se detecta el cáncer de mama, mayor tiempo de supervivencia. En México la detección del cáncer se realiza en etapas avanzadas, principalmente mediante mastografías, donde el grado de avance es mayor, es decir, se presentan tumores ≥ 5 mm de diámetro [25], además de que del 10-15% de los resultados son falsos negativos. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer (ACS) los radiólogos certificados pueden categorizar los resultados de las mastografías llamados mamogramas utilizando un sistema de clasificación discreto llamado BI-RADS (por las siglas en inglés de Breast Imaging Reporting and Data System) que permite evaluar la densidad de la mama (descripción de qué tan glandular y fibroso es el tejido de las mamas respecto al tejido graso o adiposo). La limitación de esta técnica es que sólo se puede evaluar un área de muestreo muy grande que es la mama, mientras que con un nanobiosensor sería factible analizar desde una sola célula con la ayuda de la Dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS).

Debido a las limitaciones de la mastografía, que es *de facto* la principal técnica de detección de cáncer de mama, es necesario investigar otras técnicas de identificación de cáncer de mama, tal como una plataforma nanoestructurada funcionalizada, que sea capaz de identificar la heterogeneidad del receptor HER2 que se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer de mama debido a la progresión de la enfermedad.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar sustratos nanoestructurados funcionalizados para la identificación diferencial de HER2 en células de cáncer de mama humano por medio de diferentes técnicas.

1.4.2 Objetivos particulares

- Funcionalizar las superficies de los sustratos nanoestructurados con el anticuerpo trastuzumab para la detección de HER2.
- Analizar la presencia y distribución del receptor HER2 en diferentes líneas celulares de carcinoma de mama por CLSM y *Z-stack*.
- Caracterizar a nivel nanométrico por AFM las rugosidades superficiales de las diferentes membranas plasmáticas adheridas a las superficies (funcionalizadas y no funcionalizadas).
- Caracterizar por SERS la interacción de los sustratos nanoestructurados funcionalizados para la detección de células de cáncer de mama que expresan HER2 en forma diferencial.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos

Las líneas celulares MCF-7 (Luminal B; HER2 +/-), T47D (Luminal A; HER2 +/-) y MDA-MB-231 (HER2 -) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), SKBR3 (HER2 +++) fueron donadas por la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se utilizaron los siguientes materiales: medio de cultivo DMEM, medio de cultivo RPMI, medio de cultivo F12, suero bovino fetal, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, piruvato de sodio, placa de 6 pocillos de Nunclon, Alexa Fluor 594 (anticuerpo secundario) y penicilina/estreptomicina (antibiótico/ antifúngico) los cuales se compraron de Thermo Fisher Scientific, Ciudad de México, México.

El clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC·HCl) se adquirió de Life Technologies, Ciudad de México, México. Los anticuerpos contra HER2/ErbB2 (D8F12/4290P) se obtuvieron de Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU. El anticuerpo monoclonal anti-HER2/Neu (sc-33684) y el ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE.UU.

Se adquirieron hidrocloreuro de etanolamina, N-hidroxisuccinimida (NHS) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de Sigma-Aldrich, Toluca de Lerdo, Estado de México, México. Se utilizó agua ultrapura de un sistema Milli-Q (Millipore, Burlington, MA, EE.UU.), Herceptina (trastuzumab, nombre genérico) de Roche-México, membrana de diálisis de corte molecular de 3.5 kDa (Spectrum Labs, Rancho Domínguez, CA, EE.UU.) y otros reactivos de grado analítico. Se obtuvieron placas de Au(111) para mediciones de AFM y SERS de Arrandee Co., Werther (Westfalen, Alemania). El blanco de plata puro al 99.99% (1.00 diámetro x 0.259 espesor) para la deposición por láser pulsado (PLD) se obtuvo de Kurt J. Lesker Co., Jefferson Hills, PA, EE.UU.

2.2 Funcionalización de placas nanoestructuradas de plata

2.2.1. Objetivo particular 1

Funcionalizar las superficies de los sustratos nanoestructurados con el anticuerpo trastuzumab para la detección de HER2.

2.2.2 Materiales y Métodos

2.2.2.1 Diseño de placas nanoestructuradas de plata funcionalizada (FSNP)

En una investigación previa se describieron las condiciones óptimas para la inmovilización orientada del trastuzumab sobre una superficie nanoestructurada con nanopartículas de plata [26], mismas que se presentan a continuación:

La adsorción de las monocapas autoensambladas (SAMs) de la molécula heterobifuncional ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA-SAMs) sobre una superficie nanoestructurada se logró bajo las siguientes condiciones: 10 mM de 4-MBA disuelto en alcohol etílico absoluto e inmersión del sustrato durante 15 segundos, seguida de la adición una solución de ácido acético, a pH 1.8, para la protonación del ácido carboxílico.

Una vez formadas las monocapas autoensambladas de ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA-SAMs) se dejan desecar para que la superficie se deshidrate.

Los reactivos de acoplamiento N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC·HCl) y N-Hidroxisuccinimida (NHS) forman un éster parcialmente estable que permite el acoplamiento del anticuerpo monoclonal anti-HER2. Dichos reactivos se utilizaron bajo las siguientes condiciones: 0.4 M de EDC·HCl y 0.1 M NHS se disolvieron en agua, se separaron en alícuotas y se congelaron a -20 °C [27]. Previo a su utilización, se descongelaron a temperatura ambiente y se mezclaron inmediatamente en una relación 1:1 (v/v). Dicha solución se depositó durante 10 minutos para la activación de las 4-MBA-SAMs. Una vez formado el intermediario semiestable se procedió a variar el tiempo de adsorción del trastuzumab (10, 20 y 30 minutos) manteniéndose su concentración constante (0.1 mg mL⁻¹) en todos los casos.

Finalmente, una solución de 1.0 M de cloruro de etanolamina a pH 8.5 se depositó durante 7 minutos para desactivar los ésteres reactivos sobrantes y posteriormente se enjuagó con PBS pH 7.4 con antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomina) al 1%. Se encontró que la condición de adsorción del trastuzumab (20 minutos) era la única que mantenía una conformación similar a la de la solución.

La Fig. 1 engloba todo el proceso de funcionalización de sustratos nanoestructurados. Dicho proceso de funcionalización se usó en el presente trabajo de investigación para la detección de receptores de membrana HER2 en diferentes líneas celulares de carcinoma mamario humano. Asimismo, en la Fig. 2 se muestra la representación esquemática para ilustrar como sería la adhesión celular sobre un sustrato plano de Au(111) y un sustrato nanoestructurado de plata funcionalizada (FSNP).

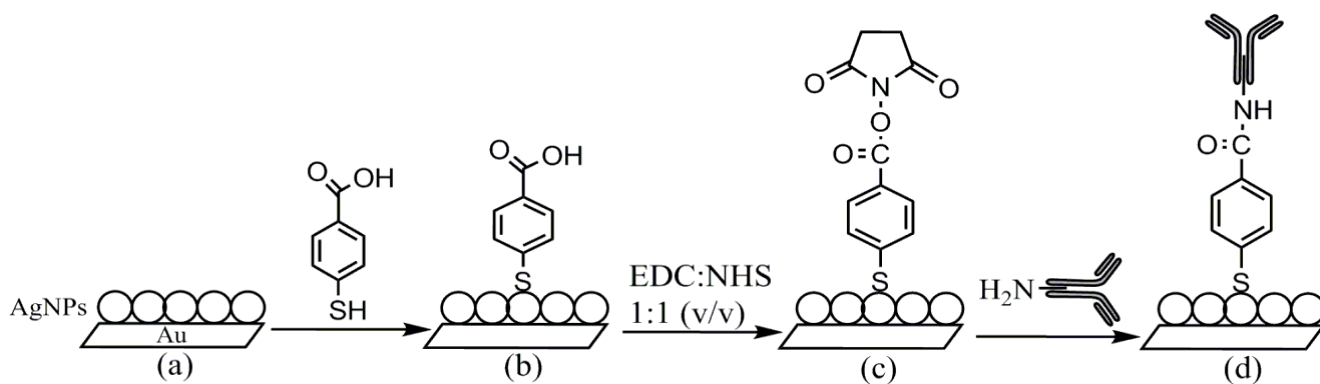


Fig. 1 a) sustrato nanoestructurado, b) formación de las monocapas autoensambladas de ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA-SAMs), c) formación de un éster intermediario semiestable y d) inmovilización orientada del anti-HER2 (trastuzumab). Au=Sustrato de oro, Au(111); AgNPs=nanopartículas de plata.

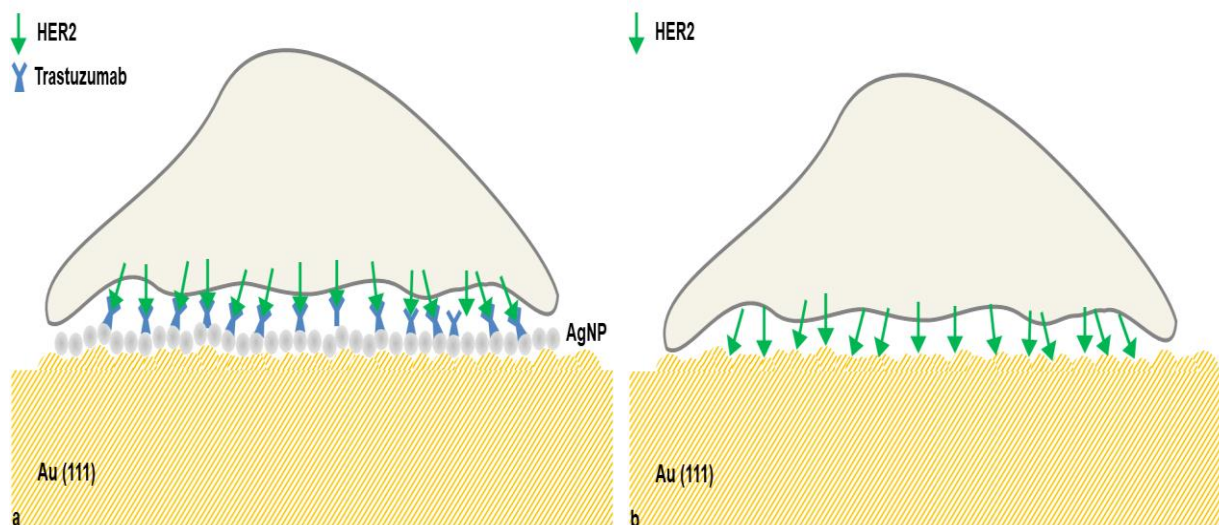


Fig. 2 Esquema de la adhesión de una célula de carcinoma de mama sobre un a) sustrato nanoestructurado de plata funcionalizada (FSNP) y b) sustrato plano Au(111) que llamamos "control".

2.2.2.2 Deposición por Láser Pulsado (PLD)

Se prepararon nanoestructuras de plata sobre sustratos de Au(111) a temperatura ambiente al ablacionar un blanco de plata de alta pureza. La deposición de nanopartículas se llevó a cabo en una cámara de vacío a una presión de fondo cercana a 2.7×10^{-5} torr, obtenida con una bomba turbomolecular.

El tercer armónico ($\lambda = 355$ nm) de un láser Q-switched Nd:YAG, que entregaba 10 mJ en pulsos de 10 nanosegundos de duración, trabajando a una tasa de repetición de 10 Hz, se utilizó como energía fuente. El haz láser se enfocó sobre la superficie de un blanco de plata usando una lente de cuarzo de 50 cm de distancia focal, que produjo un *spot* de 0.80 mm de diámetro medio y una fluencia láser promedio cercana a 2.0 J/cm².

Las placas de Au(111) descritas anteriormente se usaron como sustratos para PLD, colocadas a una distancia de 6.0 cm directamente en frente del blanco de plata y, posteriormente, 3000 pulsos de láser se utilizaron para producir nanoestructuras de plata (45.0 ± 16.7 nm) sobre una superficie de aproximadamente 0.5 cm².

2.2.3 Resultados y Discusión

2.2.3.1 Análisis de PLD y FSNP

Por otro lado, los sustratos nanoestructurados de plata preparados por PLD tienen un diámetro de (45.0 ± 16.7) nm que está de acuerdo con lo reportado por Stampleskoskie *et al.* acerca de que un diámetro de 50 nm es adecuado para favorecer el fenómeno SERS en nanopartículas en solución [28].

Es importante señalar que para obtener un diámetro semejante al ya reportado en la literatura científica se requirió variar las condiciones experimentales (e.g. sustrato, número de pulsos láser, blanco irradiado) para la formación de películas nanoestructuradas en soporte sólido. Por ejemplo, sobre diferentes sustratos se irradiaron de 500-3,000 pulsos de energía láser, encontrándose que el diámetro de las nanoestructuras es dependiente del número de pulsos de energía láser, así como del sustrato irradiado. Se encontró que la mejor adhesión ocurrió entre el sustrato Au(111) y las nanoestructuras de plata porque no requirió de una enorme cantidad de pulsos de energía láser para obtener nanoestructuras de diámetro adecuado. Es menester destacar que se usa una superficie nanoestructurada de plata para incrementar la sensibilidad de detección del analito-muestra.

A fin de controlar al máximo la variabilidad que pudiera existir en el anticuerpo inmobilizado (del cual se desconocía la estabilidad) y que posiblemente afectaría el diseño experimental, el procedimiento para el diseño de un FSNP se realizó lo más rápido posible. Se decidió que las diferentes líneas celulares se incubarán durante 24 h sobre los FSNP y los sustratos planos de Au(111), porque a este tiempo se lograba una mejor adhesión en todas las líneas celulares usadas.

2.3 Análisis de la presencia de HER2 en células de cáncer de mama

2.3.1. Objetivo particular 2 y 3

Analizar la presencia y distribución del receptor HER2 en diferentes líneas celulares de carcinoma de mama por *CLSM* y *Z-stack*.

Caracterizar a nivel nanométrico por AFM las rugosidades superficiales de las diferentes membranas plasmáticas adheridas a las superficies (funcionalizadas y no funcionalizadas).

2.3.2 Materiales y Métodos

2.3.2.1 Cultivos de líneas celulares de carcinoma de mama

Los diferentes medios de cultivo se suplementaron con aminoácidos no esenciales, antibiótico/antimicótico (Penicilina/Estreptomina), L-glutamina y piruvato de sodio al 1%. Los medios de cultivo y sus suplementos son de grado analítico y fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific, Ciudad de México, México. La línea celular MCF-7 se cultivó en medio de cultivo DMEM, libre de rojo de fenol, y se le agregó suero fetal bovino (SFB) al 2.5% (v/v).

Las líneas celulares T47D y MDA-MB-231 se cultivaron en medio de cultivo RPMI y se les agregó SFB al 2.5% (v/v). La línea celular SKBR3 fue donada por la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de México; se utilizó el medio de cultivo DMEM-F12 en una relación 3:1 (v/v) y se le agregó SFB al 10% (v/v).

Las cuatro líneas celulares se incubaron a condiciones pseudofisiológicas (37°C en una atmosfera húmeda con CO₂ al 5%). Cuando las células alcanzaban más del 90% de confluencia se tripsinizaban, y posteriormente se centrifugaban a 1,500 rpm durante 5 minutos y se resuspendían con el mismo medio de cultivo. El protocolo estandarizado antes señalado es el que comúnmente se usa en el laboratorio en que se desarrolló el proyecto.

2.3.2.2 Análisis de expresión de HER2 por Inmunocitoquímica

Los cubreobjetos para la inmunocitoquímica se lavaron previamente con SDS al 10%, alcohol etílico al 70% y agua destilada. Posteriormente, se secaron con una gasa, se envolvieron en papel, se metieron en una bolsa de plástico y se esterilizaron mediante autoclave. En una caja Nunclon de 6 pozos se colocaron 4 cubreobjetos por línea celular y se depositaron de 150,000-200,000 células sobre cada uno, se incubaron durante 2 horas, se retiró el medio de cultivo y se agregó nuevo medio de cultivo atemperado y se dejó incubar durante 24 horas.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo, se enjuagó con PBS pH 7.4 atemperado y se agregó 1 ml de formalina neutra al 4% y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada pozo que contenía a los cubreobjetos se enjuagó dos veces con PBS Tween 20 al 1%, se colocó 35 µl del anticuerpo monoclonal primario previamente disuelto en PBS Tween 20 al 1% en una relación volumétrica 1:100 sobre cada cubreobjetos. Se dejó reposar durante 1.5 horas.

Después cada pozo se enjuagó dos veces con PBS Tween 20 al 1%, se colocó 35 µl del anticuerpo monoclonal secundario conjugado a Alexa Fluor 594 sobre cada cubreobjetos. Se dejó reposar durante 1.5 horas en oscuridad, ya que el fluorocromo es fotodegradable.

Sobre un portaobjetos limpio se colocaron dos gotas de 25 µl de DAKO DAPI (2 ng/ml), posteriormente se puso un cubreobjeto sobre cada gota, se removieron todas las posibles burbujas entre los espacios y se dejó reposar durante 10 minutos. Finalmente se sellaron las orillas con barniz transparente, se dejó secar y se refrigeró a 4 °C hasta usarlo para CLSM. El protocolo estandarizado antes señalado es el que comúnmente se usa en el laboratorio en el que se desarrolló el proyecto.

2.3.2.3 Análisis por Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) y Z-stack

El Microscopio Confocal de Barrido Láser fue conceptualizado y patentado en 1957 por Marvin Minsky, aunque su implementación y comercialización fue hasta finales de 1980 cuando se convirtió en algo ordinario en la investigación biológica [29,30]. El desarrollo de instrumentos robustos y confiables, el uso de espejos de escaneo rápido y la habilidad para remover objetos borrosos fuera de enfoque de cada sección de imagen, lo cual es crucial para visualizar una serie de cortes ópticos delgados de un espécimen en 3D, ha revolucionado la técnica de imágenes de fluorescencia. Imágenes de un solo plano de muestras muy delgadas ($< 5 \mu\text{m}$), de espesor intermedio ($\sim 20 \mu\text{m}$), y de gran espesor ($\sim 50 \mu\text{m}$) requieren de la técnica de Microscopía Confocal [31]. La CLSM ha evolucionado durante las últimas décadas hasta el punto de ser esencial en todas las instituciones de investigación biomédica. Además de ser el fundamento de tecnologías más nuevas tales como la Microscopía Multifotónica y muchas técnicas de súper resolución [32,33].

La CLSM es una herramienta invaluable para una gran cantidad de investigaciones médico-biológicas que requieren obtener imágenes de secciones ópticas de especímenes vivos o fijados que presentan un espesor de hasta $100 \mu\text{m}$. Esta técnica es capaz de examinar la emisión de fluorescencia de sondas moleculares fluorescentes desde $400\text{-}750 \text{ nm}$ [34].

Esta herramienta provee imágenes nítidas muy detalladas en 2D o reconstrucciones en 3D al ensamblar una serie de cortes delgados tomados a lo largo del eje vertical del espécimen, que, a través de métodos convencionales como la Microscopía Óptica, podrían ser borrosas. Ambas técnicas no pueden proveer resolución espacial debajo del límite de difracción de la luz ($0.2 \mu\text{m}$), aunque la detección de moléculas fluorescentes debajo de tal límite se logra fácilmente con un microscopio confocal equipado con sistemas de 3-5 láseres controlados con filtros sintonizables acusto-ópticos de alta velocidad (AOTFs) acoplados con fotomultiplicadores (detectores electrónicos) de alta eficiencia cuántica, ya que los AOTFs permiten una regulación muy precisa de la longitud de onda e intensidad de excitación [34].

A temperaturas ordinarias, la mayoría de las moléculas están en su más bajo estado de energía (estado basal). Las moléculas, al absorber un fotón de luz (*i.e.* luz azul) incrementan

su energía, lo que causa que un electrón salte a un estado discreto de singulete excitado [35]. Típicamente, estas moléculas disipan algo de la energía absorbida a través de colisiones con moléculas circundantes que causan que el electrón caiga a un nivel energético más bajo. Si las moléculas circundantes no son capaces de aceptar la gran diferencia de energía necesaria para adicionalmente bajar las moléculas a su estado basal, éstas pueden llevar a cabo emisión espontánea, de este modo pierden la energía faltante al emitir luz de una longitud de onda mayor (*i.e.* luz verde) [36]. La luz, al incidir sobre una molécula, puede ser absorbida y posteriormente emitida en el orden de 10^{-9} - 10^{-8} segundos a una longitud de onda diferente a la incidente, dicho proceso es conocido como fluorescencia y su representación esquemática se muestra en la Fig. 3 para su mejor comprensión.

La obtención de imágenes nítidas con alto contraste y alta resolución de la sección transversal delgada de un espécimen se logra al rechazar la luz no incidente desde el plano focal, por lo que solamente a la luz del punto focal que alcance la apertura del láser se le permite pasar y la que se aleja de este se rechaza.

La mayoría de las imágenes de los microscopios confocales se obtiene al reflejar la luz del espécimen o estimular la fluorescencia de los colorantes (fluoróforos) aplicados al espécimen, siendo este último el más común usado en aplicaciones biológicas [37].

Adicionalmente, con la Microscopía Confocal se pueden tomar secciones ópticas y crear representaciones o reconstrucciones de un espécimen sin necesidad de cortarlo o seccionarlo. Las muestras con un espesor de 5 μm producirán imágenes mejoradas con otras técnicas (*e.g.* microscopía confocal, microscopía multifotónica, deconvolución, iluminación estructurada, etc.). Aun cuando los especímenes de 5 μm de espesor son considerados delgados, el 80% de la luz puede venir de regiones fuera del foco, lo cual resultará en una imagen de bajo contraste, ya que está compuesta de luz muy intensa, pero con fondo borroso [38].

En cambio, los especímenes que presentan un espesor de 5-30 μm reciben una enorme cantidad de luz que se origina en regiones fuera del foco, por lo que para ser mejor visualizados se requieren técnicas tales como Confocal o Multifotónica [38]. La

representación esquemática del funcionamiento de un microscopio confocal se muestra en la Fig. 4 para su mejor comprensión.

La técnica *Z-stack* es un método de procesamiento de imagen digital que combina las imágenes tomadas desde múltiple distancias o planos focales ópticos para proveer una imagen reconstruida con una mayor profundidad que cualquiera de las imágenes individuales *per se*, permitiendo visualizar el volumen de un espécimen completo [39,40].

Las áreas a lo largo de los ejes (x,y) se mantienen intactas, pero la distancia a lo largo del eje z es diferente para cada imagen individual, por lo tanto, puede ser usada para crear una imagen 3D detallada de un espécimen completo. El espesor de la rebanada óptica es controlado por la apertura numérica del objetivo y el diámetro del colimador.

Estado de singlete excitado

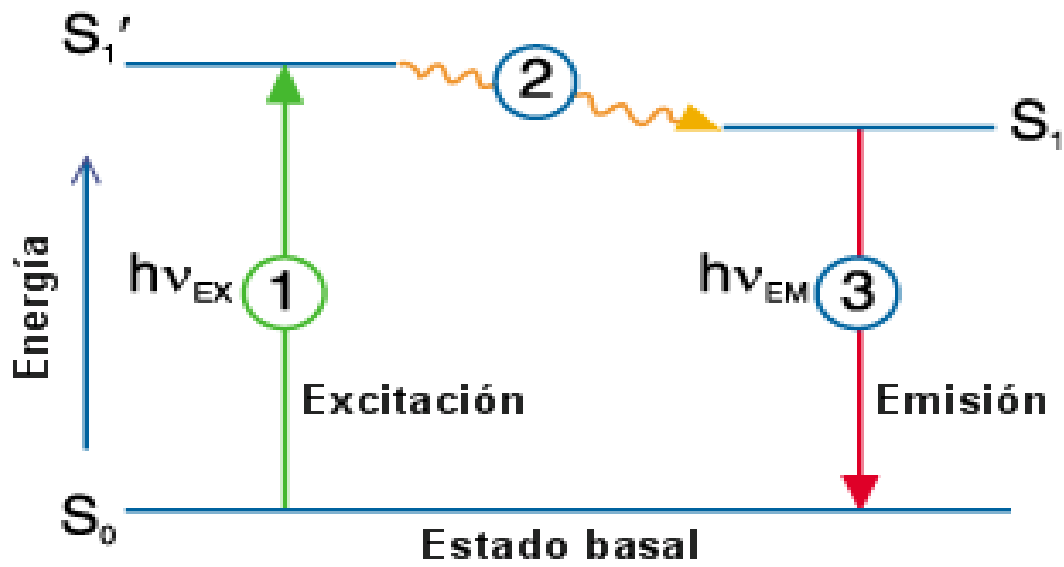


Fig. 3 Representación esquemática del diagrama de energía de Jablonski para el fenómeno de fluorescencia [41].

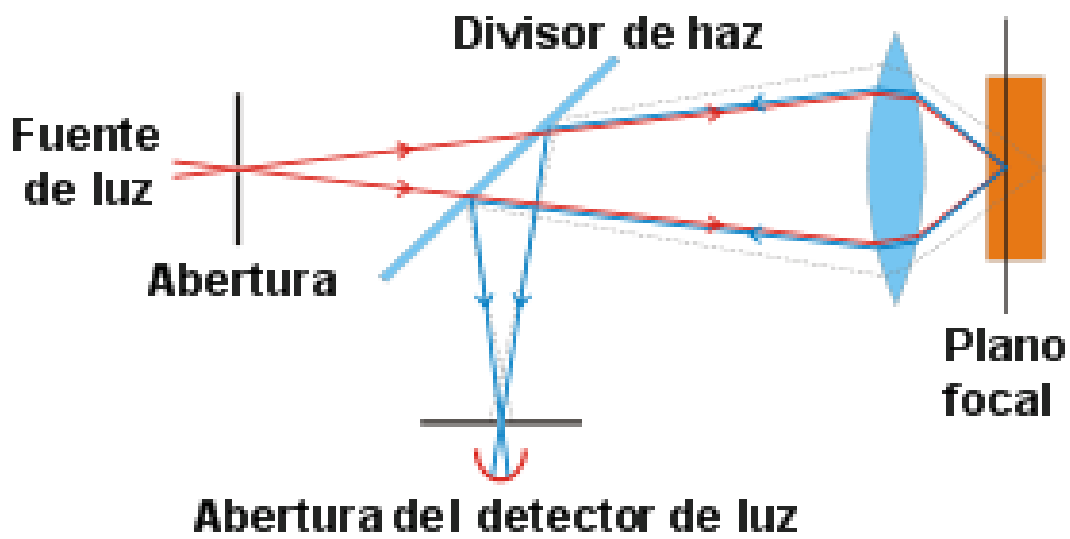


Fig. 4 Representación esquemática del principio de operación de un microscopio confocal [42].

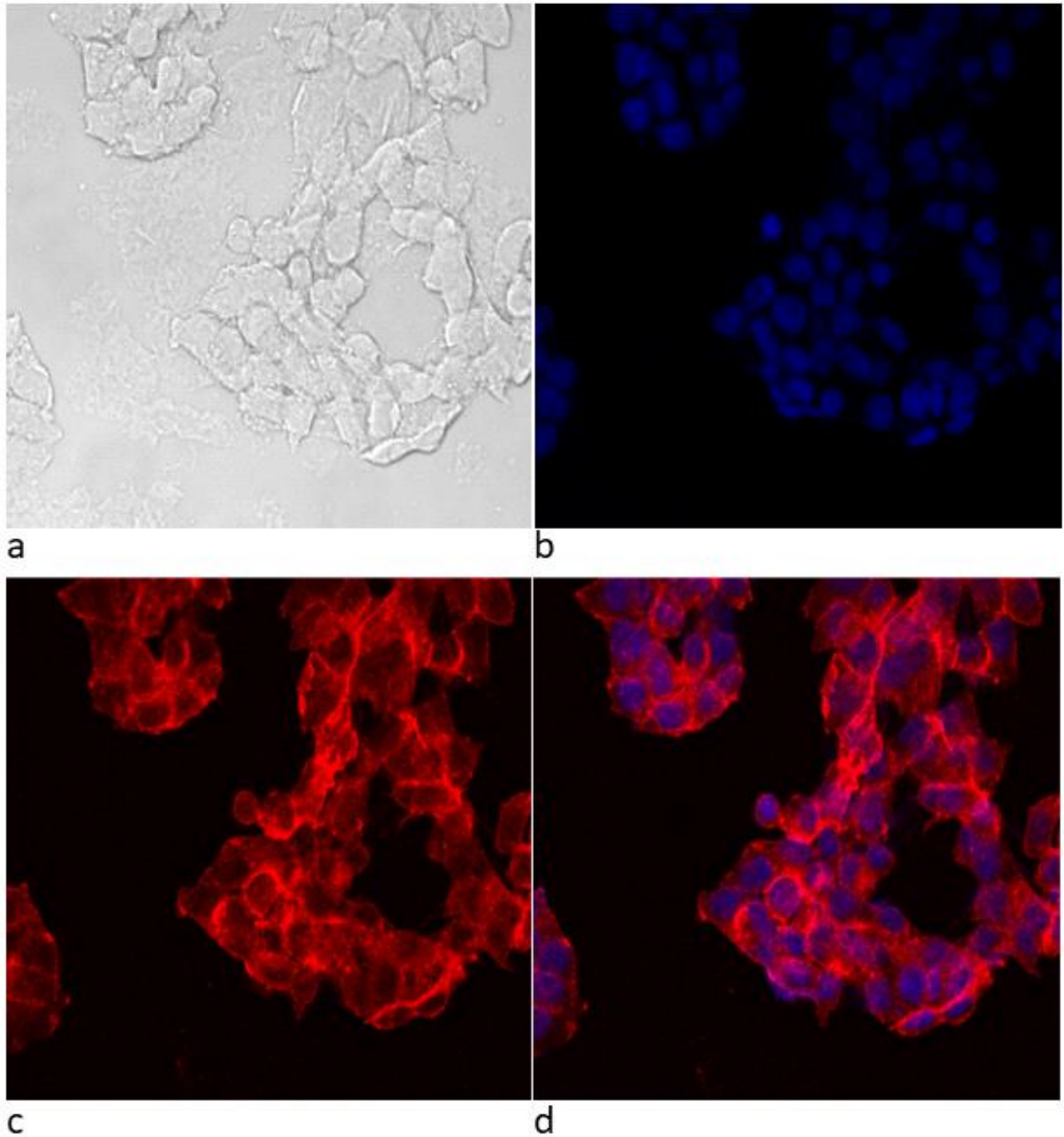


Fig. 5 Imágenes de Microscopía Confocal de Barrido Láser para detectar HER2, mediante inmunocitoquímica, en células SKBR3 a) campo claro, b) tinción del núcleo celular mediante el fluoróforo DAPI, c) detección indirecta de HER2 mediante un anticuerpo primario anti-HER2 y un anticuerpo secundario anti-anti-HER2 unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 y d) localización celular del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2). Aumento: 63x.

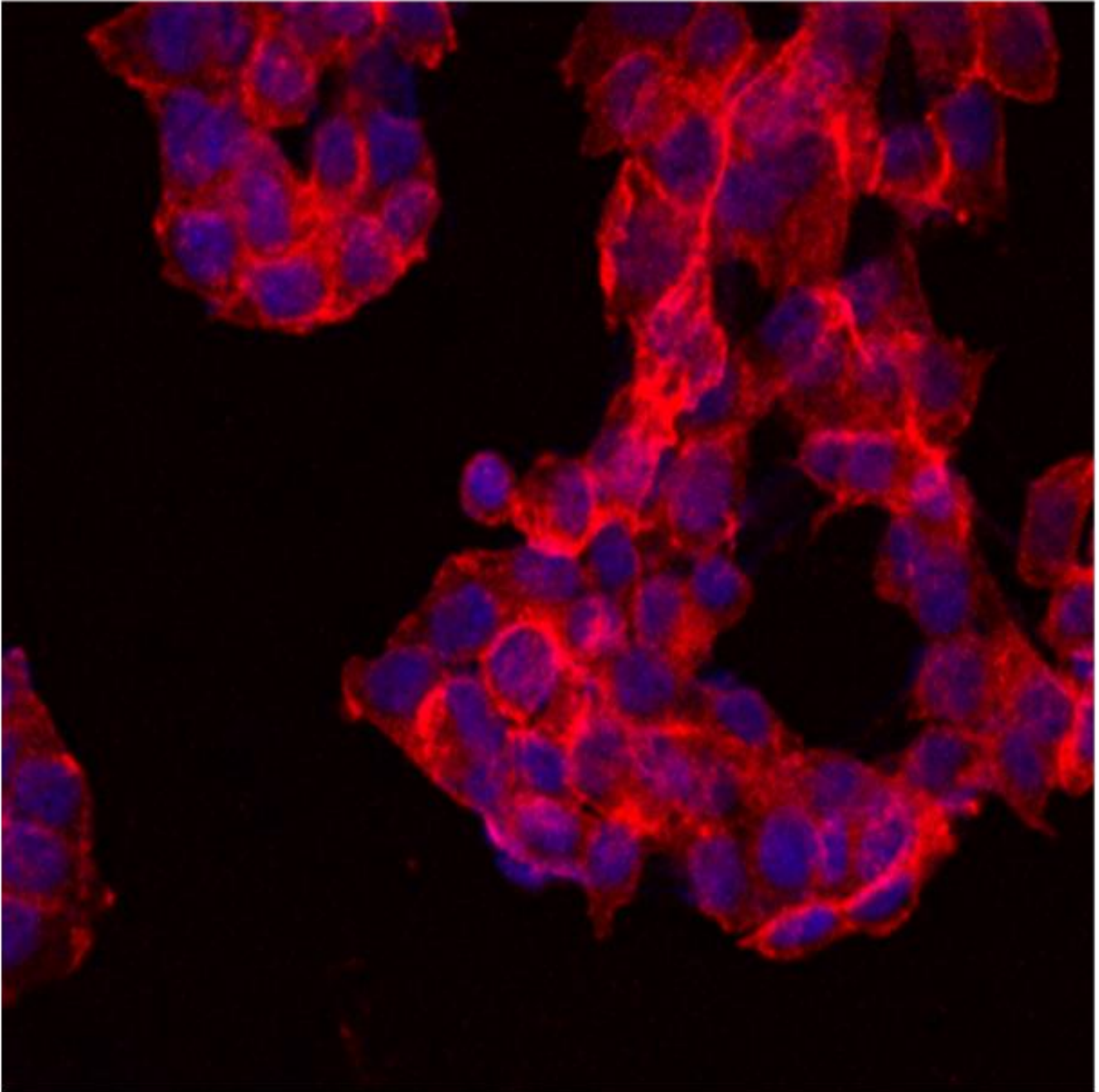


Fig. 6 Amplificación de la colocalización del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2) en células SKBR3.

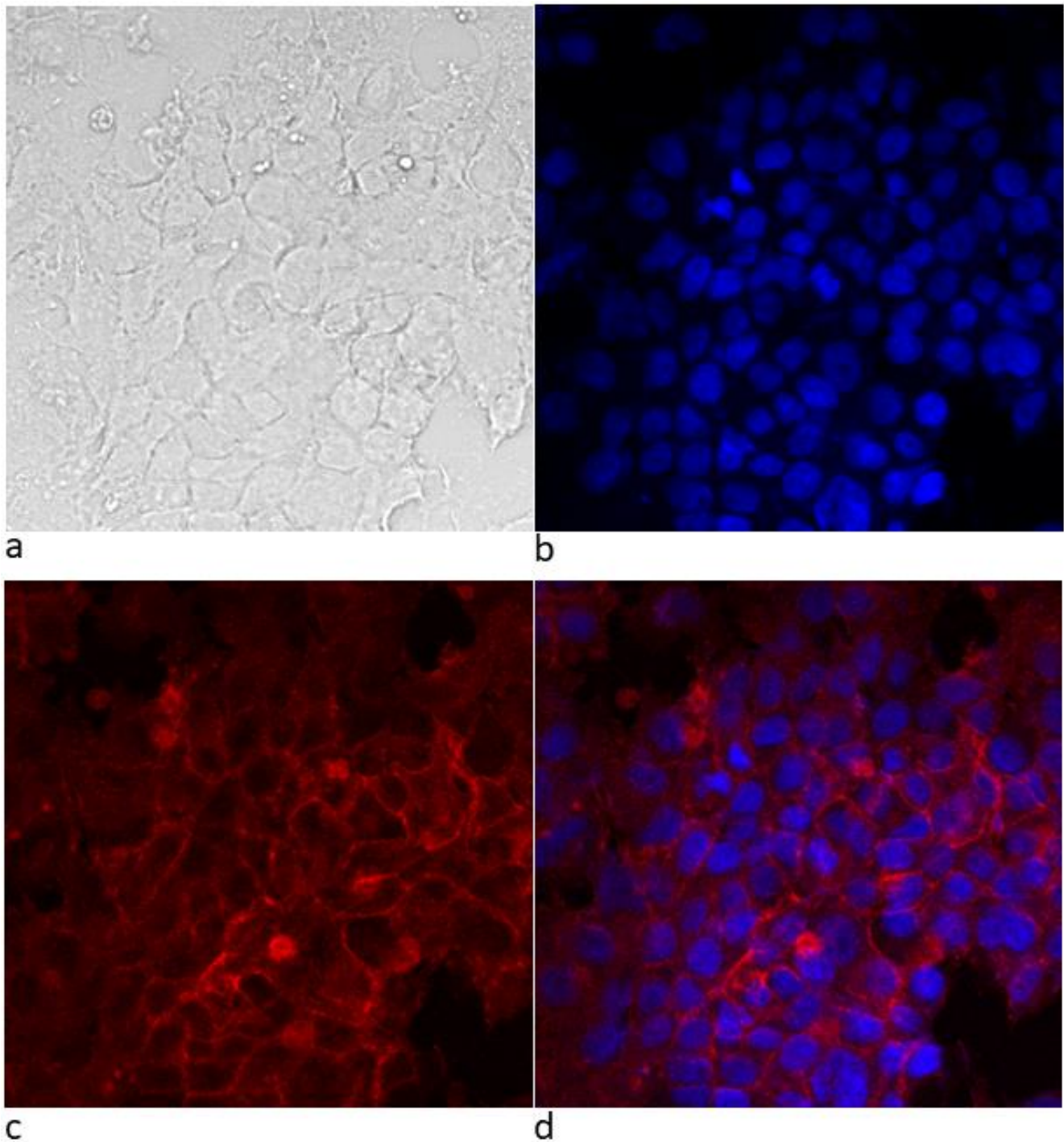


Fig. 7 Imágenes de Microscopía Confocal de Barrido Láser para detectar HER2 mediante inmunocitoquímica, en células MCF-7 a) campo claro, b) tinción del núcleo celular mediante el fluoróforo DAPI, c) detección indirecta de HER2 mediante un anticuerpo primario anti-HER2 y un anticuerpo secundario anti-anti-HER2 unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 y d) localización celular del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2). Aumento: 63x.

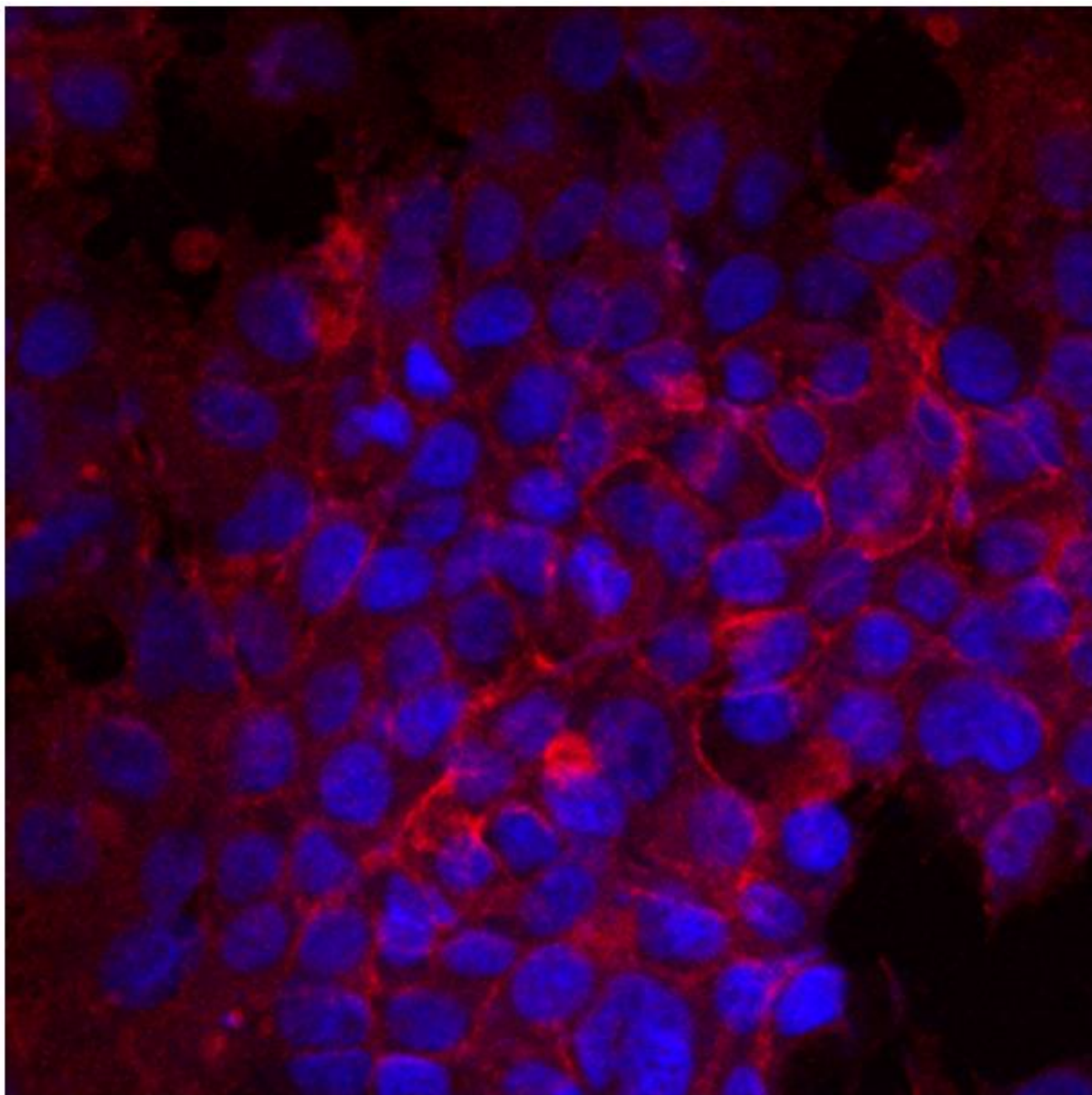


Fig. 8 Amplificación de la colocalización del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2) en células MCF-7.

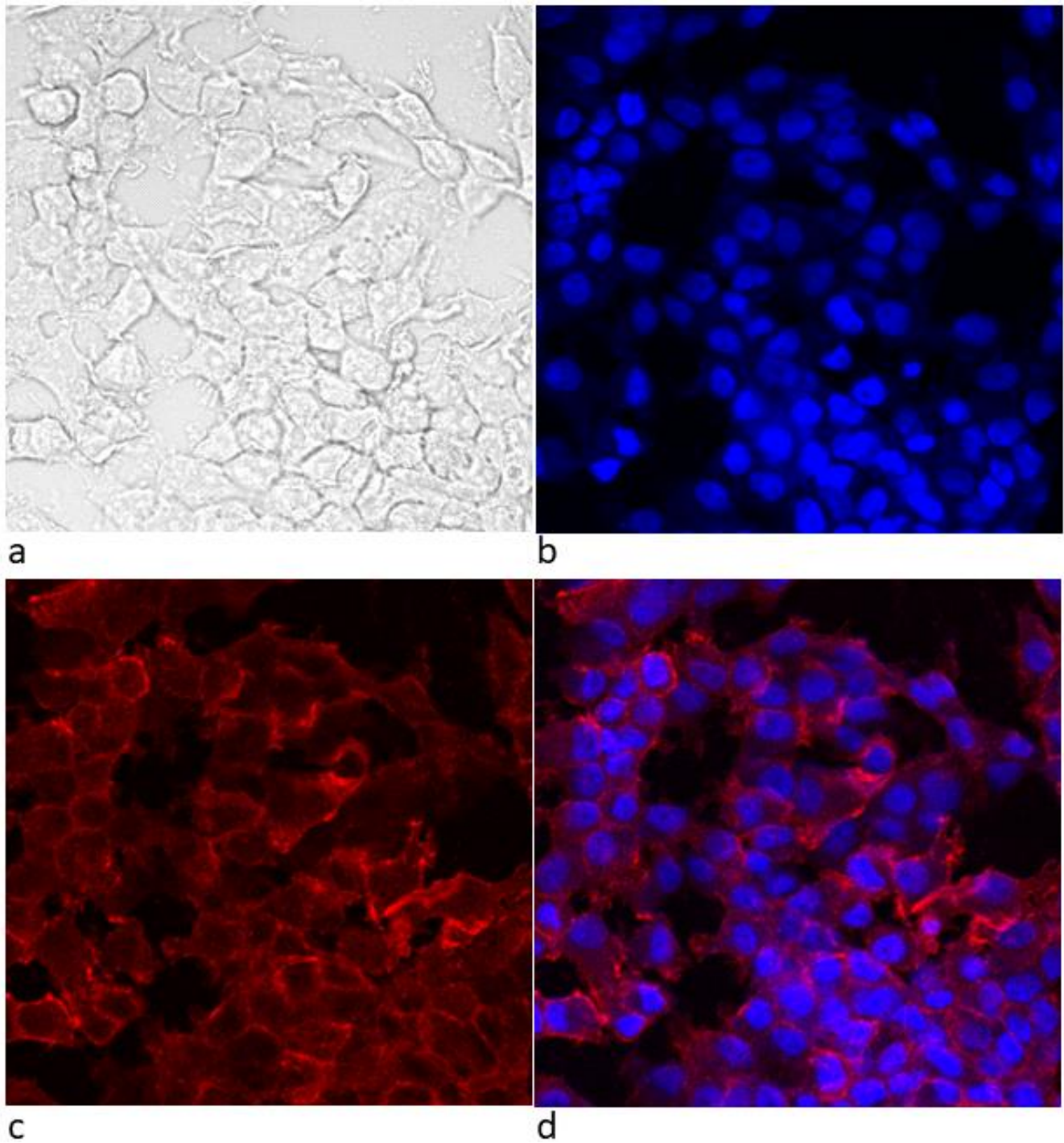


Fig. 9 Imágenes de Microscopía Confocal de Barrido Láser para detectar HER2, mediante inmunocitoquímica, en células T47D a) campo claro, b) tinción del núcleo celular mediante el fluoróforo DAPI, c) detección indirecta de HER2 mediante un anticuerpo primario anti-HER2 y un anticuerpo secundario anti-anti-HER2 unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 y d) localización celular del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2). Aumento: 63x.

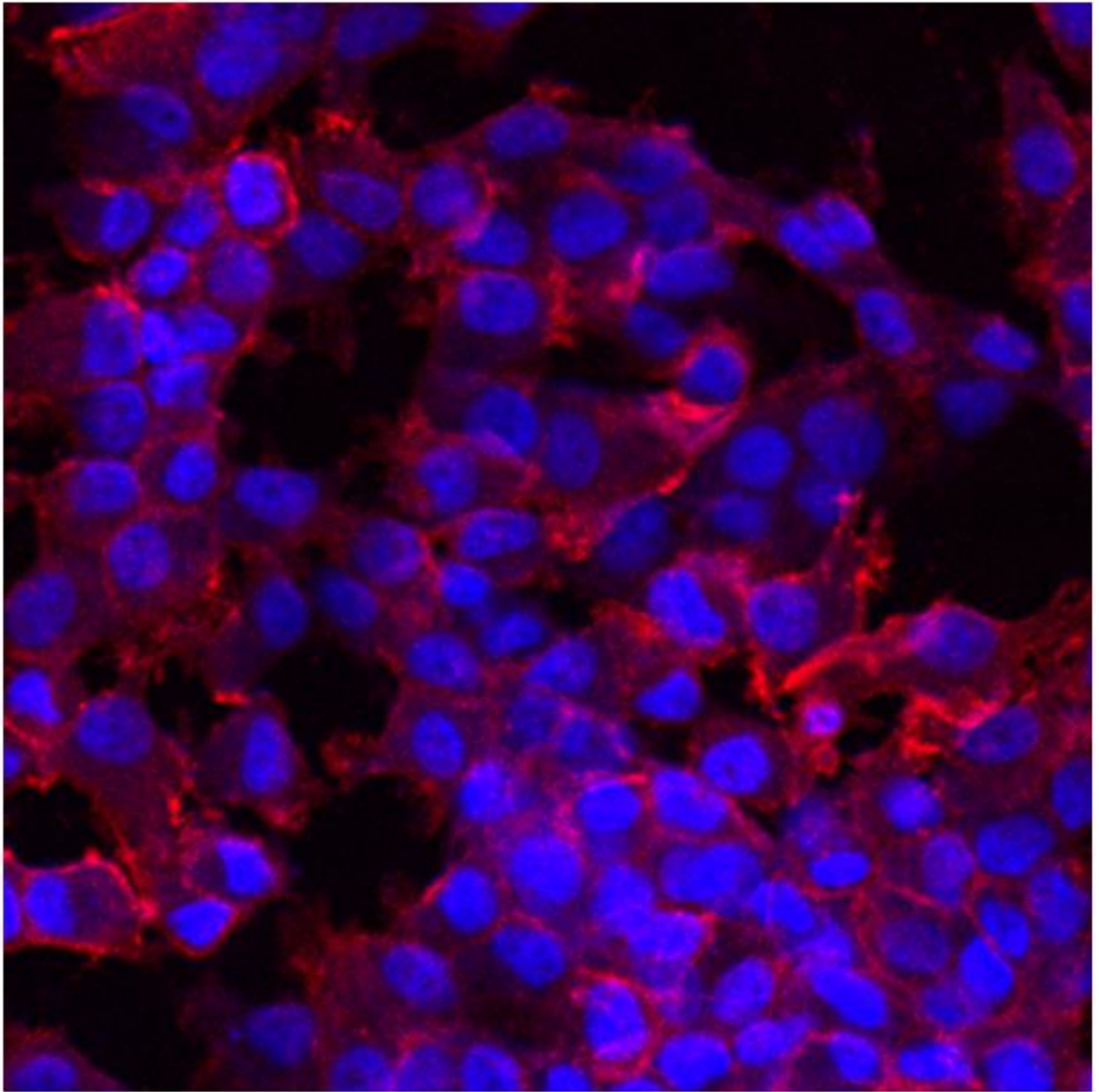


Fig. 10 Amplificación de la colocalización del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2) en células T47D.

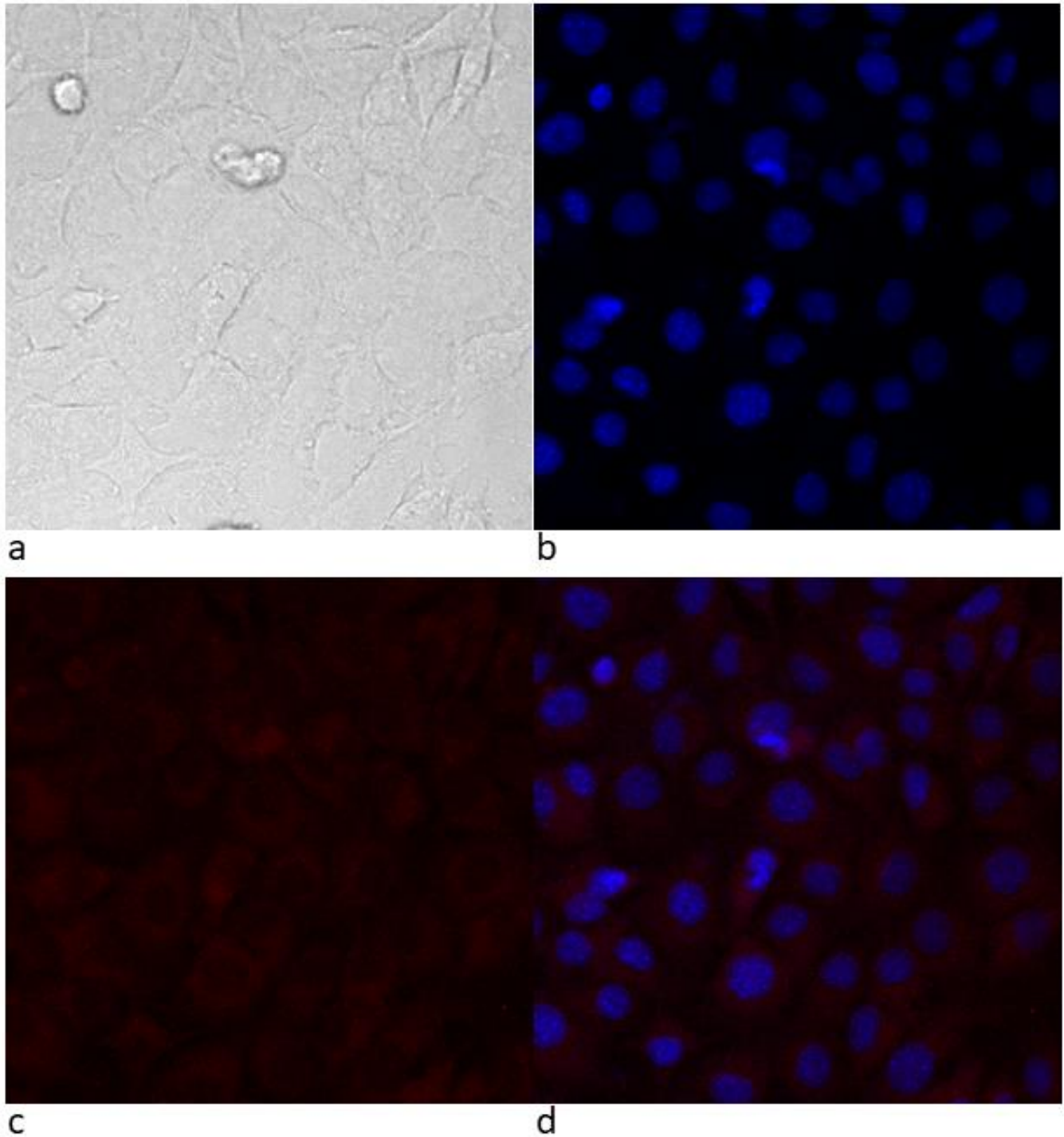


Fig. 11 Imágenes de Microscopía Confocal de Barrido Láser para detectar HER2, mediante inmunocitoquímica, en células MDA-MB-231 a) campo claro, b) tinción del núcleo celular mediante el fluoróforo DAPI, c) detección indirecta de HER2 mediante un anticuerpo primario anti-HER2 y un anticuerpo secundario anti-anti-HER2 unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 y d) localización celular del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2). Aumento: 63x.

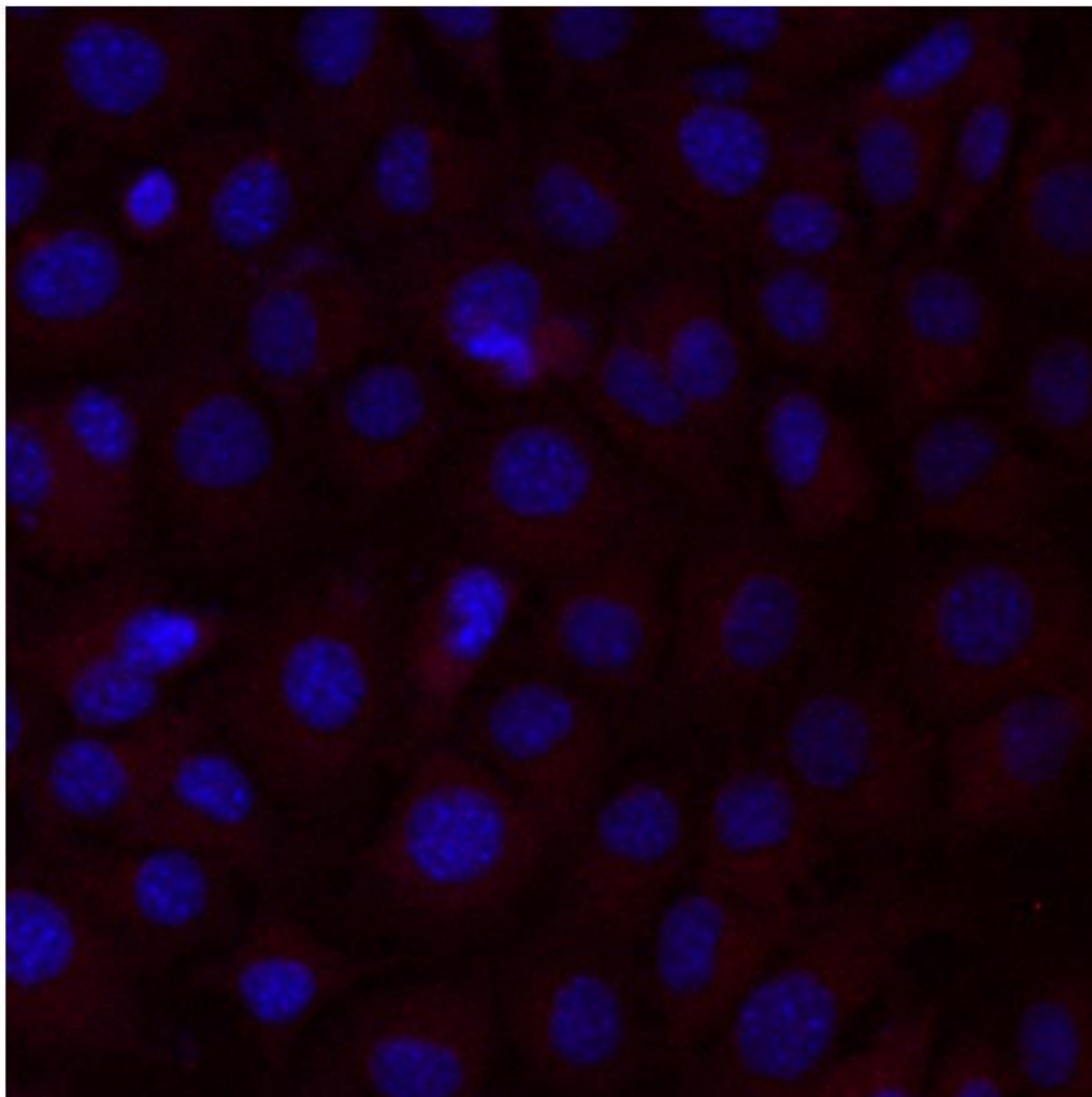


Fig. 12 Amplificación de la colocalización del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2) en células MDA-MB-231.

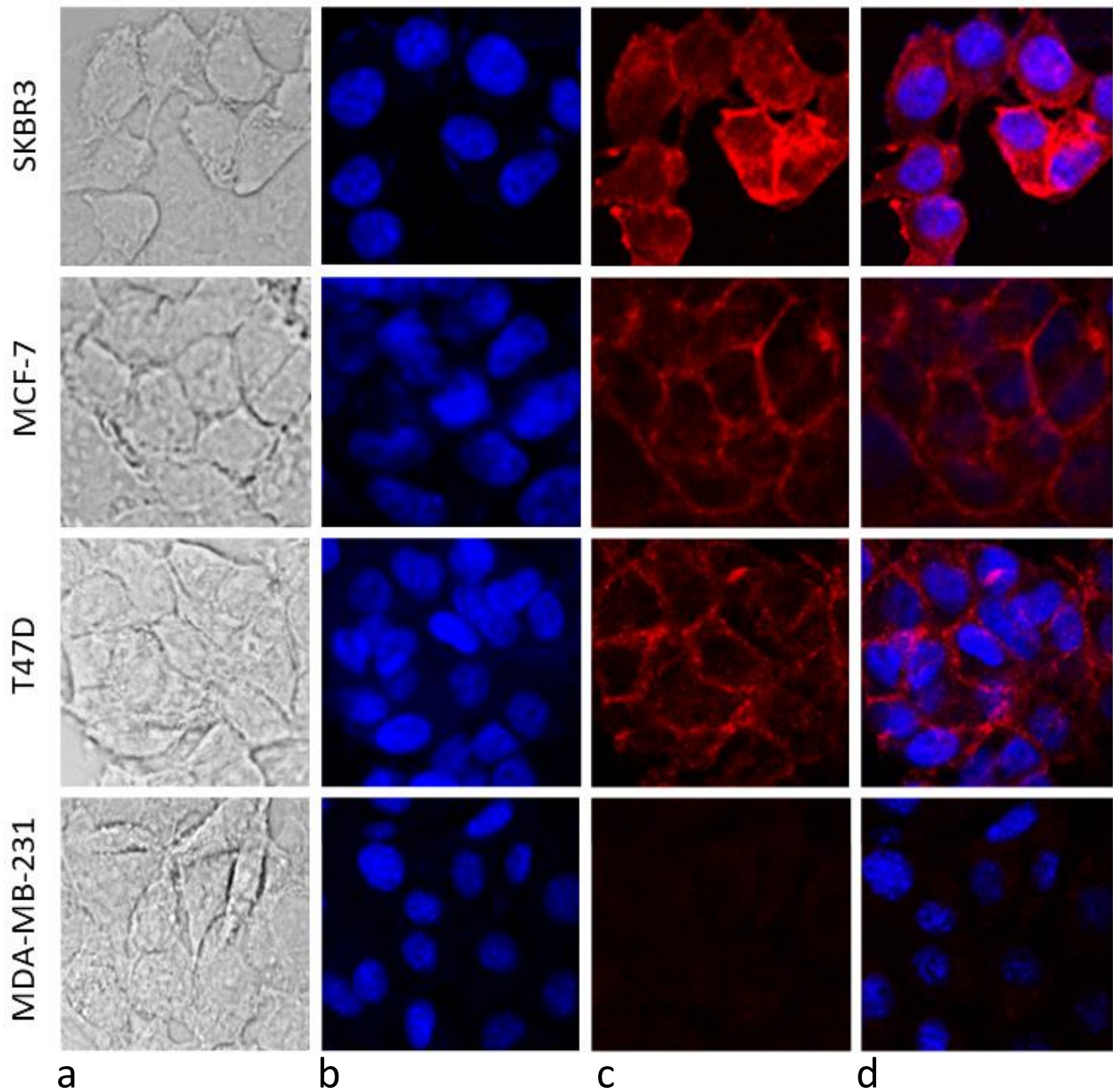


Fig. 13. Imágenes de inmunofluorescencia por Microscopía Confocal de Barrido Láser de cuatro líneas celulares: SKBR3, MCF-7, T47D y MDA-MB-231 a) campo claro, b) tinción del núcleo celular mediante el fluoróforo DAPI (color azul), c) detección indirecta de HER2 mediante un anticuerpo primario anti-HER2 y un anticuerpo secundario anti-anti-HER2 unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 (color rojo) y d) localización celular del receptor HER2 mediante la superposición de las imágenes (DAPI+HER2). Aumento: 63x.

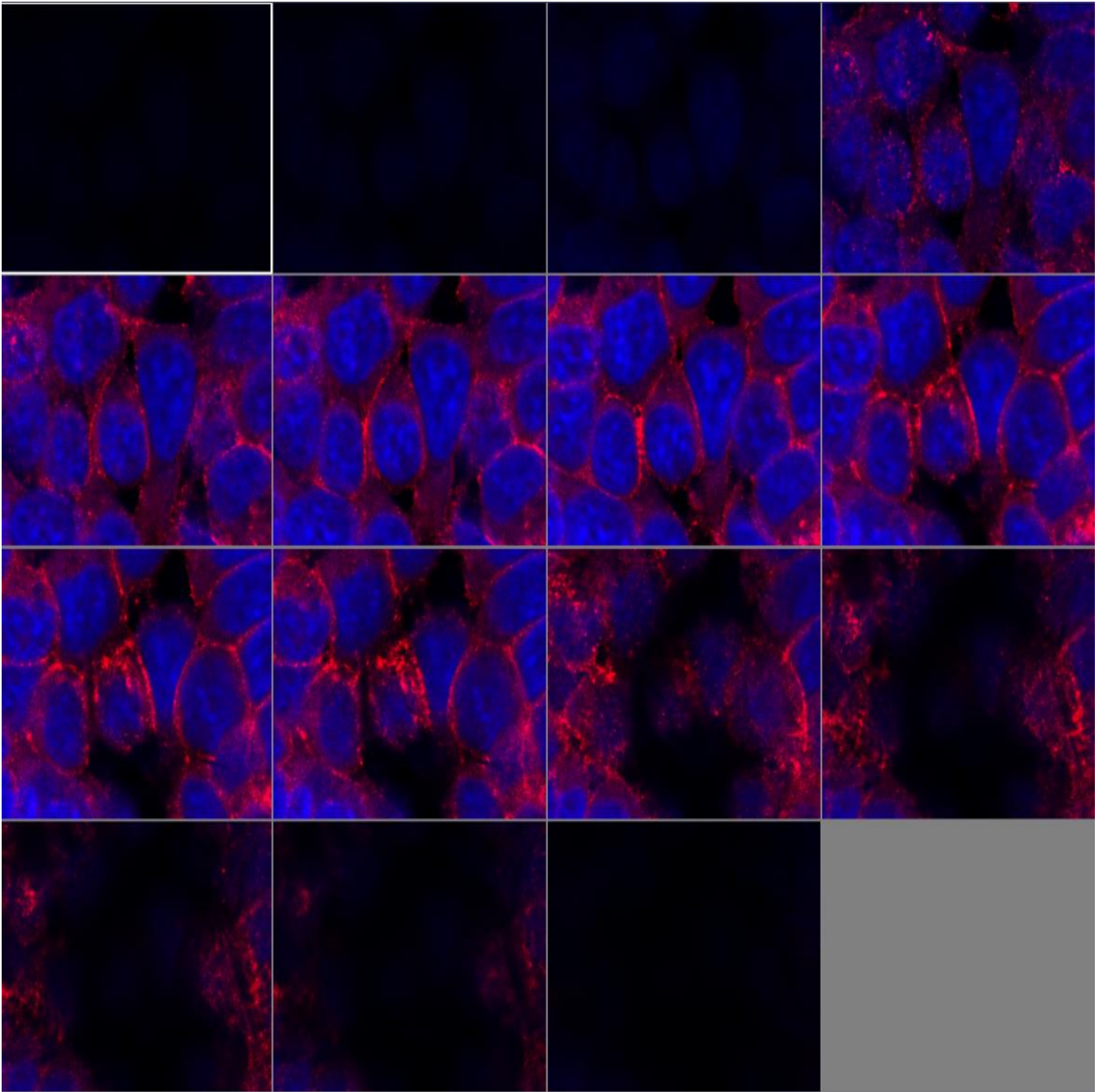


Fig. 14 Imágenes bidimensionales de 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células SKBR3 mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

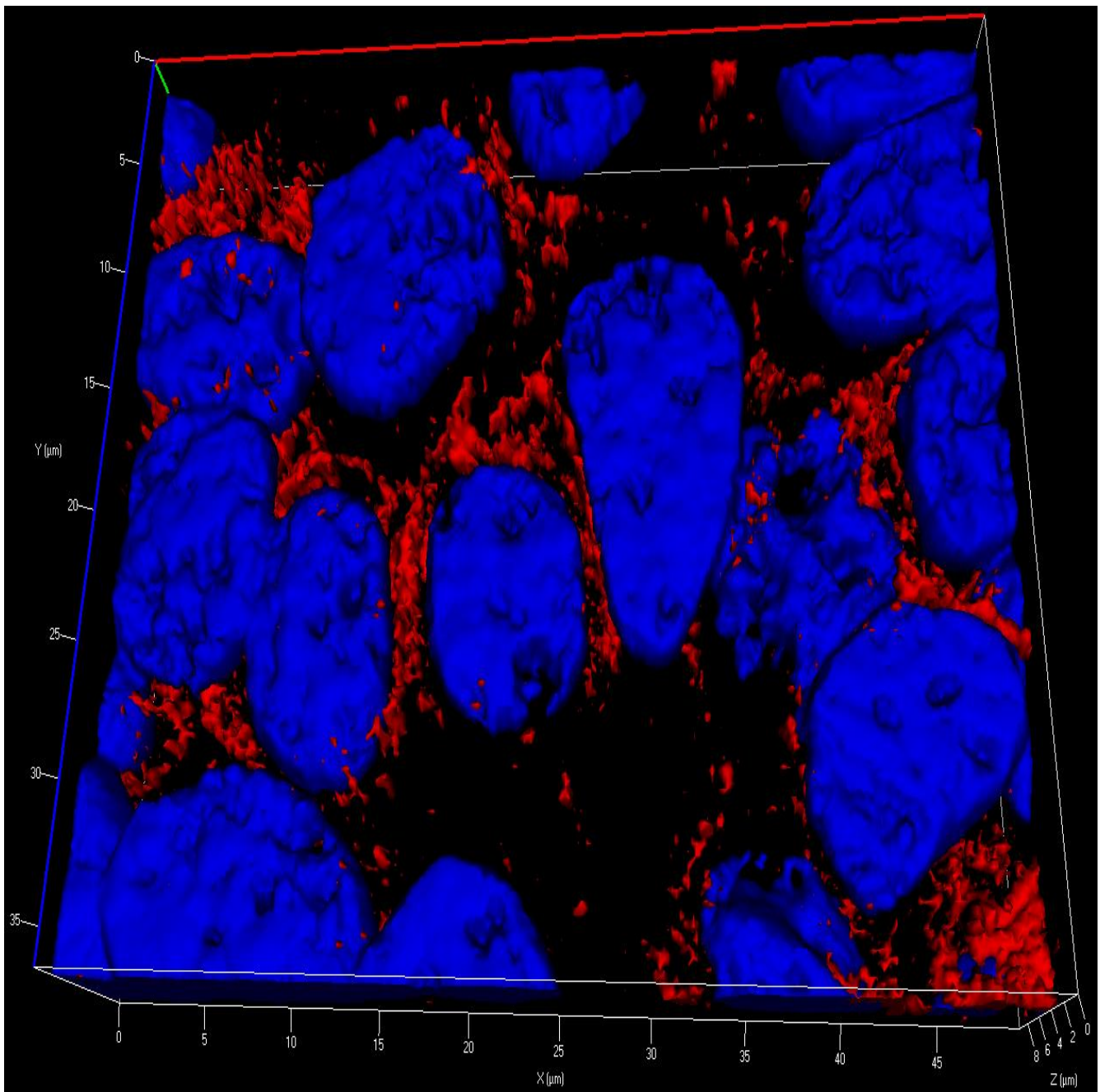


Fig. 15 Reconstrucción tridimensional de los 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células SKBR3 mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

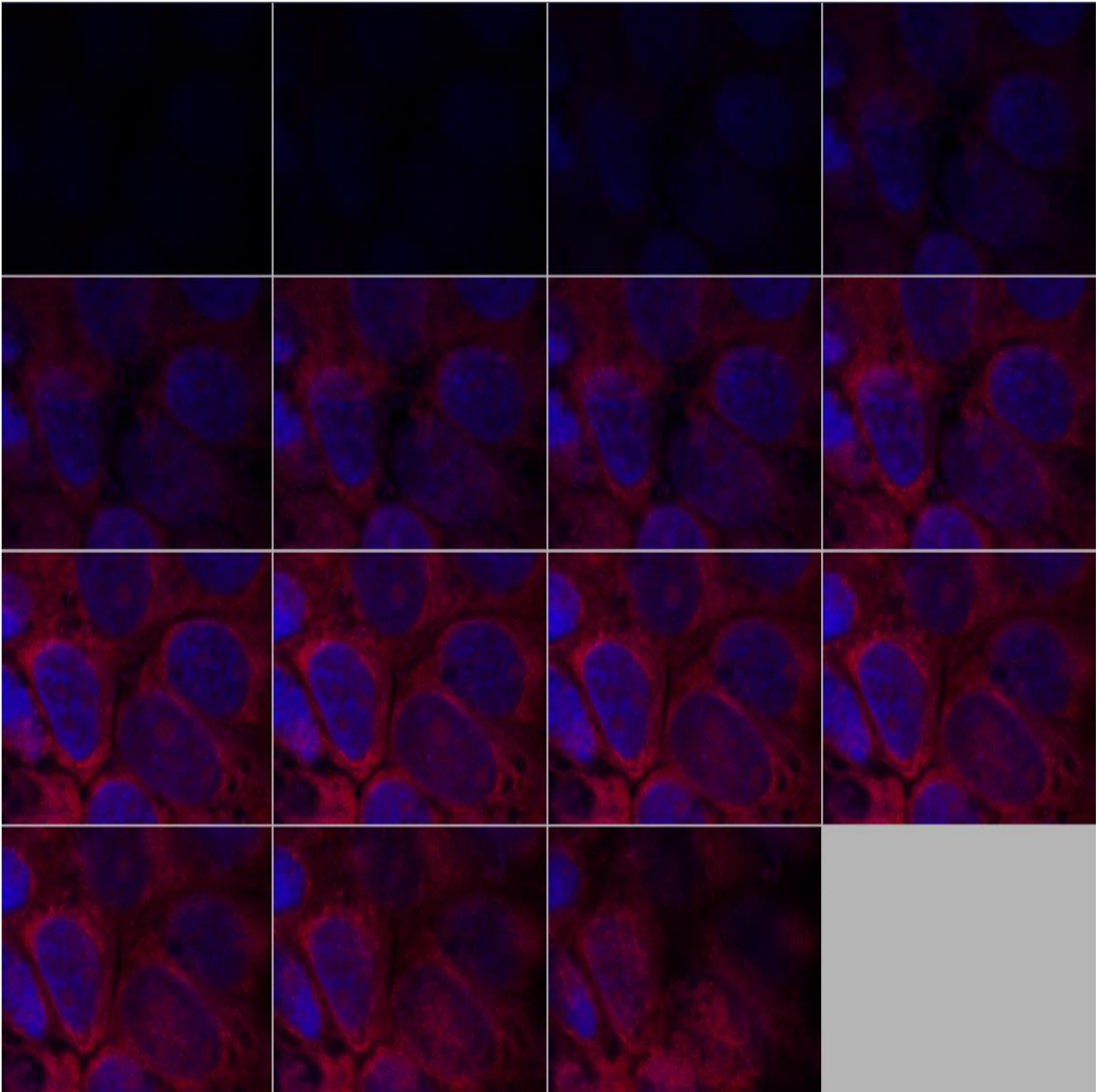


Fig. 16 Imágenes bidimensionales de 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células MCF-7 mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

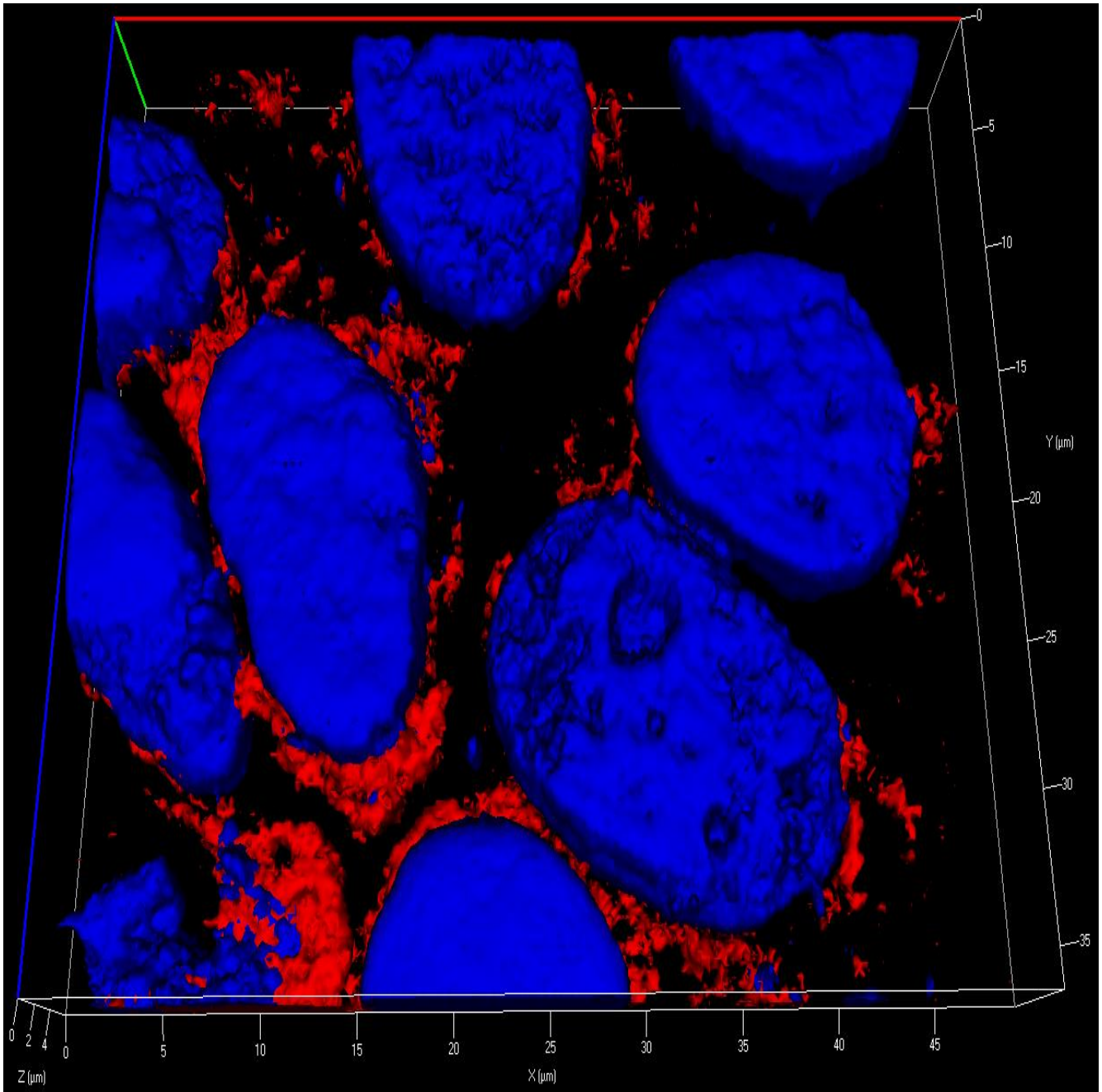


Fig. 17 Reconstrucción tridimensional de los 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células MCF-7 mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

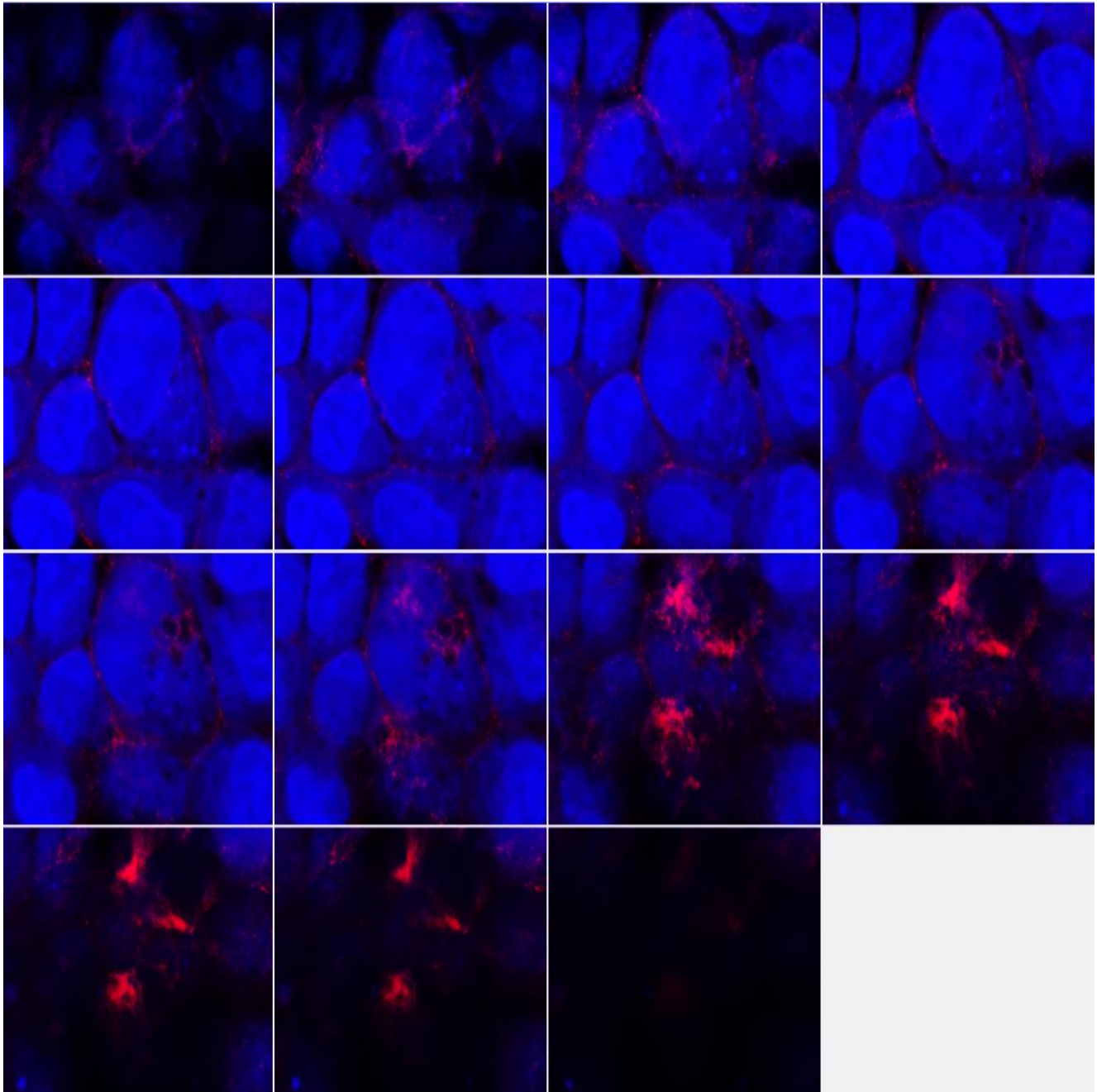


Fig. 18 Imágenes bidimensionales de 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células T47D mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

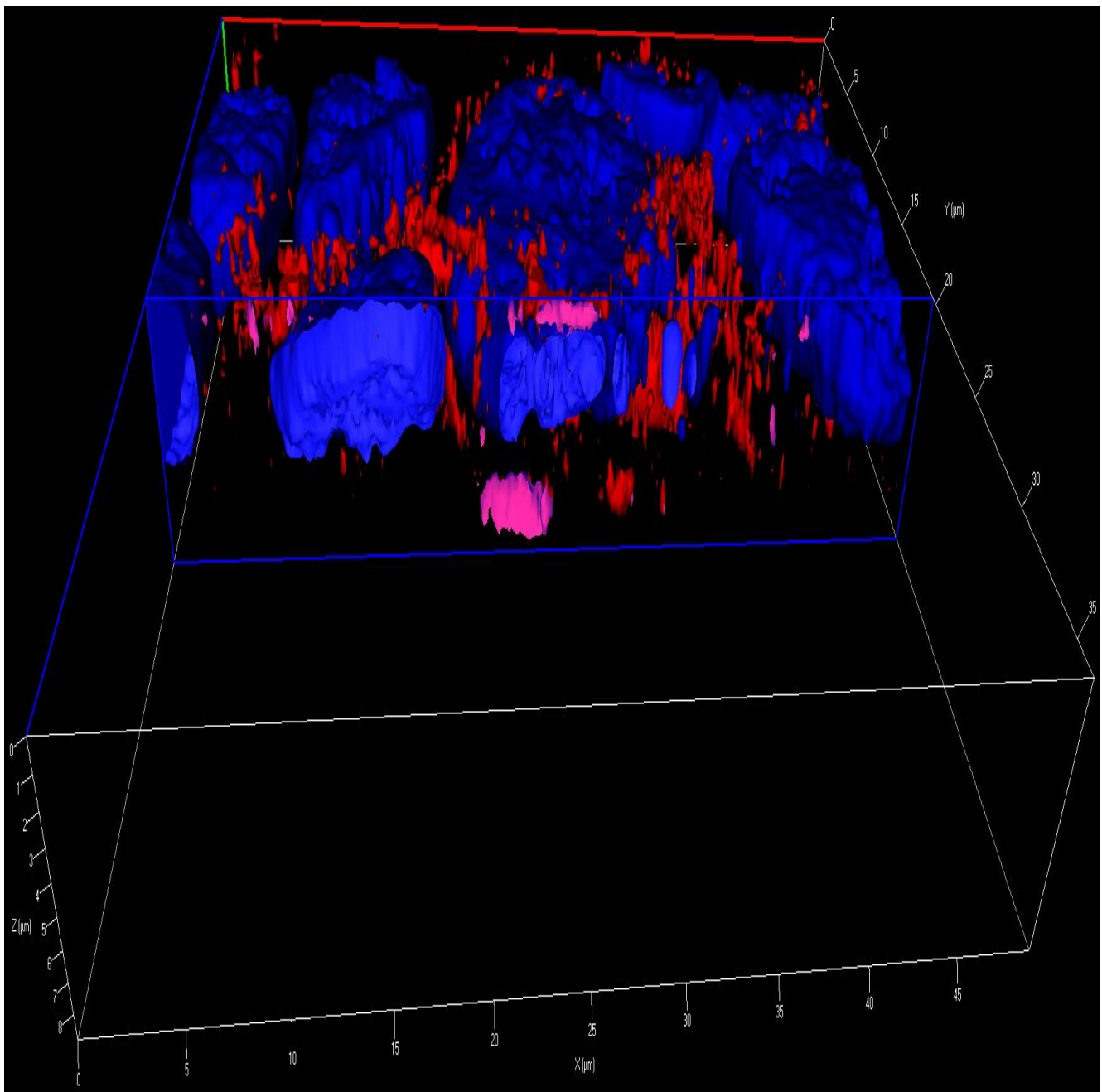


Fig. 19 Reconstrucción tridimensional de los 15 cortes ópticos de 100 nm sobre células T47D mediante el procedimiento *Z-stack* implementado por Microscopía Confocal de Barrido Láser.

2.3.2.4 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

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

Las sondas de silicio dopado con antimonio(n) tenían una frecuencia de resonancia media de 317-382 kHz con una constante de resorte de 20-80 N/nm que se usaron a una velocidad de escaneo de 0.4-0.7 Hz. El valor de amplitud del *cantilever* se mantuvo constante a aproximadamente 3000 mV y a un voltaje fijo de 1.5 V. Las imágenes de AFM fueron obtenidas manualmente con un tiempo medio de 45 minutos por muestra; los modos de adquisición fueron altura y fase y sus análisis se realizaron a través del software AFM NanoScope IIIa. Cada célula fue examinada en cinco lugares diferentes sobre su superficie en dos series diferentes de muestras. Generalmente, para un análisis de este tipo se realizan de 3 a 5 mediciones puntuales y se calcula su desviación estándar debido a que estos no pretenden ser exhaustivos. En la Fig. 20 se muestra la caracterización por AFM desde el diseño de una superficie nanoestructurada de plata hasta su funcionalización.

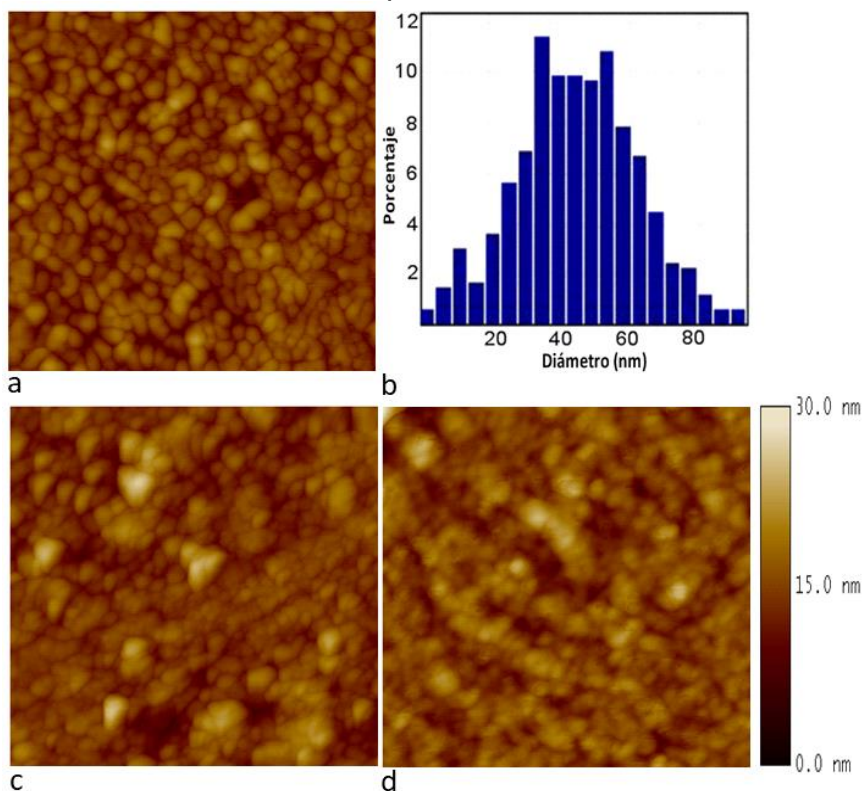


Fig. 20 Imágenes AFM de a) un sustrato nanoestructurado de plata, b) análisis estadístico del diámetro promedio (45.0 ± 16.7 nm) de las nanoestructuras de plata mediante el software SPIP 3D Image Processing v6.2.4, c) formación de las monocapas autoensambladas de ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA-SAMs), y d) inmovilización orientada del trastuzumab sobre las 4-MBA-SAMs para formar un FSNP.

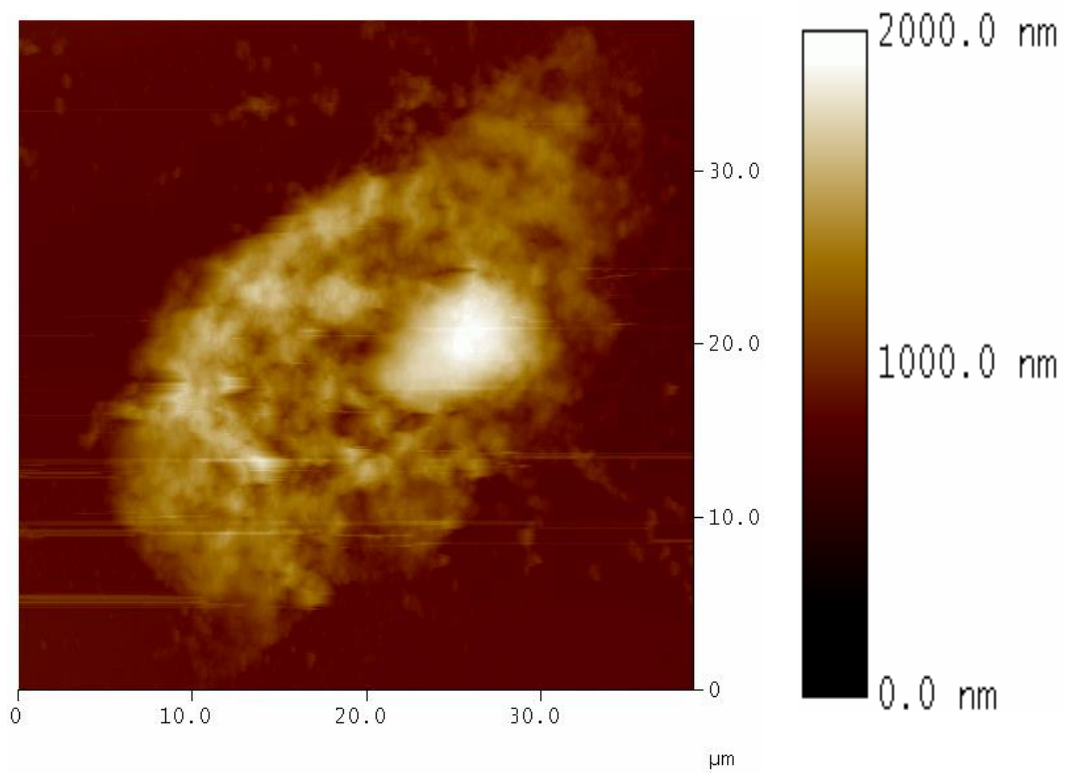


Fig. 21 a) Morfología bidimensional de una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP.

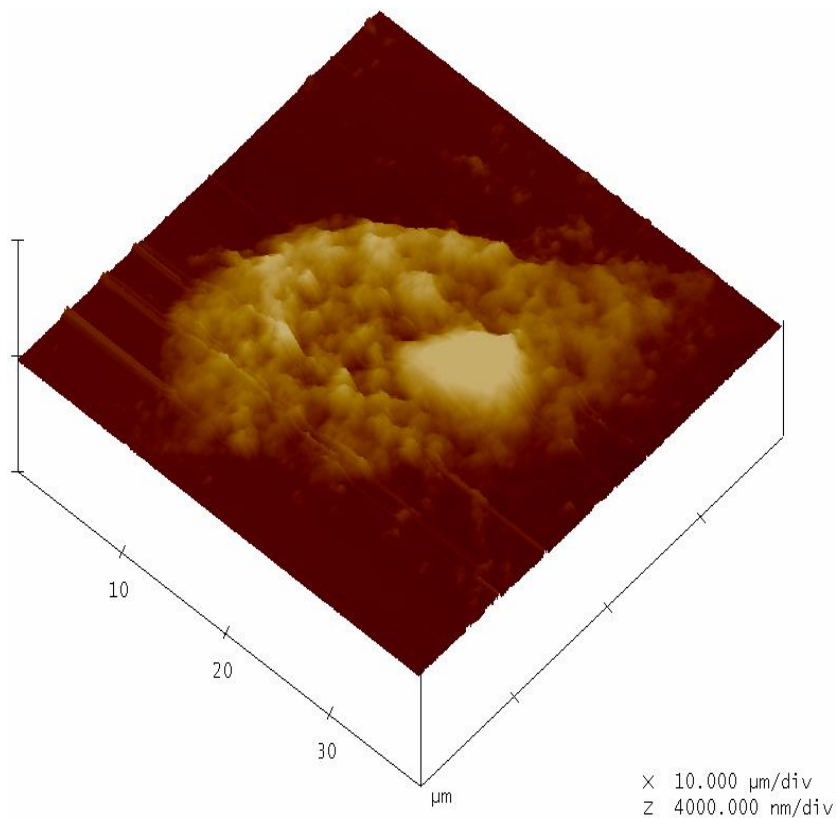


Fig. 21 b) Morfología tridimensional de una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP.

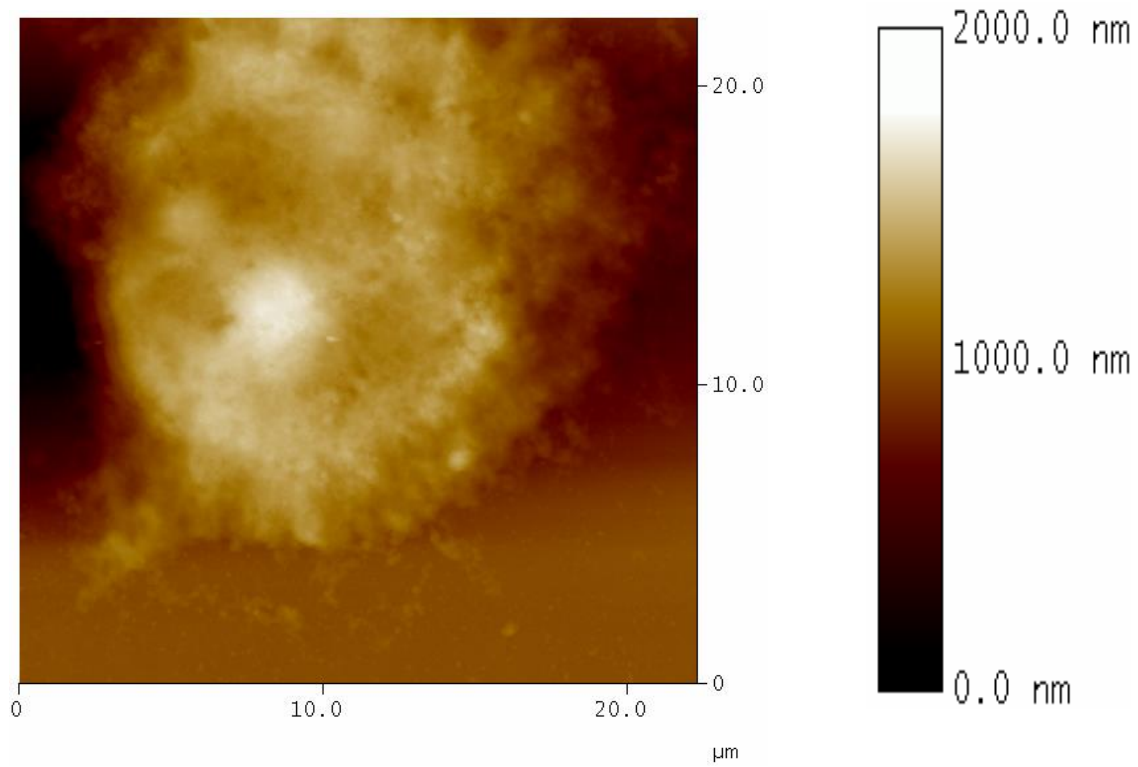


Fig. 22 a) Morfología bidimensional de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

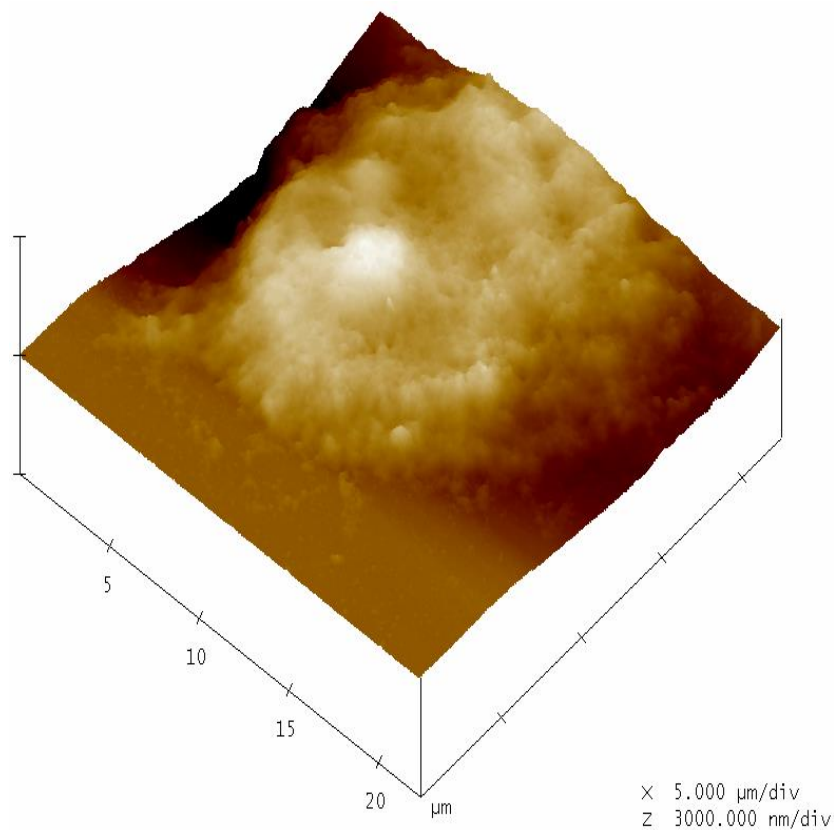


Fig. 22 b) Morfología tridimensional de una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

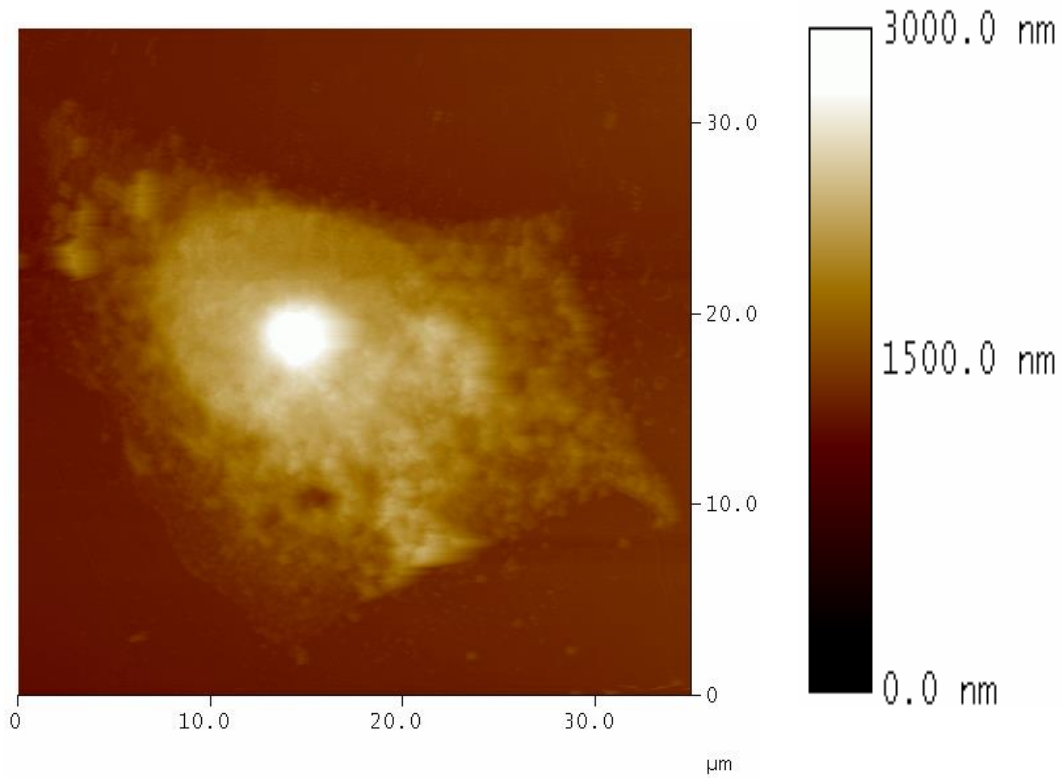


Fig. 23 a) Morfología bidimensional de una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP.

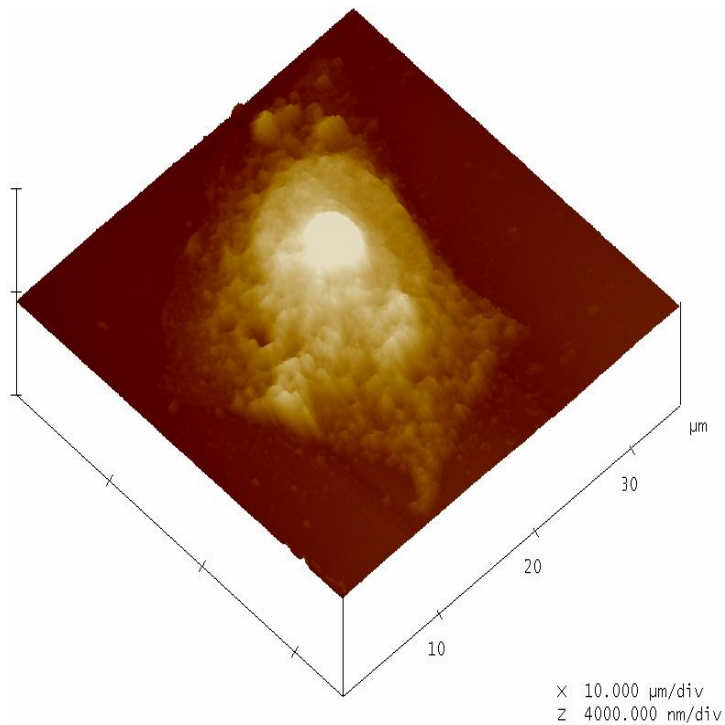


Fig. 23 b) Morfología tridimensional de una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP.

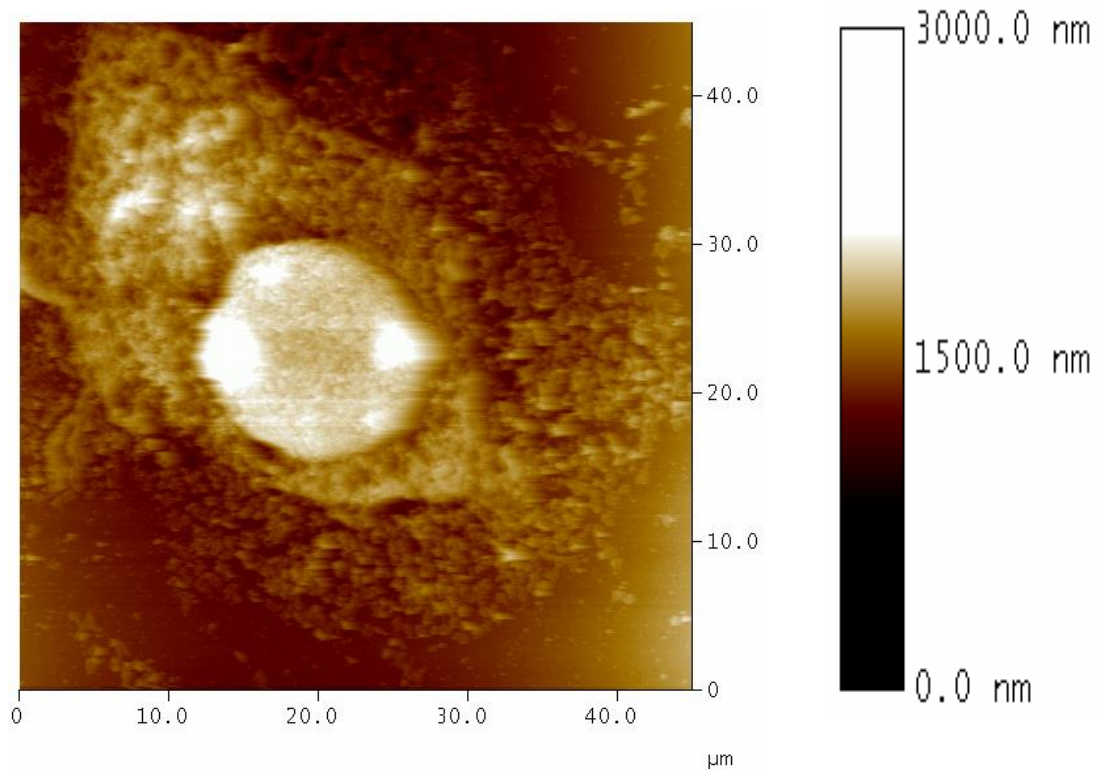


Fig. 24 a) Morfología bidimensional de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111).

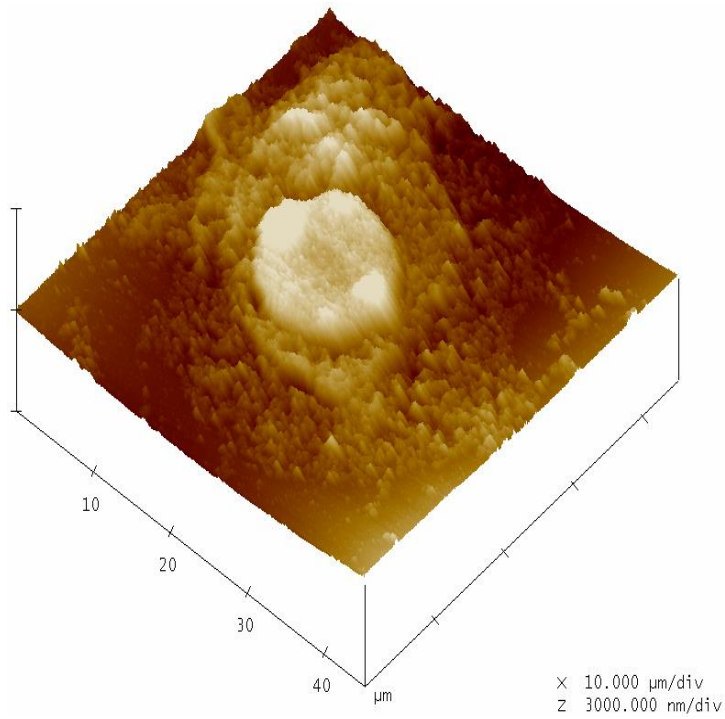


Fig. 24 b) Morfología tridimensional de una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111).

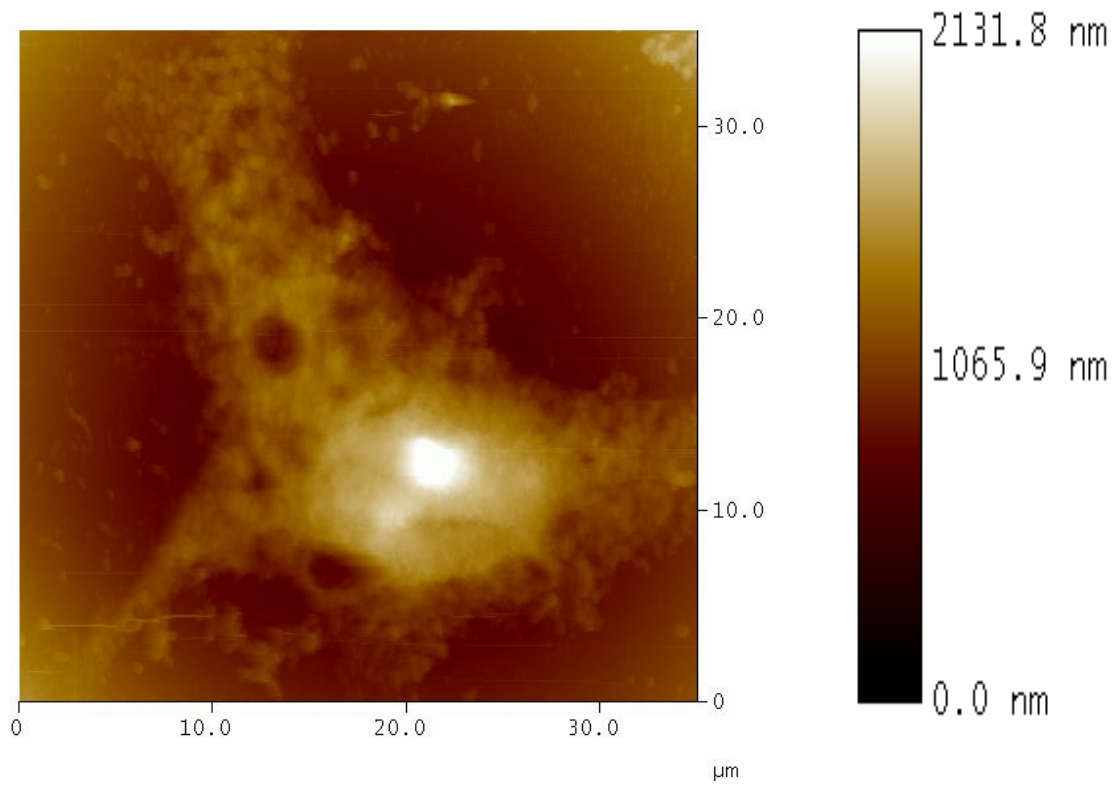


Fig. 25 a) Morfología bidimensional de una célula T47D adherida sobre un FSNP.

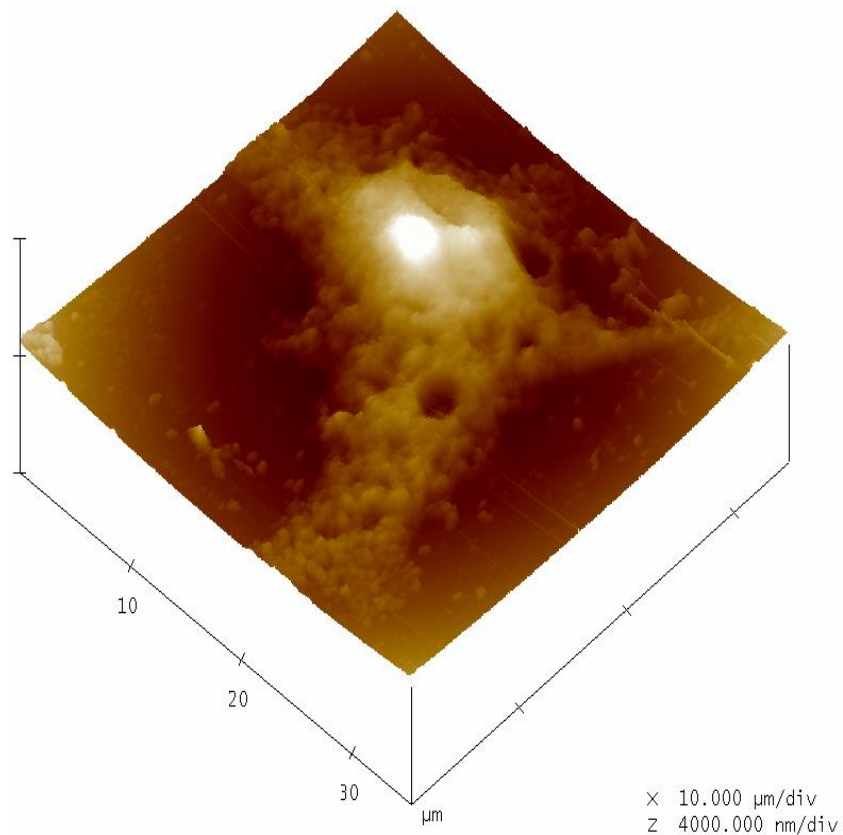


Fig. 25 b) Morfología tridimensional de una célula T47D adherida sobre un FSNP.

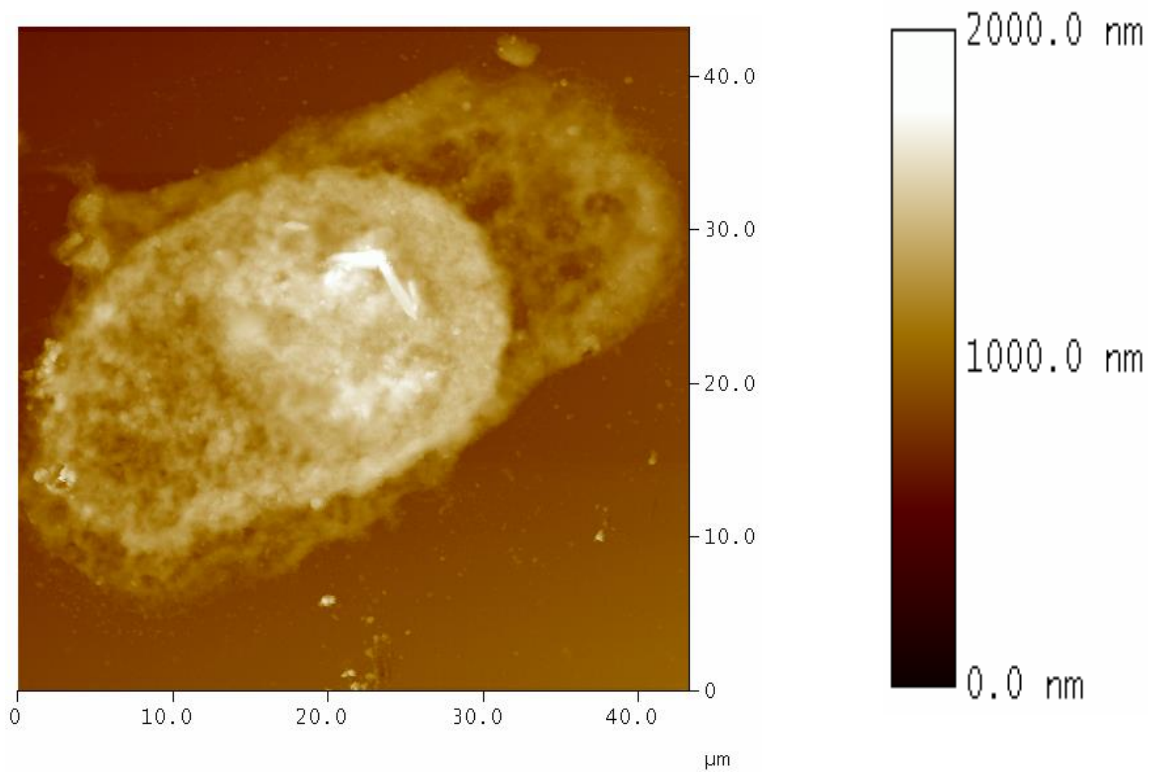


Fig. 26 a) Morfología bidimensional de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

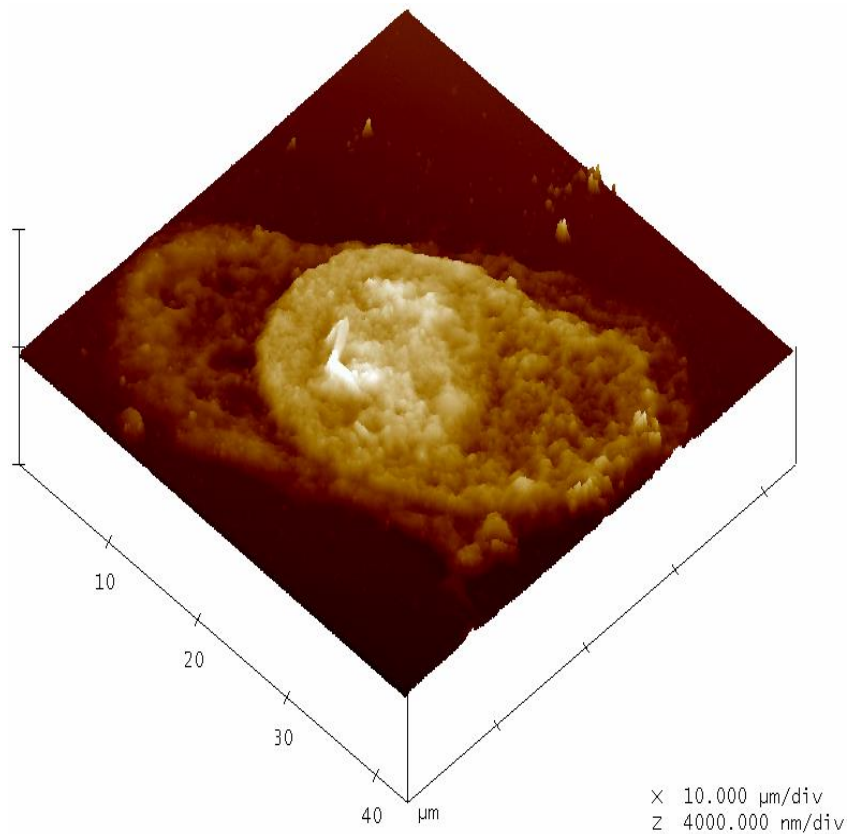


Fig. 26 b) Morfología tridimensional de una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

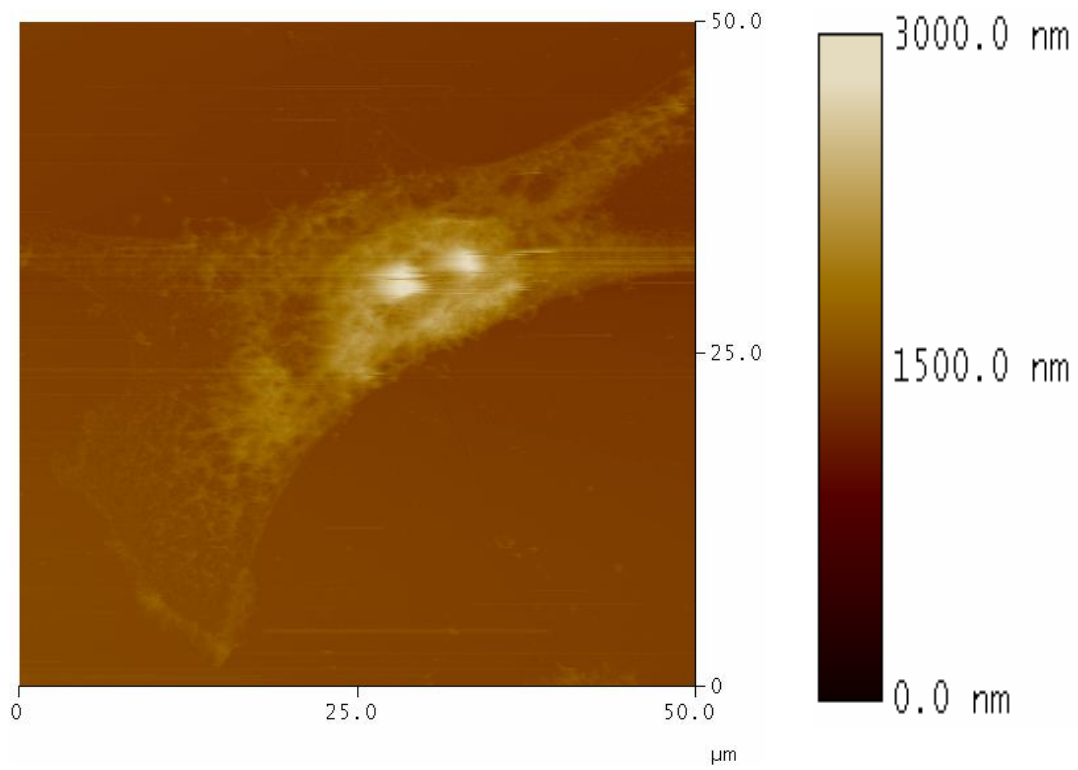


Fig. 27 a) Morfología bidimensional de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP.

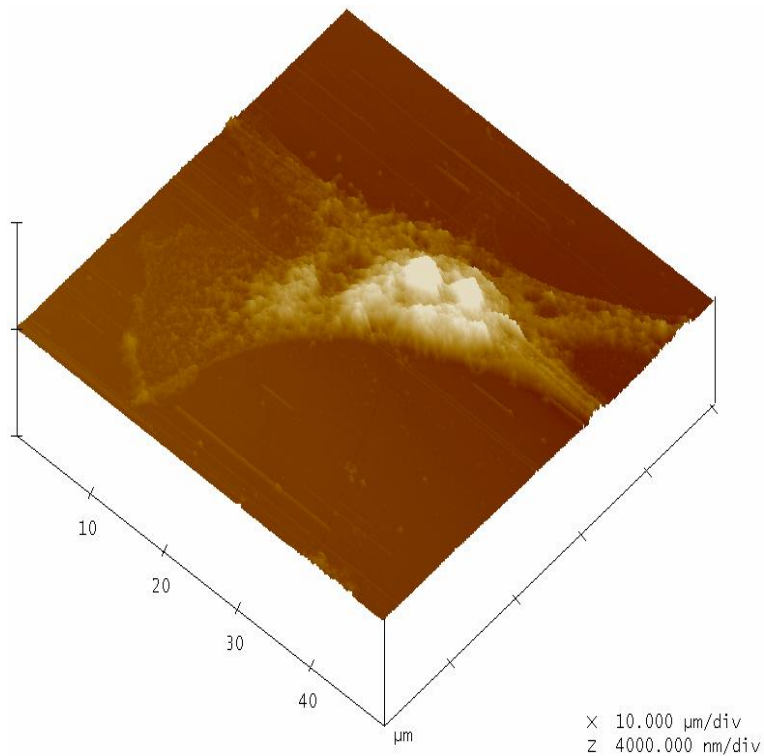


Fig. 27 b) Morfología tridimensional de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP.

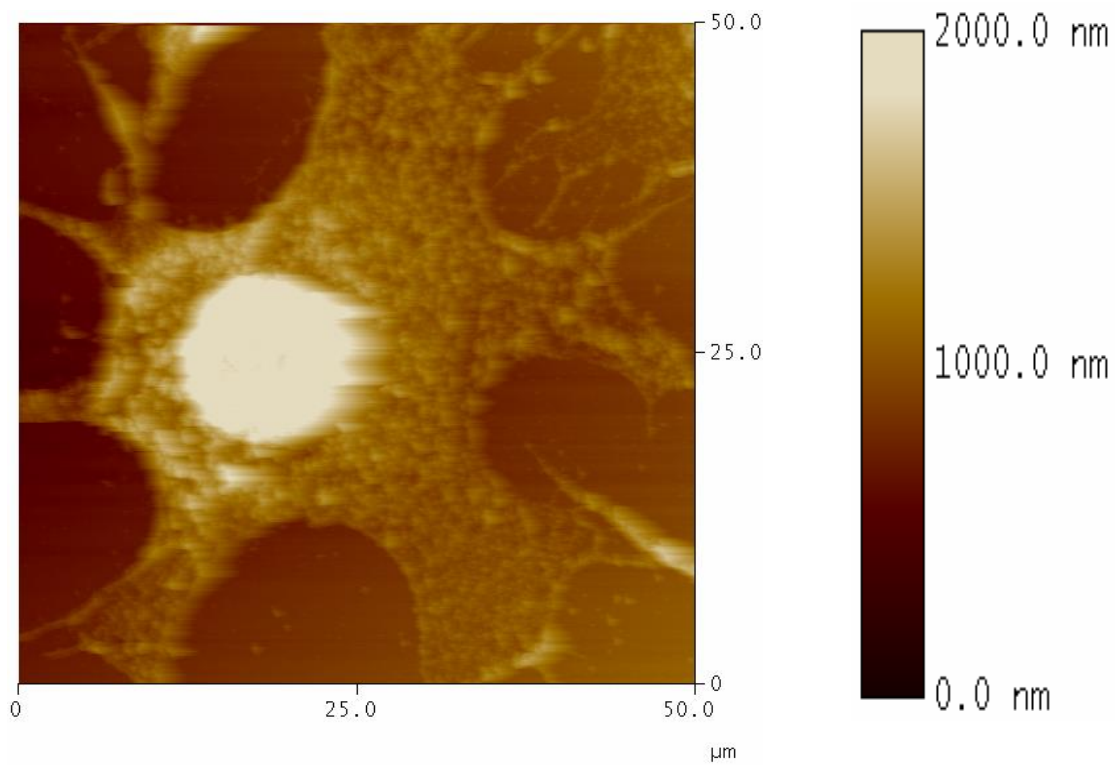


Fig. 28 a) Morfología bidimensional de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

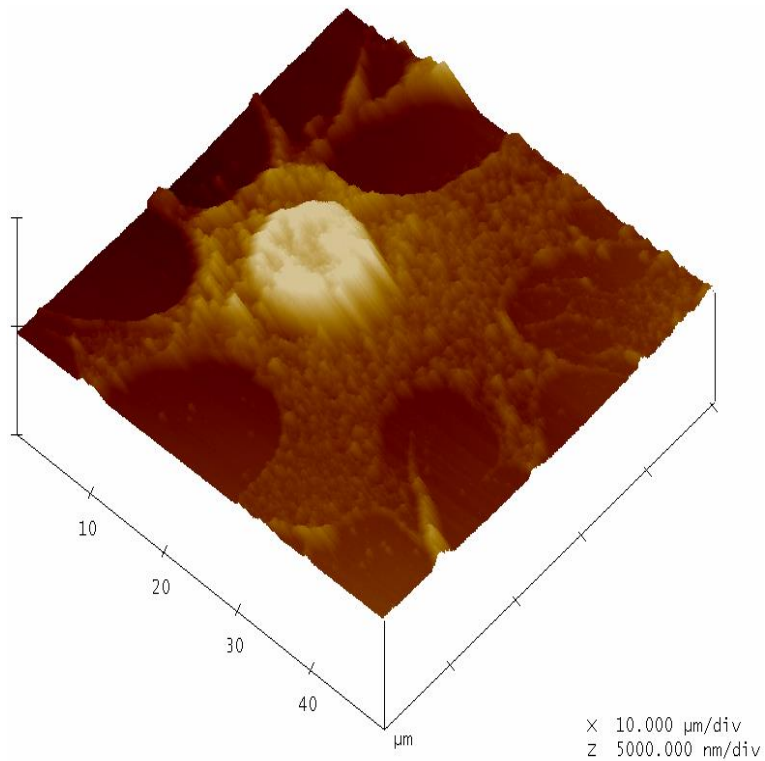


Fig. 28 b) Morfología tridimensional de una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

2.3.2.5 Cuantificación de la rugosidad superficial ($RMS_{[Rq]}$) de las membranas plasmáticas de células cancerosas por AFM

La raíz cuadrática media de la expresada con factor de rugosidad $RMS_{[Rq]}$ (RMS; por las siglas en inglés de Root Mean Square) es una función que toma los cuadrados de las alturas (Z) de las mediciones de cada pixel (x,y,z). La rugosidad superficial o textura superficial es similar a la rugosidad promedio, siendo la única diferencia los valores absolutos cuadrados medios del perfil de rugosidad superficial.

De acuerdo con Colton *et al.* [43] los puntos clave que se deben tomar en cuenta a la hora de determinar la rugosidad superficial o textura superficial por AFM son:

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

El análisis de la rugosidad superficial $RMS_{[Rq]}$ permite encontrar las variaciones topográficas que presentan las muestras al ser “barridas” por una sonda. Esta técnica permite estimar la rugosidad superficial basándose en lo siguiente: en un terreno con poca textura superficial, los vectores perpendiculares a la superficie del mismo serán aproximadamente paralelos por lo que, presentarán una altura (Z -escala) baja. Por otro lado, en un terreno con gran textura superficial, los cambios vectoriales de pendiente y orientación harán que estos presenten una altura mayor [44]. El análisis textural superficial realizado a través de AFM se representa de manera esquemática en la Fig. 29.

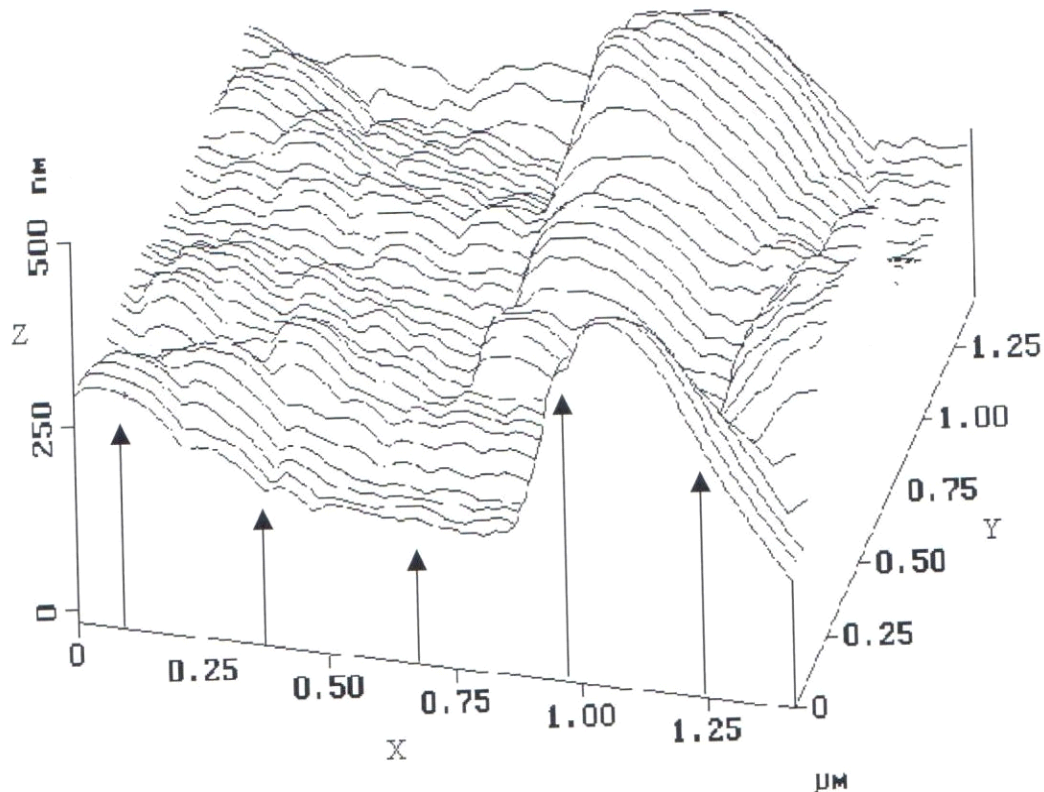


Fig. 29 Representación esquemática del análisis de la rugosidad superficial por AFM [45].

Una imagen de AFM tiene tres ejes (x,y,z) que es cubierta por 512 líneas que conforman la imagen tridimensional por lo que una imagen bidimensional (512 líneas x 512 líneas) da lugar a una resolución espacial de 262,144 píxeles. Esto último quiere decir que al escanear una pequeña área se obtiene mejor resolución. El número de píxeles es siempre mismo para diferentes áreas de escaneo. Por lo tanto, para comparar $RMS_{[Rq]}$ se requiere siempre de una misma área de escaneo.

$$RMS_{[Rq]} = R(f(\sum (Z_i - Z_{prom})^2, N)) \quad \text{Ecuación (1)}$$

Z_{prom} : Cálculo del valor promedio en Z en cierta área

Z_i : Valor corriente de Z

N: Número de puntos en el área dada

Para obtener una mayor resolución se debe escanear un área pequeña. Por ejemplo, si el tamaño de una imagen es de 10 μm (10,000 nm), entonces se obtendría una resolución de 19.53 nm/píxel, es decir, 19.53 nm representa la distancia entre dos píxeles adyacentes, por

lo tanto, objetos debajo a 19.53 nm no se logran resolver (resolución baja). Ahora si nuestra área de muestreo es una 1 μ m, entonces, la distancia entre dos pixeles es de 1.953 nm. Esto último quiere decir que la resolución en ese caso específico se mejoró 10 veces.

En cada pixel existe información en las dimensiones x,y,z dónde z representa la altura. Los valores en el eje Z se pueden tratar estadísticamente para calcular la textura o rugosidad superficial de la muestra en cuestión mediante la diferencia absoluta de los valores z elevando dicha diferencia al cuadrado dividiendo entre el número de puntos (N) y obteniendo su raíz cuadrada correspondiente. El factor RMS $_{[Rq]}$ se usa para la interpretación y evaluación de la textura o rugosidad superficial de las muestras analizadas.

El resultado del análisis cuantitativo de la rugosidad superficial de las diferentes líneas celulares usadas en el presente estudio se muestra en la Tabla 3.

Línea celular de carcinoma de mama	RMS $_{[Rq]}$ (nm)
SKBR3 / FSNP	48.9 \pm 15.2
SKBR3 / Au(111)	39.3 \pm 7.2
MCF-7 / FSNP	43.0 \pm 6.8
MCF-7 / Au(111)	58.9 \pm 9.3
T47D / FSNP	50.1 \pm 10.7
T47D / Au(111)	88.4 \pm 27.8
MDA-MB-231 / FSNP	40.2 \pm 13.3
MDA-MB-231 / Au(111)	43.4 \pm 8.1

Tabla 3. Mediciones de la rugosidad superficial por AFM de las diferentes membranas plasmáticas de células de carcinoma de mama. Los resultados se muestran como: media \pm Desviación Estándar.

RMS _[Rq] de las diferentes líneas celulares

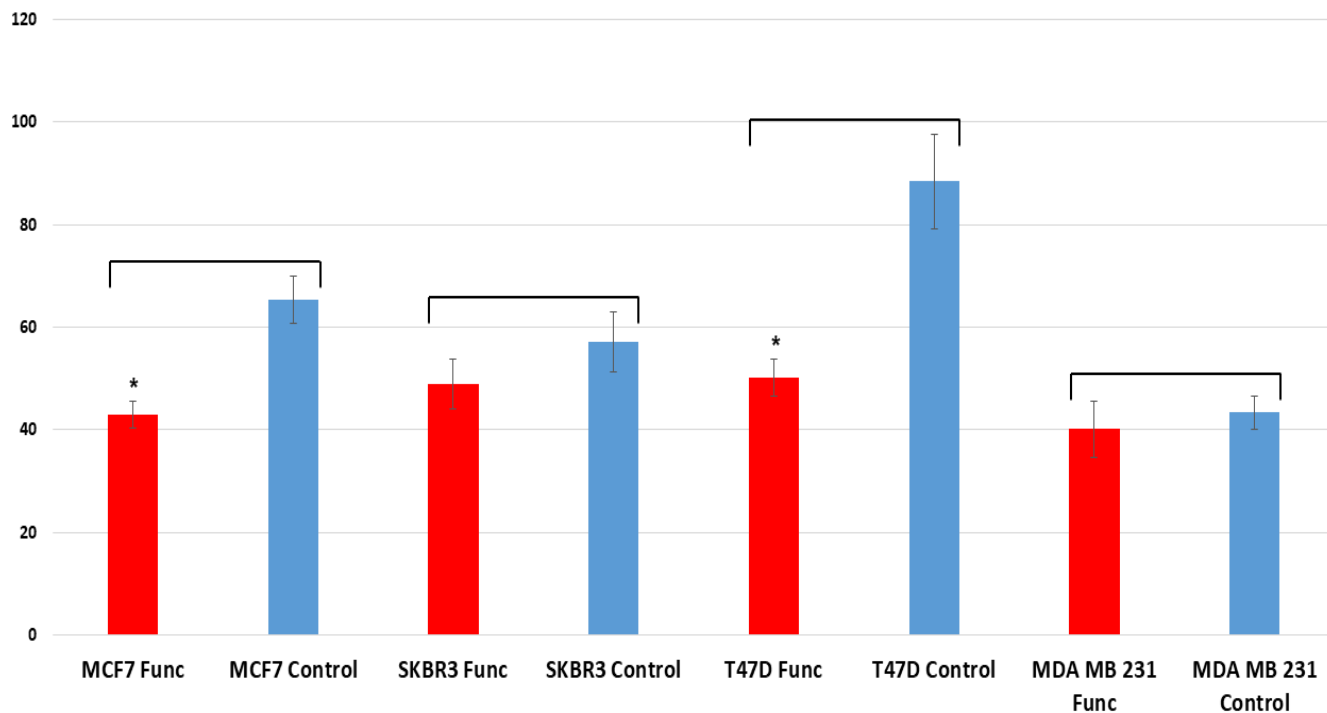


Fig. 30 Análisis de la rugosidad (mediante el factor RMS _[Rq]) por AFM de las membranas plasmáticas de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un FSNP y un sustrato Au(111). Las barras de errores representan el error estándar. **Nota:** Los asteriscos representan el par de muestras [Funcionalizada y No Funcionalizada (control)] que fueron estadísticamente significativas a un p-valor < 0.05.

	N	Mean	StDev	SE Mean		N	Mean	StDev	SE Mean
MCF-7 Func	7	42.95	6.75	2.55	SKBR3 Func	10	48.87	15.19	4.80
MCF-7 Control	7	65.36	11.96	4.52	SKBR3 Control	10	57.10	18.24	5.77
Difference	7	-22.40	8.22	3.11	Difference	10	-8.23	25.43	8.04
p-value = 0.000					p-value = 0.333				
	N	Mean	StDev	SE Mean		N	Mean	StDev	SE Mean
T47D Func	9	50.09	10.73	3.58	MDA-MB-231 Func	6	40.16	13.27	5.42
T47D Control	9	88.37	27.82	9.27	MDA-MB-231 Control	6	43.35	8.03	3.28
Difference	9	-38.30	30.10	10.00	Difference	6	-3.19	15.35	6.27
p-value= 0.005					p-value = 0.632				

Fig. 31 Prueba t pareada para encontrar la diferencia de medias entre las rugosidades de las membranas plasmáticas adheridas sobre un FSNP y un sustrato Au(111). El área de medición de la rugosidad superficial fue de 5 μm x 5 μm. N representa el número de mediciones o repeticiones.

2.3.3 Resultados y Discusión

2.3.3.1 Análisis de la presencia de HER2 por CLSM y Z-stack

Nuestro principal interés son los receptores superficiales HER2 (es importante señalar que el anticuerpo monoclonal trastuzumab tiene una alta afinidad por los receptores superficiales HER2), ya que nuestra superficie nanoestructurada funcionalizada sólo interaccionaría con estos y dicha respuesta se mediría a través de dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS). Esta respuesta está correlacionada con la expresión diferencial de HER2 en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama y es de mucho interés para asumir que el sustrato nanoestructurado funcionalizado trabaja de manera adecuada y puede ser usado para el desarrollo de un biosensor nanoestructurado para la detección de células de cáncer de mama basado en SERS.

De acuerdo con las Fig. 5 y 6 la línea celular SKBR3 presenta alta expresión del receptor superficial HER2 (alta inmunopositividad) en 80% al 90% de las células analizadas, mientras que el resto lo presentan disperso en el citoplasma. En el caso de las células MCF-7 y de acuerdo con las Fig. 7 y 8, el receptor superficial HER2 se presenta en el 40% al 60% del total de las células analizadas y también se puede observar en el núcleo, especialmente en las células donde hay más expresión, efecto que no se observa en las células SKBR3. La expresión de HER2 en la superficie de las membranas de células T47D se observa en menos del 20% de las células analizadas, de acuerdo con las Fig. 9 y 10, con menor intensidad que las otras dos líneas celulares y preferentemente en el citoplasma. Por último, en el caso de las células MDA-MB-231, y de acuerdo con las Fig. 11 y 12, la inmunopositividad para HER2 es muy débil, ya que a través de la literatura científica se sabe que es una línea celular que no expresa HER2 [46]. Estas aseveraciones se basan en el análisis visual de la tinción del fluoróforo Alexa Fluor 594 (intensidad de color rojo) de las imágenes (Figs. 5-12). Para un mejor análisis visual, las imágenes de CLSM “representativas” de las cuatro diferentes líneas celulares de carcinoma de mama se muestran en la Fig. 13.

Las células T47D presentan receptores superficiales HER2, así como receptores HER2 translocados al núcleo, ya que sus imágenes presentan “spots” color rosa (Fig. 9-10), lo cual sugiere que la emisión de fluorescencia en el espectro del azul del DAPI y del Alexa Fluor

594 (rojo) se traslapan. Adicionalmente, se sabe que el receptor HER2 migra al núcleo (translocación nuclear) donde actúa como factor de transcripción [47-52].

Para corroborar si los receptores HER2 se encuentra en la membrana plasmática, citoplasma o núcleo (localización extracelular o intracelular de HER2), se procedió a hacer cortes de 100 nm de espesor óptico (Fig. 14, 16 y 18) sobre tres diferentes líneas celulares y, posteriormente, mediante el procedimiento llamado *Z-stack*, dichos cortes se reconstruyeron para formar una imagen 3D (Fig. 15, 17 y 19).

Por lo tanto, los resultados permiten establecer la cantidad de HER2 presente en las membranas celulares de la siguiente manera: SKBR3>MCF-7>T47D>MDA-MB-231. Estos resultados son congruentes con lo previamente reportado en la literatura científica: SKBR3 es una línea celular que sobreexpresa HER2 [53], MCF-7 y T47D son líneas celulares de baja expresión de HER2 [54] y MDA-MB-231 se considera triple negativo ya que no expresa receptores HER2, de progesterona ni de estrógeno [55]. Cordo Russo *et al.* reportaron que el HER2 expresado en la línea T47D es predominantemente citosólico [48]. Por lo tanto, la línea celular MCF-7 presenta más receptores superficiales HER2 que la línea celular T47D.

2.3.3.2 Análisis de la rugosidad superficial por AFM

Al hacer un análisis visual de las imágenes de AFM se puede observar que las Fig. 21 a-b y Fig. 22 a-b (SKBR3), Fig. 23 a-b y Fig. 24 a-b (MCF-7), Fig. 25 a-b y Fig. 26 a-b (T47D) y Fig. 27 a-b y Fig. 28 a-b (MDA-MB-231) muestran la rugosidad de sus membranas plasmáticas en 2D y 3D, respectivamente. De manera visual se observaron cambios morfológicos entre las células adheridas sobre un FSNP y un sustrato plano Au(111), aunque de manera estadística no se pudo establecer una diferencia significativa entre las líneas celulares SKBR3 y MDA-MB-231 respecto a si el FSNP afectaba o no la rugosidad de las membranas celulares adheridas sobre estos. El proceso para el cálculo de la rugosidad superficial ha sido reportado en un trabajo previo sobre la incorporación de nanopartículas en células de carcinoma de mama [56].

La Fig. 29 es una representación esquemática del funcionamiento de una punta de AFM al escanear la superficie de una muestra. El análisis de las rugosidades superficiales de las diferentes membranas plasmáticas adheridas sobre los diferentes sustratos -FSNP y Au(111)- nos permitiría conocer cualquier cambio en sus morfologías y poder correlacionarlas con la interacción entre los receptores superficiales HER2 expresados en las diferentes líneas celulares y los sustratos probados (funcionalizado y no funcionalizado).

Al analizar las diferentes rugosidades de las membranas plasmáticas se evitaron las zonas que tenían poros prominentes, ya que, de lo contrario sus valores de rugosidad superficial se dispararían, por lo que se escogieron zonas cuasi-homogéneas sobre las diferentes células analizadas para evitar lo antes mencionado. En la Fig. 30 se muestra el análisis cuantitativo de las rugosidades superficiales de las diferentes líneas celulares de carcinoma de mama.

Por otro lado, a partir de la prueba estadística t pareada (Fig. 31) se puede inferir que las rugosidades superficiales de las membranas plasmáticas de las células MCF-7 y T47D adheridas sobre un FSNP y sobre un sustrato Au(111) son significativas, ya que muestran un $p\text{-value} < 0.05$. En cambio, las demás rugosidades superficiales de las líneas celulares SKBR3 y MDA-MB-231 resultaron estadísticamente no significativas.

2.4 Caracterización por dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS) y por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

2.4.1. Objetivo particular 4

Caracterizar por SERS la interacción de los sustratos nanoestructurados funcionalizados para la detección de células de cáncer de mama que expresan HER2 en forma diferencial.

2.4.2 Materiales y Métodos

2.4.2.1 Visualización por microscopía óptica de las células adheridas al FSNP

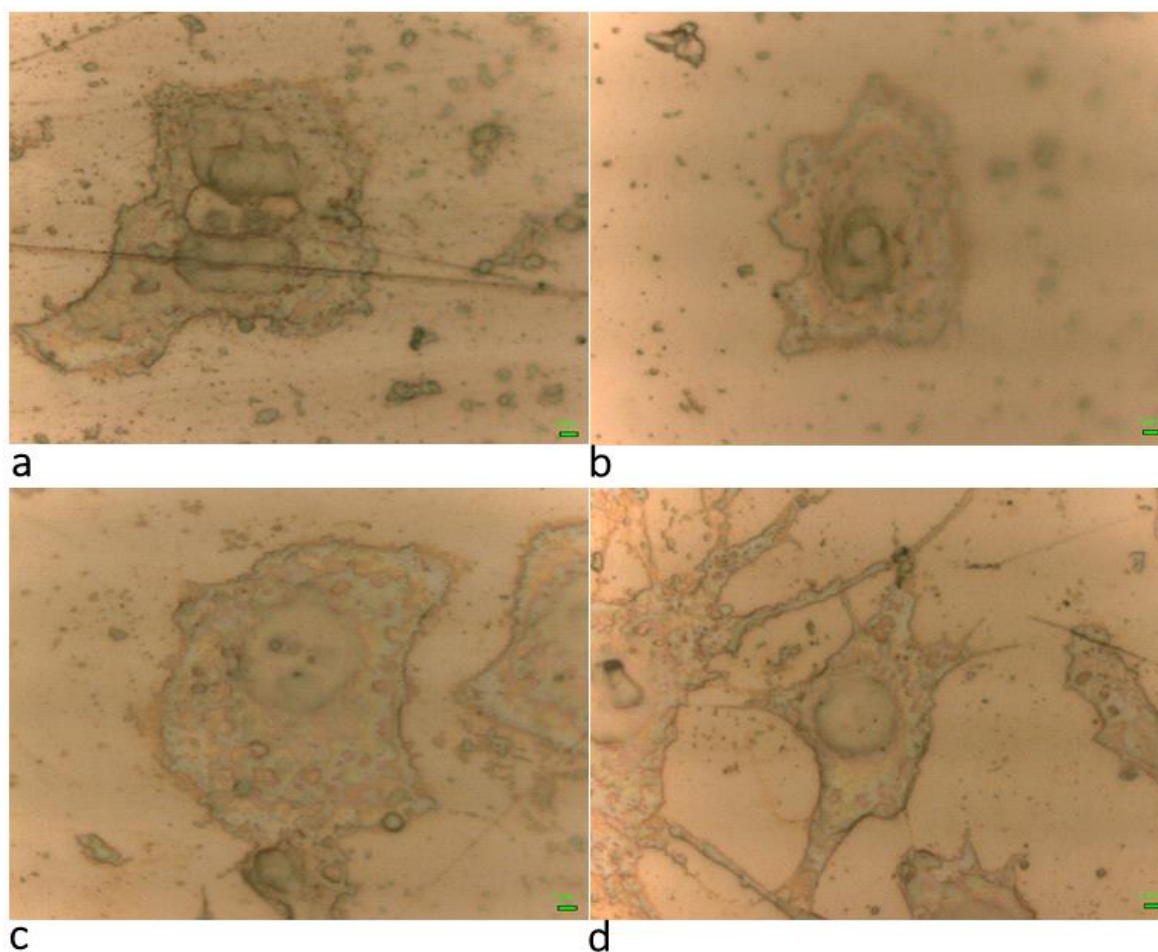


Fig. 32 Imágenes de Microscopía Óptica de las diferentes líneas celulares adheridas sobre un FSNP a) células SKBR3, b) célula MCF-7, c) células T47D, y d) células MDA-MB-231. Las células se incubaron durante 24 h a condiciones pseudofisiológicas (37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%) y posteriormente se fijaron por medio de un tren de alcohol etílico. Aumento: 100x.

2.4.2.2 Caracterización por SERS

La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica rotovibracional que se basa en la dispersión inelástica de la luz de una fuente de excitación monocromática. Por otro lado, la espectroscopía Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS) es una técnica espectroscópica rotovibracional que permite una detección selectiva y altamente sensible mediante la amplificación de los campos eléctricos localizados sobre la superficie de un material plasmónico (tales como el oro y plata nanoestructurada) cuando se excitan con una fuente de excitación monocromática. Esto da como resultado una mejora de la señal Raman, que permite la detección de analitos de baja concentración, dando lugar al uso de SERS como una herramienta de diagnóstico [57].

Los espectros Raman se calibraron usando el número de onda localizado en 521 cm^{-1} del silicio monocristalino. Con la finalidad de obtener espectros Raman espacialmente similares, éstos fueron tomados cerca del núcleo de las diferentes células analizadas. Todos los espectros Raman se registraron al menos tres veces en tres diferentes puntos de la muestra, a temperatura ambiente, con un sistema micro-Raman Horiba Jobin-Yvon LabRam HR 800, que estaba acoplado con microscopio confocal Olympus BX40, equipado con un detector CCD.

Las condiciones para la obtención de los espectros Raman fueron:

Modelo: Sistema micro-Raman Horiba Jobin Yvon LabRam HR 800

Excitación láser: 532.1 nm

Objetivo del haz: 50x

Potencia: 7 mW

Tiempo de integración de la señal: 100 acumulaciones de 10 s por cada espectro.

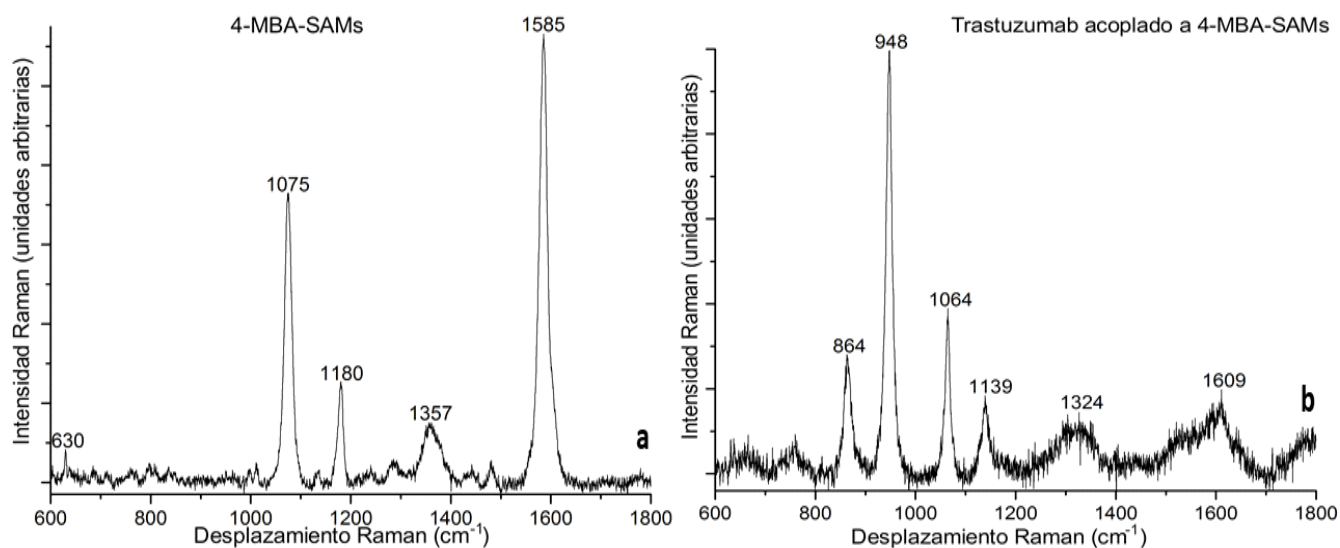


Fig. 33 Espectros Raman de a) monocapas autoensambladas de ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA-SAMs), y b) inmovilización orientada del trastuzumab sobre las 4-MBA-SAMs para formar un FSNP.

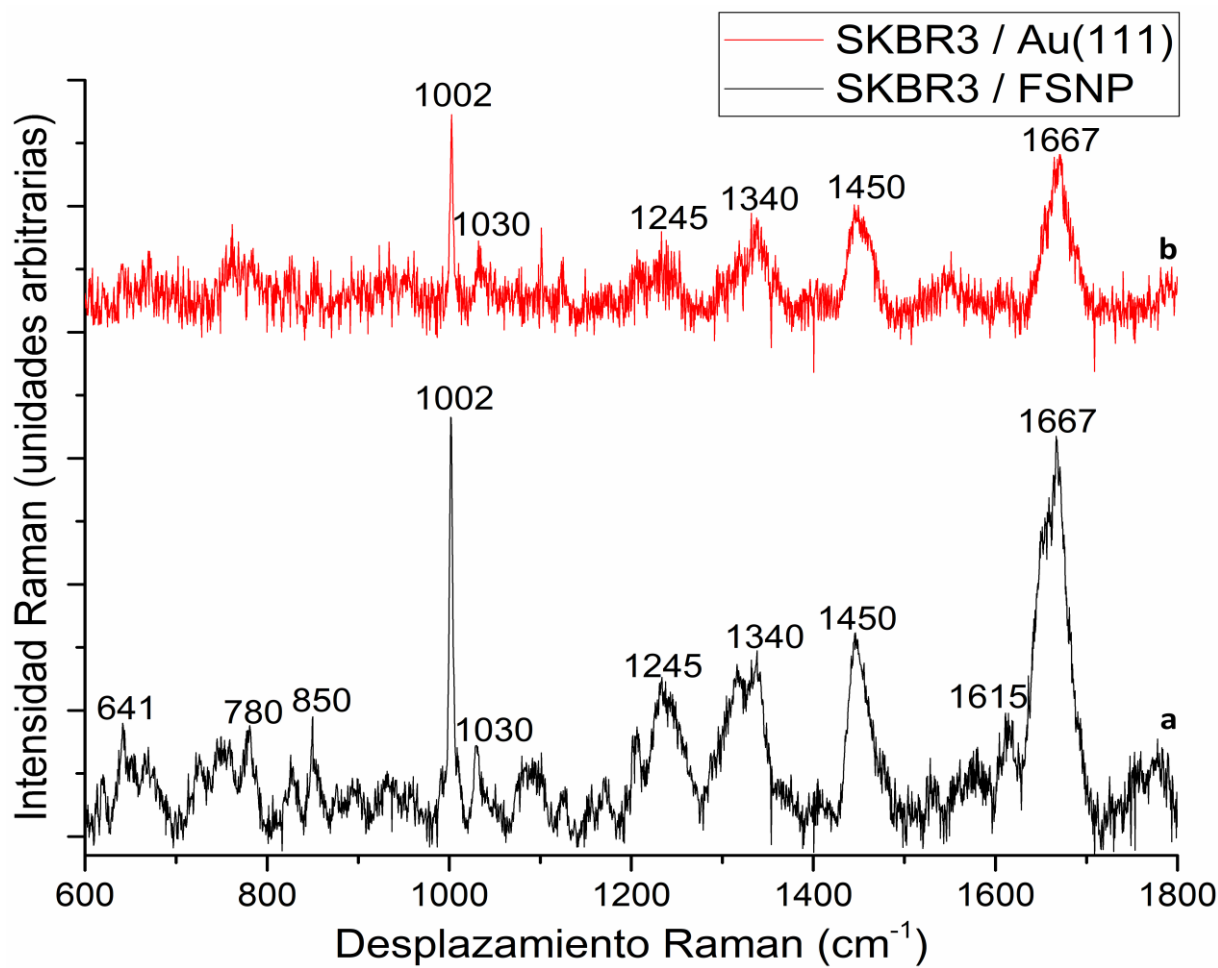


Fig. 34 Espectros Raman de a) una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP y b) una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

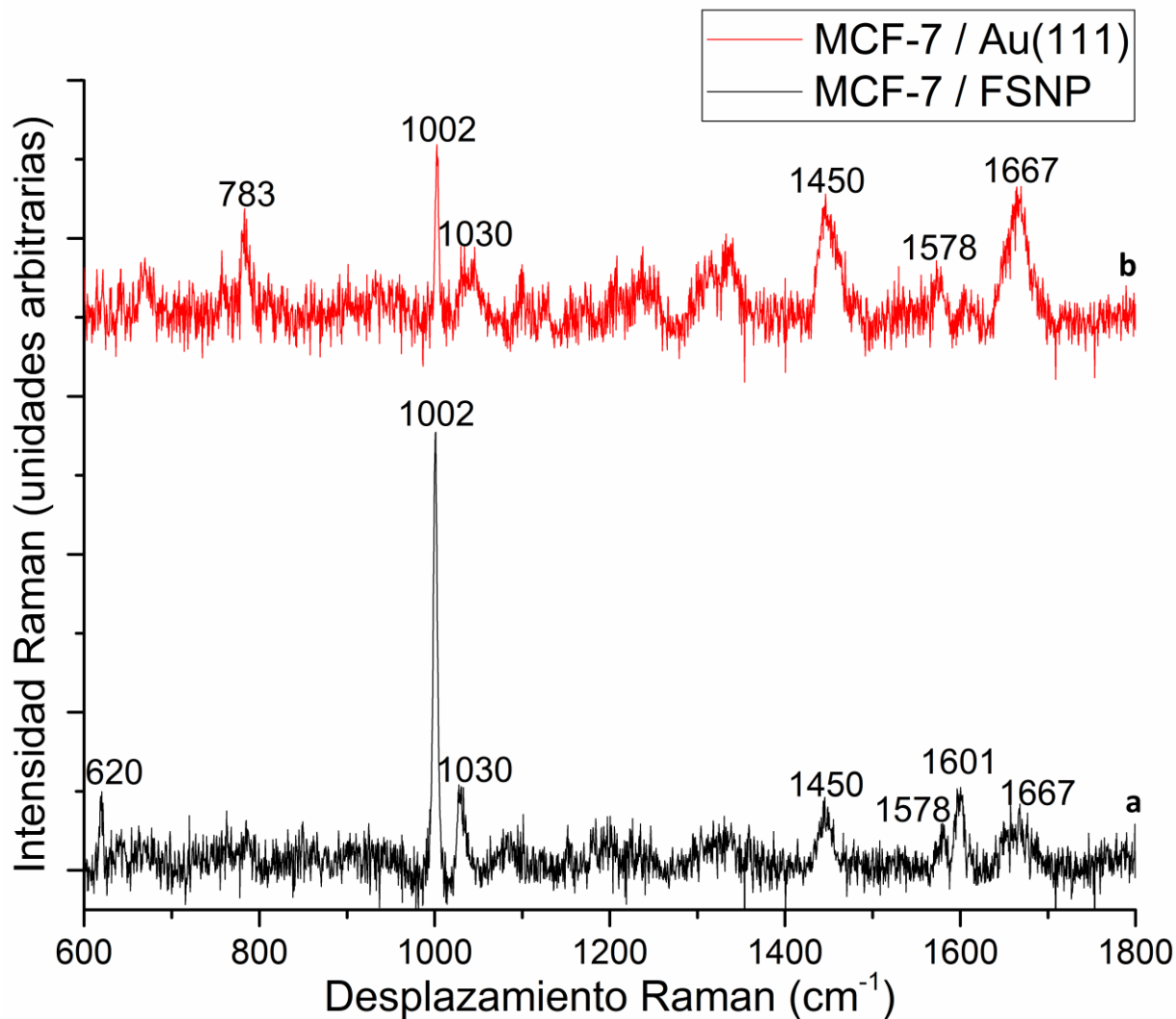


Fig. 35 Espectros Raman de a) una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP y b) una célula MCF-7 adherida sobre un sustrato Au(111).

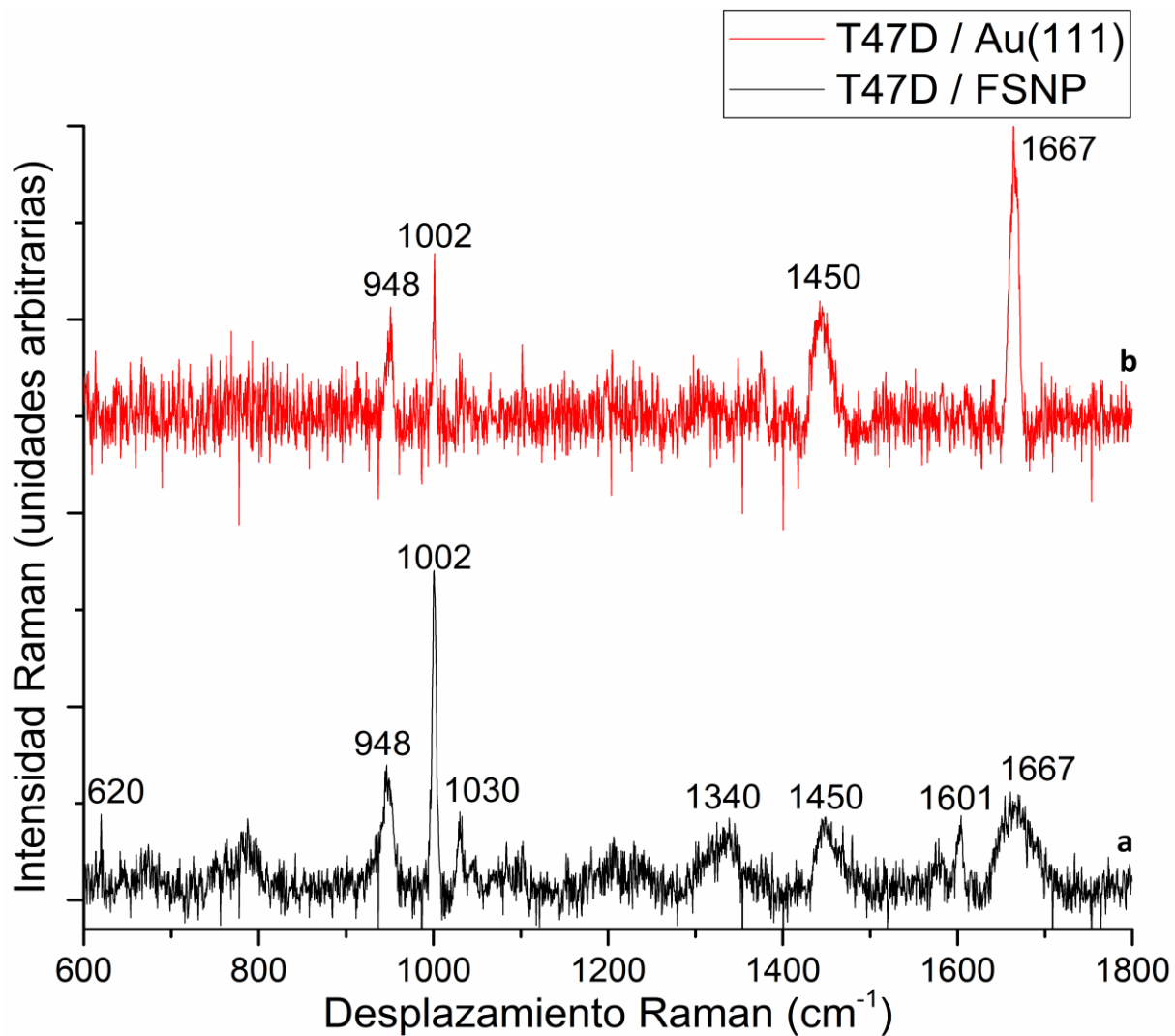


Fig. 36 Espectros Raman de a) una célula T47D adherida sobre un FSNP y b) una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

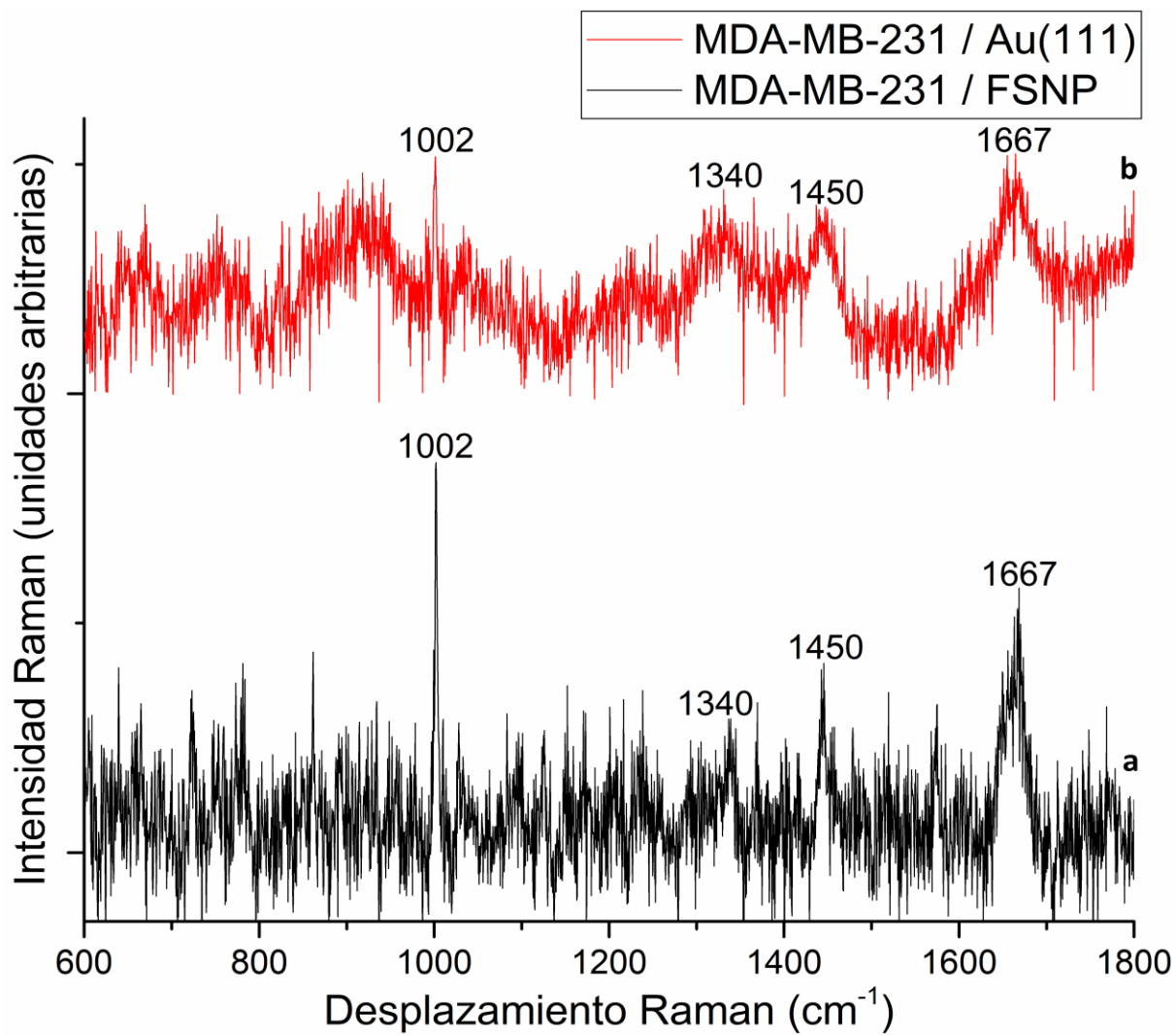
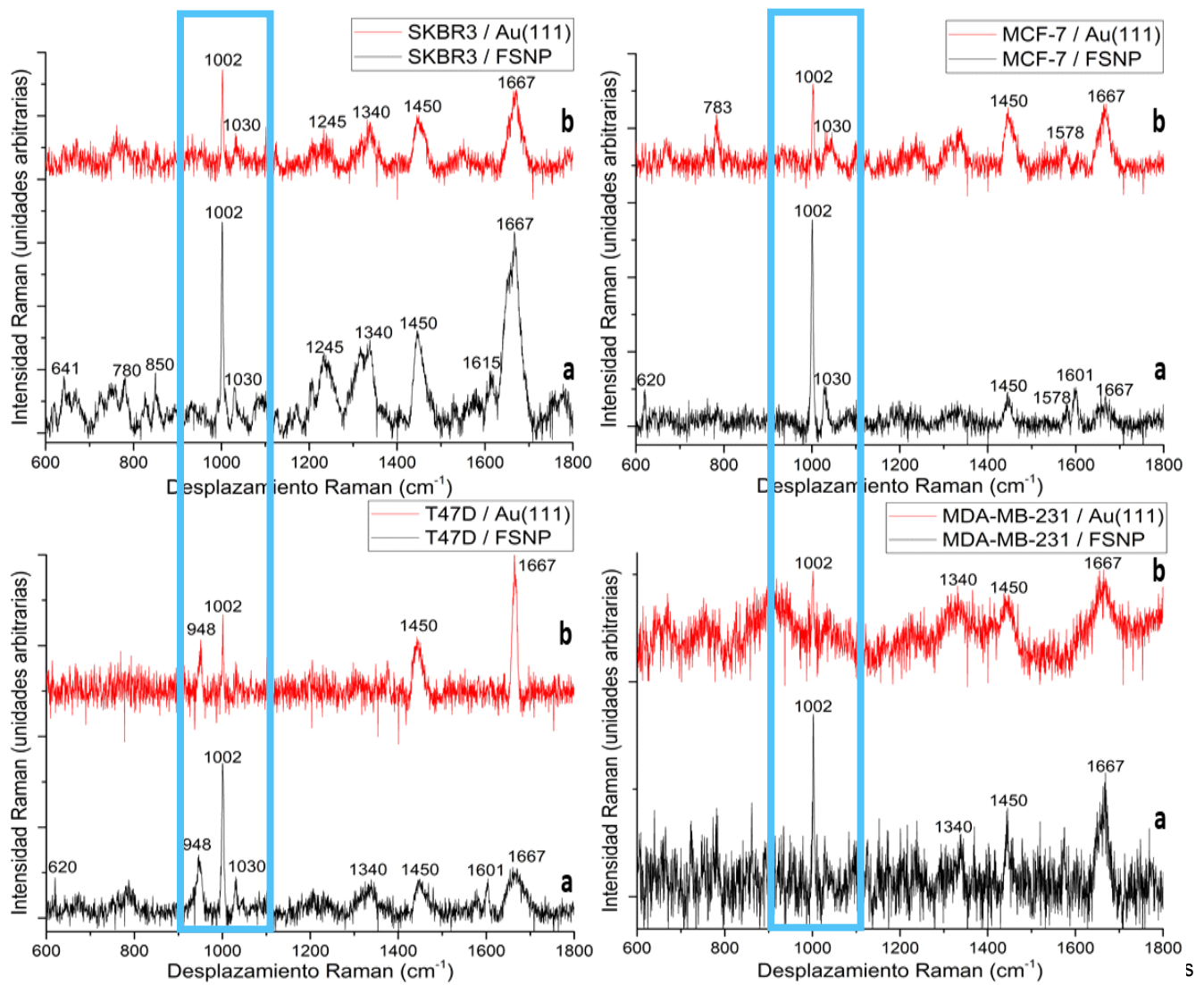


Fig. 37 Espectros Raman de a) una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP y b) una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).



y b) los cuatro controles, superficie plana de Au(111), de las diferentes líneas celulares respectivamente.

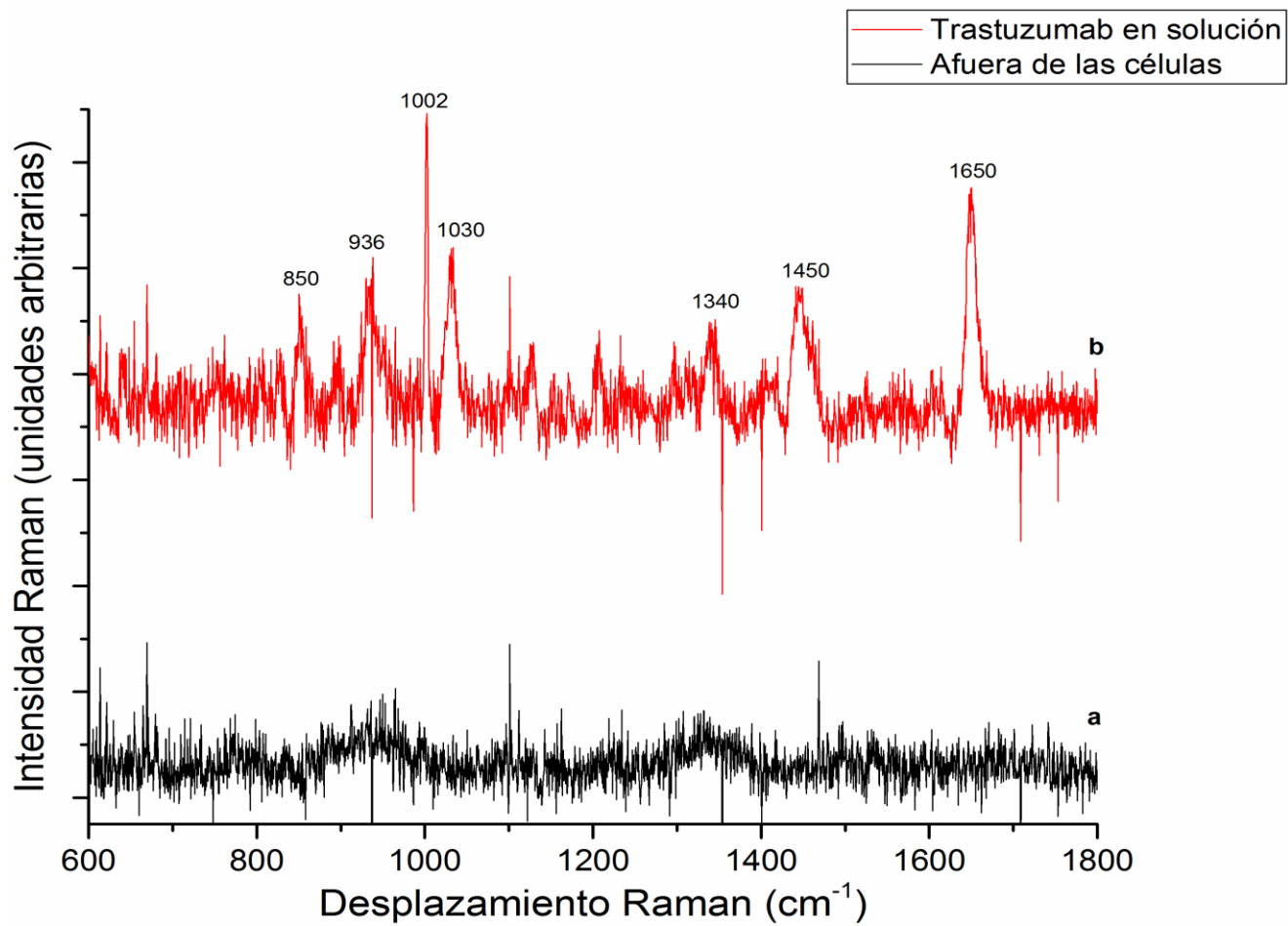


Fig. 39 Espectros Raman de a) afuera de las células y b) trastuzumab en solución a una concentración de 0.1 mg mL^{-1} .

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignamiento Molecular		
	DNA/RNA	Proteínas	Lípidos
620		C-C tw Phe	
642		C-C tw Tyr	
726	A		
757		Trp ring br	
781	U, C, T br (anillo) /O-P-O str bk		
827	O-P-O asym str		
850		Tyr br (anillo aromático)	
936		(C-C)	
948	PO ₄		
1000		Phe sym br (anillo aromático)	
1030		C-H Phe	
1080		C-N str	C-C str (cadena)
1127		C-N str	C-C str (cadena)
1173		C-H Tyr, Phe	
1245		Amida III (Plegamiento β y plegamiento azaroso)	
1320	C	Amida III (hélice α)	
1340	A, G	CH def	
1450		CH def	CH def
1607		C=C Tyr, Phe	
1615		C=C Tyr, Trp	
1654		Amida I (hélice α)	
1668		Amida I (Plegamiento azaroso)	

Tabla 4. Asignamientos Raman a las diferentes células adheridas sobre un sustrato nanoestructurado funcionalizado y sobre un sustrato Au(111) [58-63]. Abreviaciones: (A) adenina, (C) citosina, (G) guanina, (T) tirosina, (O-P-O) fosfato, (br) respiración, (bk) esqueleto, (def) deformación, (tw) giro, (asym) asimétrico, (str) estiramiento.

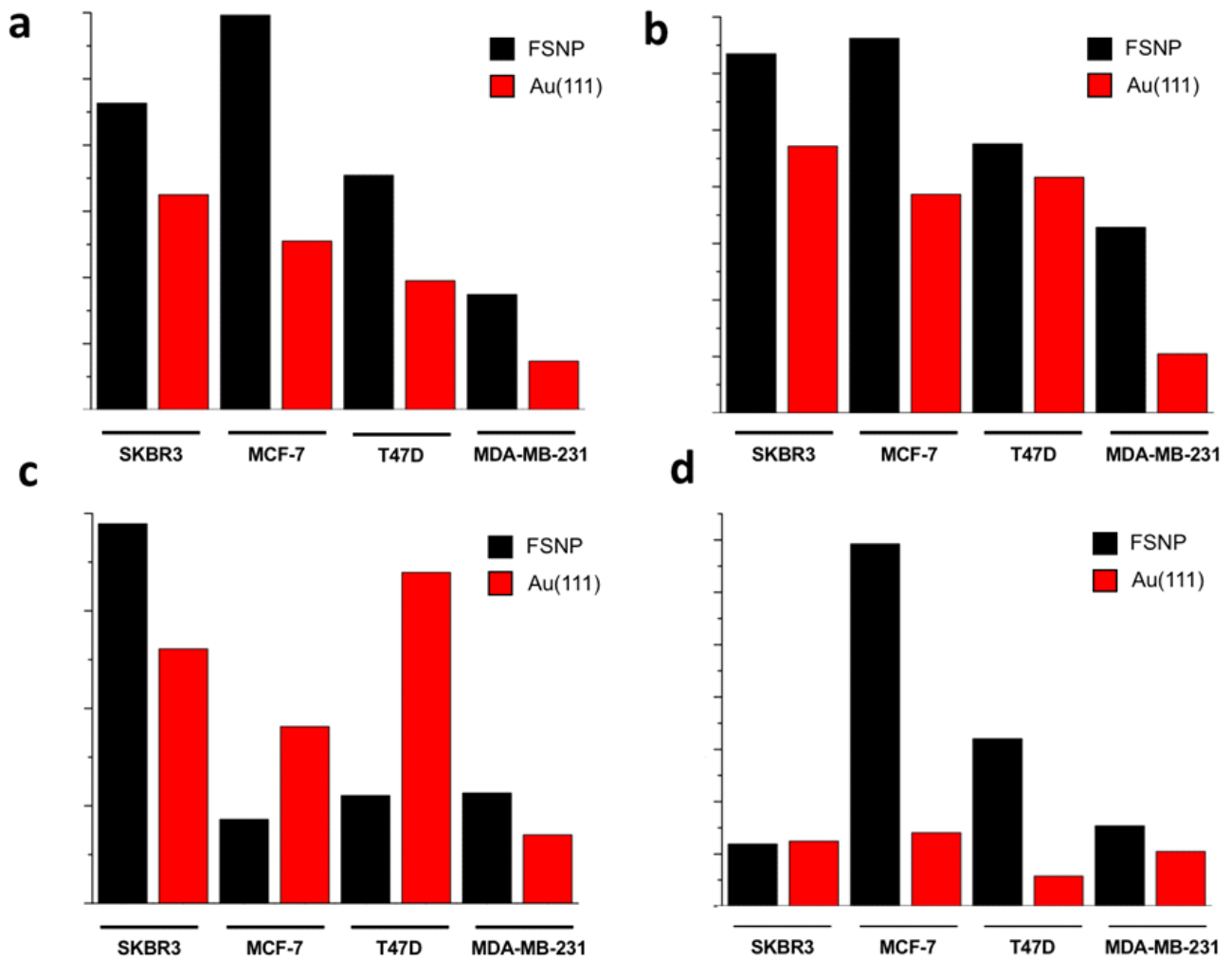


Fig. 40 Intensidades Raman a diferentes desplazamientos Raman: a) 1002 cm⁻¹, b) 1030 cm⁻¹, c) 1667 cm⁻¹, y d) cociente de intensidad Raman 1002 cm⁻¹ / 1667 cm⁻¹ de las diferentes líneas celulares. **Nota:** Las unidades de intensidad Raman son arbitrarias.

2.4.2.3 Caracterización por FTIR

FTIR es una técnica analítica que usa radiación infrarroja (generalmente de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) para identificar el analito bajo estudio por medio de su “huella dactilar” característica. La radiación infrarroja que es absorbida se convierte en energía rotovibracional por las moléculas de la muestra. En este caso particular, con la finalidad de poder comparar la versatilidad de las técnicas espectroscópicas FTIR y espectroscopía Raman, se decidió usar el intervalo desde 600 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} .

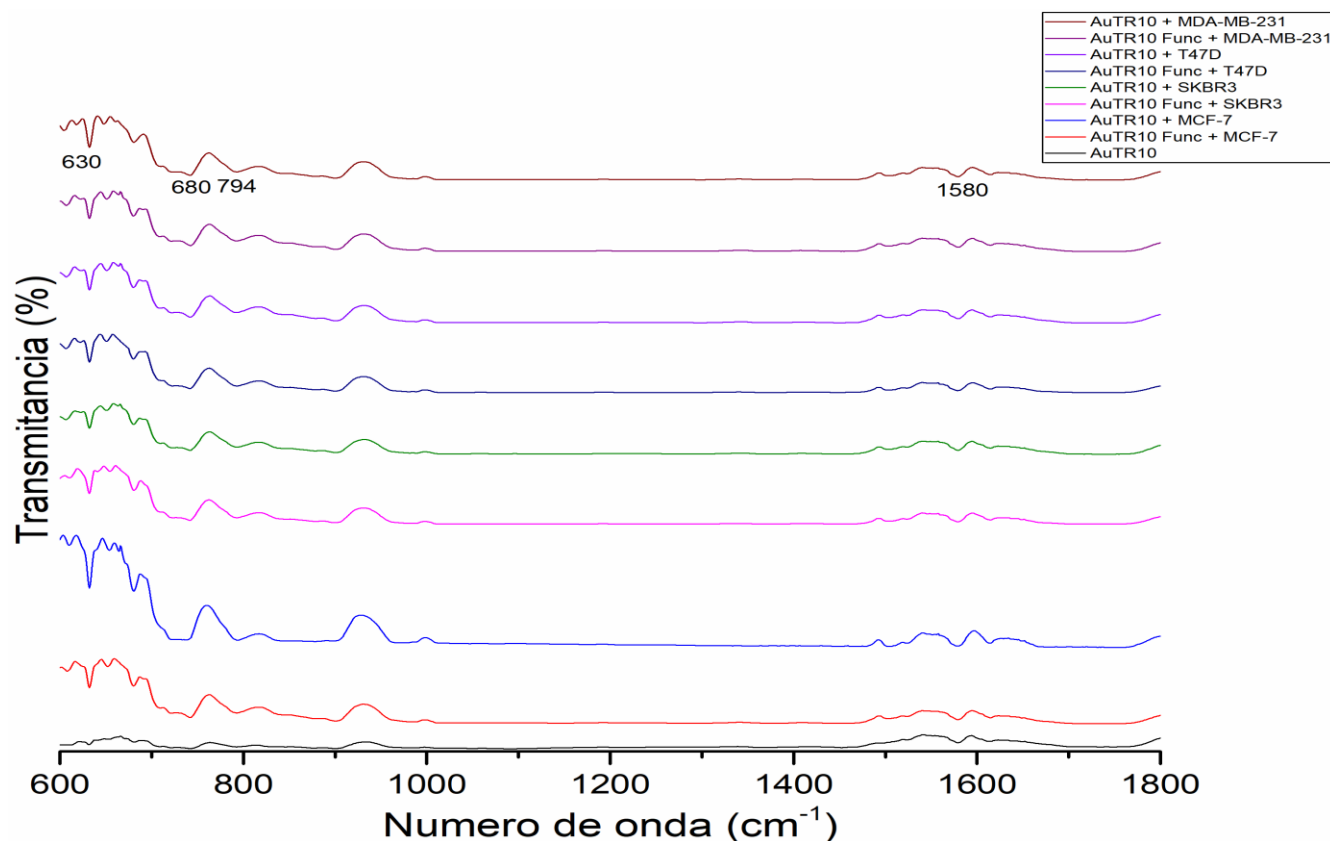


Fig. 41 Espectros de FTIR de las diferentes líneas celulares sobre un sustrato AuTR10 no funcionalizado (control) y un funcionalizado.

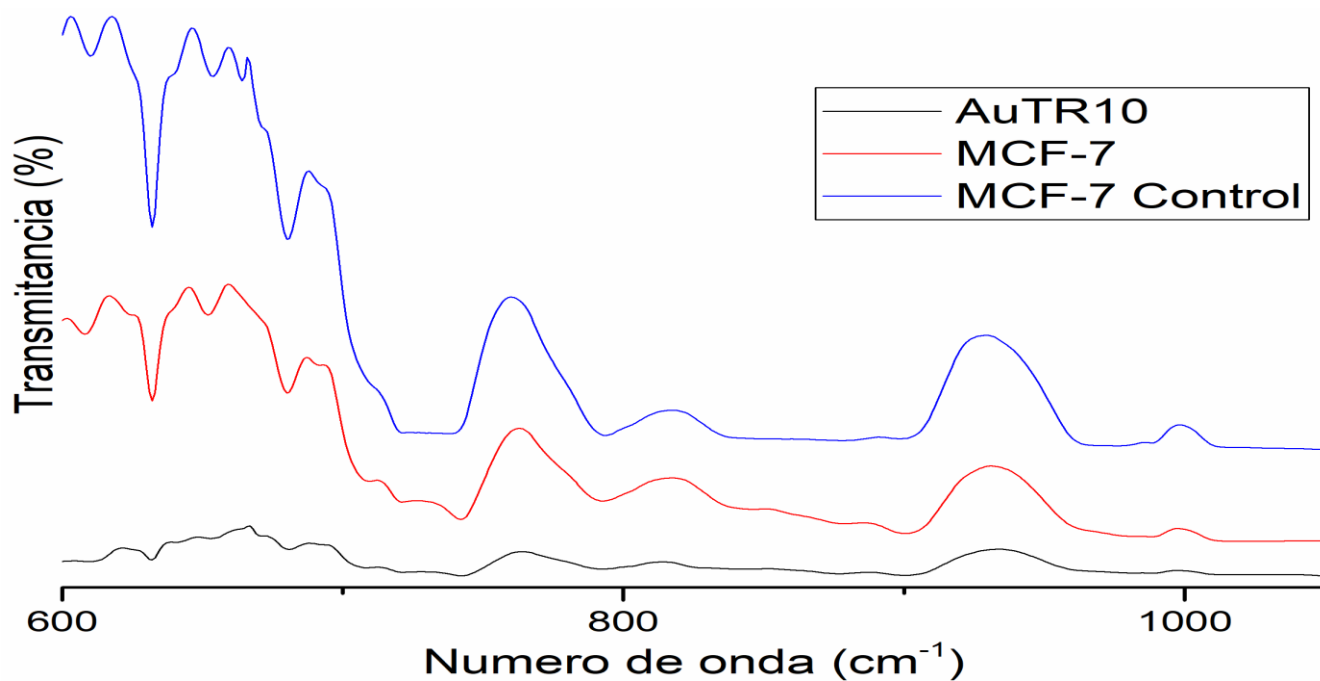


Fig. 42 Espectros de FTIR de células MCF-7 sobre un sustrato AuTR10 no funcionalizado y funcionalizado.

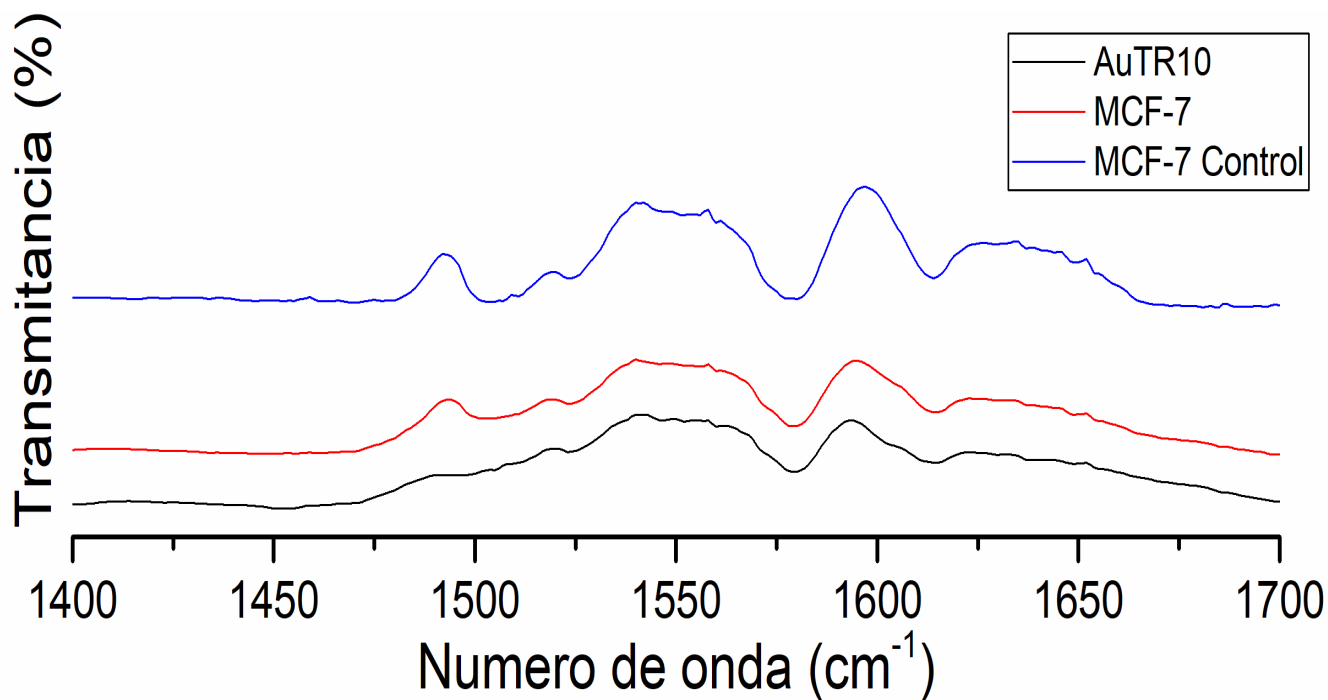


Fig. 43 Espectros de FTIR de células MCF-7 sobre un sustrato AuTR10 no funcionalizado y funcionalizado.

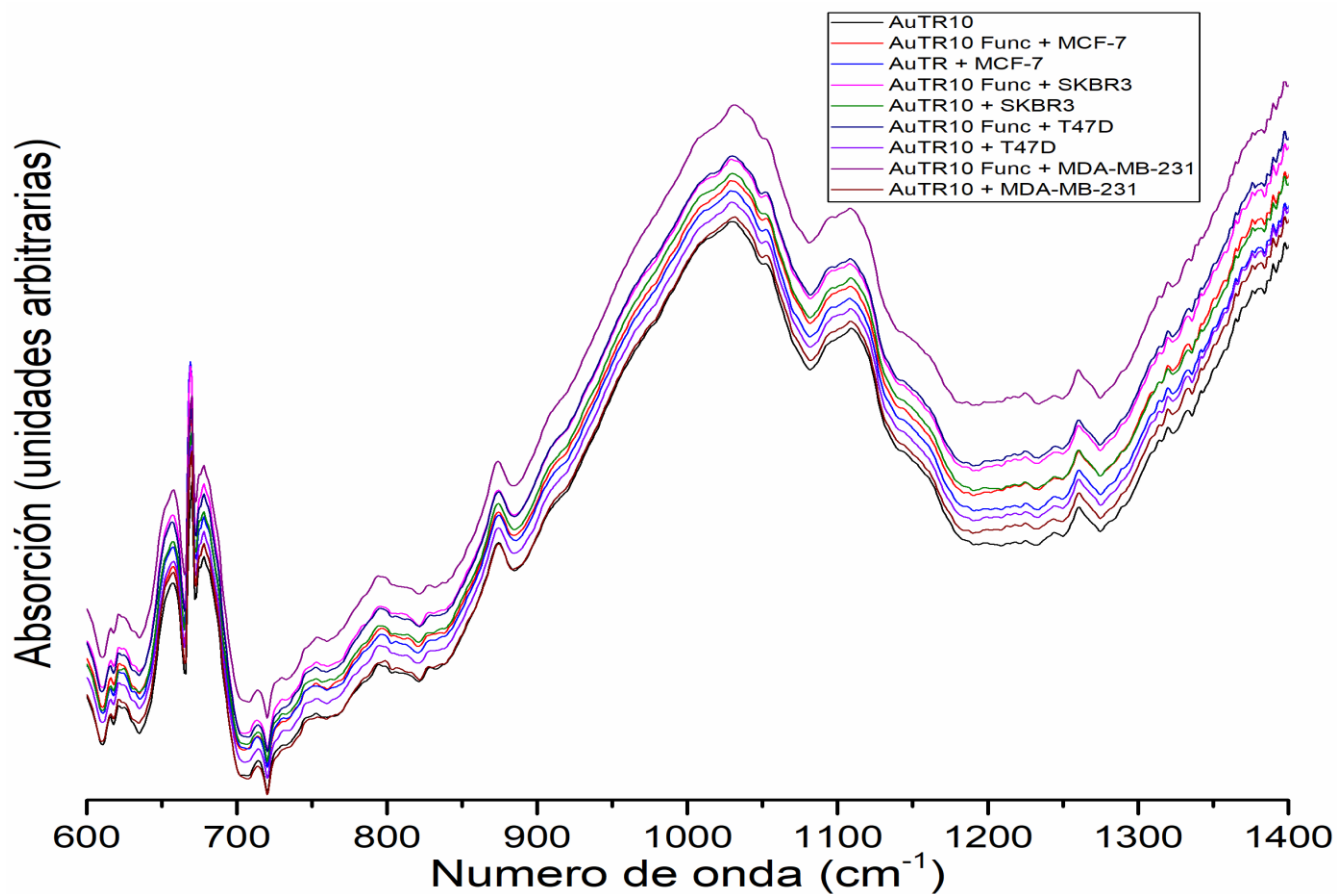


Fig. 44 Espectros FTIR en modo ATR (reflectancia total atenuada) de las diferentes líneas celulares sobre un sustrato AuTR10 no funcionalizado (control) y un funcionalizado.

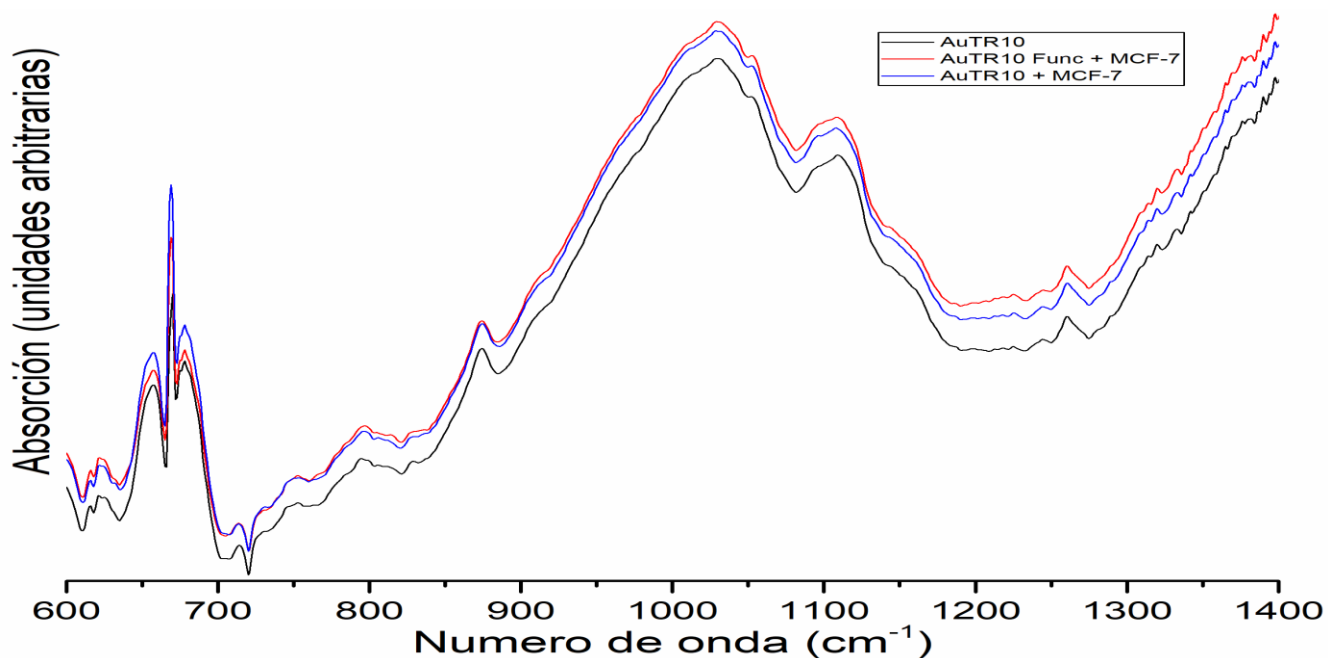


Fig. 45 Espectros FTIR en modo ATR (reflectancia total atenuada) de células MCF-7 sobre un sustrato AuTR10 no funcionalizado y funcionalizado.

2.4.3 Resultados y Discusión

2.4.3.1 Análisis de la visualización celular por microscopía óptica

De las imágenes de Microscopía Óptica (Fig. 32) se puede observar que las células SKBR3 y MCF-7 muestran un núcleo celular muy definido, en cambio, las células T47D muestran que tanto el núcleo como la membrana plasmática se aplanan sobre la superficie nanoestructurada funcionalizada y, por último, las células MDA-MB-231 muestran un núcleo celular abultado y desarrollan extremidades (extensiones citoplasmáticas) para hacer contacto entre sí, es decir, son extremadamente adherentes a cualquier superficie, aunque no se esperaba afinidad hacia la superficie nanoestructurada funcionalizada, debido a que son HER2 negativas. En este punto es importante señalar que en estudios previos se incubaron células de carcinoma de mama sobre un FSNP a tiempos relativamente cortos (de 4 a 6 h de incubación) y en esos experimentos se observó que las células T47D y MDA-MB-231 presentaban una morfología redonda, probablemente por la poca o nula afinidad sobre el FSNP (imágenes no mostradas). Por lo tanto, se decidió establecer en 24 h el tiempo de incubación de las células de carcinoma de mama sobre el FSNP para evitar tanta variabilidad experimental.

2.4.3.2 Análisis por SERS

La Fig. 33 a) muestra el espectro Raman de las monocapas autoensambladas de 4-MBA (4-MBA SAMs) sobre un sustrato nanoestructurado de plata que presenta una densidad de 538 nanoestructuras / μm^2 y un diámetro de 45.0 ± 16.7 nm. Los picos Raman se localizaron a 630 cm^{-1} (C-S), 1075 cm^{-1} (C-H), 1180 cm^{-1} (C-H), 1357 cm^{-1} (COO-) y 1585 cm^{-1} (C=C). Asimismo, la Fig. 33 b) muestra la inmovilización del trastuzumab sobre 4-MBA SAMs (FSNP) y presenta los picos Raman característicos a 864 cm^{-1} (Tyr), 948 cm^{-1} (N-Cs-C), 1064 cm^{-1} y 1139 cm^{-1} (C-C o alquil C-N), 1324 cm^{-1} (Trp, Cs-H) y 1609 cm^{-1} (Tyr, Trp, Phe). Todos los picos fueron asignados de acuerdo a la literatura científica y se resumen en la Tabla 4 [58,59].

Las bandas Raman que son constantes (Fig. 34-37) en los diferentes espectros Raman están a 1002, 1030, 1340, 1450 y 1667 cm^{-1} . Dichas bandas Raman corresponden al anillo aromático de la fenilalanina, C-H de la fenilalanina, C-H de deformación de las proteínas; adenina y guanina, C-H de deformación de las proteínas, y plegamiento aleatorio de la amida I respectivamente.

De los diferentes espectros Raman (Fig. 34-37) se puede observar que el uso de una superficie nanoestructurada funcionalizada mejora el cociente señal ruido inherente a la dispersión Raman normal. Tomando como referencia el pico Raman ubicado a 1002 cm^{-1} , se observa que existe una relación casi lineal en su intensidad Raman. Tanto para la línea celular MCF-7 y SKBR3 (Fig. 34-35) se puede observar que tienen la misma magnitud de intensidad a 1002 cm^{-1} .

Las células T47D muestran un pico Raman único a 948 cm^{-1} (Fig. 36) asociado a la vibración del grupo fosfato de los ácidos nucleicos y tentativamente podría servir para discriminar a esta línea de carcinoma de mama de las demás. Se sabe que las células T47D muestran el receptor HER2 distribuido principalmente en el citoplasma y el núcleo por lo que hace a estas células muy agresivas, ya que la terapia de anticuerpo monoclonal humanizado, trastuzumab, sólo actúa sobre los receptores HER2 superficiales.

En las líneas celulares SKBR3, MCF-7 y T47D (Fig. 34-36) se observa la activación de bandas Raman a 1601 cm^{-1} y 1615 cm^{-1} asociadas a la vibración C=C de los anillos aromáticos de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. La línea celular SKBR3 presenta la activación de bandas Raman a 641 cm^{-1} , 780 cm^{-1} , 850 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} y 1320 cm^{-1} asociadas a las vibraciones de C-C de la tirosina, ácidos nucleicos, anillo de respiración de la tirosina, amida III (plegamiento β y plegamiento azaroso) y amida III (hélice α), respectivamente. Estas bandas Raman son distintivas para la línea celular SKBR3 bajo nuestro estudio particular. Para un mejor análisis visual, los diferentes espectros Raman de las cuatro líneas celulares de carcinoma de mama analizadas en el presente trabajo se muestran en la Fig. 38.

La Fig. 39 a) muestra que el espectro Raman fuera de una célula (sobre la superficie nanoestructurada) presenta un cociente señal ruido muy bajo, ya que no se pueden distinguir ninguna banda Raman apreciable y la Fig. 39 b) muestra las bandas Raman características del trastuzumab en solución.

Del análisis de las intensidades Raman (Fig. 40) se puede observar que existe una correlación similar a la encontrada por CLSM. En caso de la dispersión Raman, se sabe que la intensidad de señal es directamente proporcional a la concentración del analito bajo estudio. Dado que no se puede cuantificar la concentración de HER2, se asume que la técnica es semicuantitativa y adecuada para la detección de receptores superficiales HER2 expresados de forma diferencial en las diferentes líneas celulares analizadas.

Por lo tanto, los resultados encontrados por SERS están de acuerdo con los resultados encontrados por CLSM ya que, a mayor grado de expresión diferencial de HER2, mayor intensidad Raman. En consecuencia, se asume que existe una correlación parecida entre los resultados de SERS y los resultados por CLSM en la discriminación de las diferentes líneas celulares con base en la expresión diferencial del receptor HER2. Por lo que, la combinación de SERS y el uso de un FSNP aportan otra herramienta de discriminación de células de carcinoma de mama que expresan HER2 de manera diferencial y podría ser complementaria a la técnica de CLSM. Todos los espectros Raman fueron realizados sobre los núcleos de las diferentes líneas celulares analizadas y adicionalmente se les corrigió la línea base a través del algoritmo airPLS [64].

2.4.3.3 Análisis por FTIR

Se decidió comparar el sustrato preparado por PLD en el Laboratorio de Fisicoquímica de Nanoestructuras del Departamento de Física de la UAM-I *versus* el sustrato serigrafiado comercial AuTR10 (electrodo de oro ópticamente transparente) de la compañía DropSens (Asturias, España). Esto se hizo con la finalidad de demostrar la versatilidad del sustrato preparapo por PLD.

Dado que los electrodos serigrafiados AuTR10 se comercializan como sustratos transparentes de oro, se supuso que serían aptos para ser analizados por FTIR, por lo tanto, se procedió a funcionalizarlos siguiendo el protocolo ya mencionado, se depositaron diferentes líneas celulares de carcinoma de mama, se dejaron incubar durante 24 horas con suficiente medio de cultivo, se fijaron por un tren de alcohol etílico (deshidratación gradual) y finalmente se analizaron por FTIR y Reflectancia Total Atenuada (ATR).

Aunque FTIR se considera una técnica adecuada para caracterizar muestras transparentes, el electrodo comercial AuTR10 no permitió que las muestras fueran analizadas por esta técnica espectroscópica, debido a que el plástico que está debajo de la película o cubierta de oro del electrodo era el que absorbía predominantemente a esos intervalos de números de onda, debido a que los espectros de FTIR (Fig. 41-45), tanto de las muestras como de sus respectivos controles (superficie no funcionalizada con trastuzumab) son muy similares a lo largo del número de onda de barrido ($600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), por lo tanto, se concluye que el electrodo AuTR10 es el que principalmente absorbe esos intervalos de números de onda y por ende no es un buen sustrato para la identificación de la heterogeneidad de HER2, ya que sus espectros no muestran diferencias espectroscópicas apreciables para poder discriminar entre una muestra y su control.

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se comprobó que el uso de un FSNP, en comparación con una superficie plana, Au(111), incrementó la sensibilidad para la identificación de HER2 por medio de SERS.

En general, las tendencias del efecto SERS con la placa FSNP y Au(111) son muy similares; sin embargo, en el caso de FSNP, la señal está muy bien definida e intensa y tiene un cociente señal/ruido de más alta proporción. Por lo tanto, creemos que el FSNP es una mejor opción para SERS que la placa Au(111) para identificar la heterogeneidad de HER2 en las diferentes células de carcinoma de mama analizadas en el presente trabajo.

El análisis de picos SERS muestra que las líneas celulares con mayor expresión de HER2 (SKBR3 y MCF-7) presentan mayor intensidad Raman a 1002 cm^{-1} que T47D y MDA-MB-231, es decir, se encontró que existe cierta correlación entre las dos técnicas usadas: CLSM y SERS; por lo que se puede asumir que la señal SERS más intensa se debe probablemente, al acoplamiento entre el FSNP y los receptores HER2 diferencialmente expresados en las diferentes líneas celulares de carcinoma de mama analizadas en el presente trabajo.

La combinación de la técnica espectroscópica SERS y el uso de un FSNP podrían complementar a las técnicas convencionales para la identificación de HER2 en células de carcinoma de mama. Por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos, se propone una nueva plataforma capaz de reconocer con alta selectividad y sensibilidad células de cáncer de mama con expresión diferencial de HER2 mediante el uso de un FSNP con la técnica SERS. Esta plataforma podría usarse para células con diferentes niveles de expresión de HER2 y se basa principalmente en la identificación del pico Raman más prominente a 1002 cm^{-1} , que está asociado con el residuo de aminoácido fenilalanina.

En cuanto a las perspectivas, una posible aplicación a mediano plazo podría ser la implantación de células MCF-7 en un modelo murino, extraerle sangre periférica e intentar identificar la presencia de células tumorales circulantes a través del FSNP.

Adicionalmente, la metodología diseñada también podría adecuarse para identificar otros biomarcadores moleculares (e.g. MUC1, EpCAM) implicados en el desarrollo del cáncer de mama. Por ejemplo, MUC1 y MUC3 se han propuesto como potenciales indicadores de prognosis, siendo MUC1 el que presenta la mayor correlación [65]. MUC1 está aberrantemente sobreexpresado en casi 90% de casos de cáncer de mama triple negativos y su sobreexpresión está fuertemente asociada con la quimioresistencia en cáncer de mama [66-68].

4. REFERENCIAS

- [1] Sørlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J. C.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* **2001**, 98(19), 10869-10874.
- [2] Baselga, J.; Swain, S.M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9(7), 463–475.
- [3] Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* **2004**, 5(3), 207–213.
- [4] Sliwkowski, M.X. Diseases of the Breast, 3rd. Ed.; Harris, J.R.; Lippman, M.E.; Morrow, M.; Osborne, C.K. (Eds.); Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2004**, 415-426.
- [5] Graus-Porta, D.; Beerli, R. R.; Daly, J. M.; Hynes, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **1997**, 16(7), 1647–1655.
- [6] Ménard, S.; Tagliabue, E.; Campiglio, M.; Pupa, S. M. Role of HER2 Gene Overexpression in Breast Carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **2000**, 182, 150–162.
- [7] English, D. P.; Roque, D. M.; Santin, A. D. HER2 expression beyond breast cancer: therapeutic implications for gynecologic malignancies. *Mol. Diagn. Ther.* **2013**, 17(2), 85–99.
- [8] Ferguson, K. M.; Berger, M. B.; Mendrola, J. M.; Cho, H. S.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **2003**, 11(2), 507–517.
- [9] Li, E.; Hristova, K. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adh. Migr.* **2010**, 4(2), 249–254.
- [10] Clementi, F.; Fumagalli, G. (Eds.). General and Molecular pharmacology: Principles of drug action. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; **2015**, 202-205.
- [11] Cho, H. S.; Mason, K.; Ramyar, K. X.; Stanley, A. M.; Gabelli, S. B.; Denney, D. W. Jr.; Leahy, D. J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **2003**, 421(6924), 756–760.
- [12] Eladdadi, A.; Isaacson, D. A Mathematical Model for the Effects of HER2 Over-Expression on Cell Cycle Progression in Breast Cancer. *Bull. Math. Biol.* **2011**, 73 (12), 2865–2887.
- [13] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30(3), 489–511.

- [14] Ju, H.; Zhang, X.; Wang, J. (Eds.). *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*. New York: Springer-Verlag; **2011**, 425-426.
- [15] Chandra, P.; Noh, H.B.; Pallela, R.; Shim, Y.B. Ultrasensitive detection of drug resistant cancer cells in biological matrixes using an amperometric nanobiosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 418–425.
- [16] Pallela, R.; Chandra, P.; Noh, H.B.; Shim, Y.B. An amperometric nanobiosensor using a biocompatible conjugate for early detection of metastatic cancer cells in biological fluid. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 883–890.
- [17] Soler, M.; Estevez, M.C.; Villar-Vazquez, R.; Casal, J. I.; Lechuga, L. M. Label-free nanoplasmonic sensing of tumor-associate autoantibodies for early diagnosis of colorectal cancer. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *930*, 31–38.
- [18] Gajria, D.; Chandarlapaty, S. Therapy HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2014**, *11*(2), 263-275.
- [19] Lee, J.; Yang, J.; Seo, S.B.; Ko, H.J.; Suh, J.S.; Huh, Y.M.; Haam, S. Smart nanoprobe for ultrasensitive detection of breast cancer via magnetic resonance imaging. *Nanotechnology* **2008**, *19*(48), 485101.
- [20] Michalska, M.; Florczak, A.; Dams-koźłowska, H.; Gapinski, J.; Jurga, S.; Schneider, R. Peptide-functionalized ZCIS QDs as fluorescent nanoprobe for targeted HER2-positive breast cancer cells imaging. *Acta Biomater.* **2016**, *35*, 293–304.
- [21] Yang, H.M.; Park, C.W.; Woo, M.A.; Kim, M.I.; Jo, Y.M.; Park, H.G.; Kim, J.D. HER2/neu Antibody Conjugated Poly(amino acid)-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Breast Cancer MR Imaging. *Biomacromolecules* **2010**, *11*(11), 2866–2872.
- [22] Zeng, L.; Pan, Y.; Zou, R.; Zhang, J.; Tian, Y.; Teng, Z.; Wang, S.; Ren, W.; Xiao, X.; Zhang, J.; Zhang, L.; Li, A.; Wu, A. 808 nm-excited upconversion nanoprobe with low heating effect for targeted magnetic resonance imaging and high-efficacy photodynamic therapy in HER2-overexpressed breast cancer. *Biomaterials* **2016**, *103*, 116–127.
- [23] Yang, J.; Wang, Z.; Zong, S.; Song, C.; Zhang, R.; Cui, Y. Distinguishing breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*(3), 1093-1100.
- [24] American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: *American Cancer Society*; **2015**.
- [25] Hathaway, H.J.; Butler, K.S.; Adolphi, N.L.; Lovato, D.M.; Belfon, R.; Fegan, D.; Monson, T.C.; Trujillo, J.E.; Tessier, T.E.; Bryant, H.C.; Huber, D.L.; Larson, R.S.; Flynn, E.R. Detection of breast cancer cells using targeted magnetic nanoparticles and ultra-sensitive magnetic field sensors. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*(5), R108.

- [26] Téllez Plancarte, A. (2014). Funcionalización de sustratos nanoestructurados para el desarrollo de un biosensor basado en la interacción anticuerpo-antígeno en células de carcinoma de mama (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado el 3 de septiembre de 2018, de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatatesis.php?recno=16553&docs=UAMI16553.pdf>
- [27] Fischer, M.J.E. Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In *Surface Plasmon Resonance; Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; De Mol, N.J., Fischer, M.J.E., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Volume 627.
- [28] Stampleskoskie, K.G.; Scaiano, J.C.; Tiwari, V.S.; Anis, H. Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, 1403–1409.
- [29] Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988, 10, 128–138.
- [30] White, J.G.; Amos, W.B.; Fordham, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* 1987, 105(1), 41–48.
- [31] Jonkman, J.; Brown, C.M. Any way you slice it. A comparison of confocal microscopy techniques. *J. Biomol. Tech.* 2015, 26(2), 54-65.
- [32] Denk, W.; Strickler, J.H.; Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990, 248(4951), 73–76.
- [33] Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egnér, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *PNAS* 2000, 97(15), 8206–8210.
- [34] Claxton, N.S.; Fellers, T.J.; Davidson, M.W. *Microscopy, Confocal*. Encyclopedia of medical devices and instrumentation, 2nd. Ed., John Wiley & Sons, 2006.
- [35] Guilbault, G. General aspects of luminescence spectroscopy. In *Practical Fluorescence*, 2nd Ed.; Guilbault, G. (Ed.); New York: Dekker, 1990; 1-40.
- [36] Atkins, P. W. Spectroscopy 2: electronic transitions. In *Physical Chemistry*, 5th Ed.; Oxford: Oxford University Press, 1994; 590–622.
- [37] Semwogerere, D.; Weeks, E.R. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering Confocal Microscopy*. Wnek, G.E.; Bowlin, G.L. (Eds.); New York: Informa Healthcare USA, 2005.
- [38] Murray, J.M. Methods for imaging thick specimens: confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, 2011(12), 1399-1437.

- [39] Johnson, D. How to Do Everything: Digital Camera. New York: McGraw Hill Professional, **2008**; 33.
- [40] Ray, S. F. Applied Photographic Optics, 3rd. Ed.; Focal Press: Oxford, **2002**; 231-232.
- [41] Greb, C. (2012). Basic principles of luminescence. Recuperado el 3 de septiembre de 2018, de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/basic-principles-of-luminescence/>
- [42] AZoOptics, (2014). Confocal microscopy - Applications and benefits. Recuperado el 3 de septiembre de 2018, de <https://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=653>
- [43] Colton, R.J.; Engel, A.; Frommer, J.E.; Gaub, H.E.; Gewirth, A.A.; Guckenberger, R.; Rabe, J.; Heckl, W.M.; Parkinson, B. Procedures in Scanning Probe Microscopies. Chichester: Wiley & Sons; **1998**, 607.
- [44] Band, L.E. Spatial aggregation of complex terrain. *Geographical Analysis* **1989**, 2(4), 279-293.
- [45] Páramo García, U. (2001). Preparación y caracterización de películas de PPy en electrodos de carbón para la reducción de cromo hexavalente en medio acuoso: estudio electroquímico y por AFM. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.
- [46] Chavez, K.J.; Garimella, S.V.; Lipkowitz, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* **2010**, 32(1-2), 35-38.
- [47] Béguelin, W.; Díaz Flaqué, M.C.; Proietti, C.J.; Cayrol, F.; Rivas, M.A.; Tkach, M.; Rosembli, C.; Tocci, J.M.; Charreau, E.H.; Schillaci, R.; Elizalde, P.V. Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol. Cell Biol.* **2010**, 30(23), 5456–5472.
- [48] Cordo Russo, R.I.; Béguelin, W.; Díaz Flaqué, M.C.; Proietti, C.J.; Venturutti, L.; Galigniana, N.; Tkach, M.; Guzmán, P.; Roa, J.C.; O'Brien, N.A.; Charreau, E.H.; Schillaci, R.; Elizalde, P.V. Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance. *Oncogene* **2015**, 34(26), 3413-3428.
- [49] Hsu, S.C.; Hung, M.C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282(14), 10432–10440.
- [50] Li, L.Y.; Chen, H.; Hsieh, Y.H.; Wang, Y.N.; Chu, H.J.; Chen, Y.H.; Chen, H.Y.; Chien, P.J.; Ma, H.T.; Tsai, H.C.; Lai, C.C.; Sher, Y.P.; Lien, H.C.; Tsai, C.H.; Hung, M.C. Nuclear ErbB-2 enhances translation and cell growth by activating transcription of rRNA genes. *Cancer Res.* **2011**, 71(12), 4269–4279.
- [51] Xie, Y.; Hung, M.C. Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 203(3), 1589–1598.

- [52] Wang, S.C.; Lien, H.C.; Xia, W.; Chen, I.F.; Lo, H.W.; Wang, Z.; Ali-Seyed, M.; Lee, D.F.; Bartholomeusz, G.; Ou-Yang, F.; Giri, D.K.; Hung, M.C. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 251–261.
- [53] Wilson, K.S.; Roberts, H.; Leek, R.; Harris, A.L.; Geradts, J. Differential gene expression patterns in HER2/*neu*-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1171–1185.
- [54] Emde, A.; Mahlknecht, G.; Maslak, K.; Ribba, B.; Sela, M.; Possinger, K.; Yarden, Y. Simultaneous inhibition of estrogen receptor and the HER2 pathway in breast cancer: Effects of HER2 abundance. *Transl. Oncol.* **2011**, *4*, 293–300.
- [55] Etti, I.C.; Abdullah, R.; Kadir, A.; Hashim, N.M.; Yeap, S.K.; Imam, M.U.; Ramli, F.; Malami, I.; Lam, K.L.; Etti, U.; et al. The molecular mechanism of the anticancer effect of artonin E in MDA-MB 231 triple negative breast cancer cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182357.
- [56] Lara-Cruz, C.; Jiménez-Salazar, J.E.; Ramón-Gallegos, E.; Damian-Matsumura, P.; Batina, N. Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 5149-5161.
- [57] Moore, T.J.; Moody, A.S.; Payne, T.D.; Sarabia, G.M.; Daniel, A.R.; Sharma, B. In vitro and in vivo SERS biosensing for disease diagnosis. *Biosensors* **2018**, *8*(2), 46.
- [58] Michota, A.; Bukowska, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 21–25.
- [59] Ma, W.Q.; Fang, Y.; Hao, G.L.; Wang, W.G. Adsorption behaviors of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold films. *Chin. J. Chem. Phys.* **2010**, *23*, 659–663.
- [60] Chen, Y.; Dai, J.; Zhou, X.; Liu, Y.; Zhang, W.; Peng, G. Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. *PLoS One* **2014**, *9*(4), e93906.
- [61] Managò, S.; Valente C.; Mirabelli, P.; Circolo D.; Basile, F.; Corda, D.; De Luca, A.C. A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24821.
- [62] Matthews, Q.; Jirasek, A.; Lum, J.; Duan, X.; Brolo, A.G. Variability in Raman Spectra of Single Human Tumor Cells Cultured in Vitro: Correlation with Cell Cycle and Culture Confluency. *Appl. Spectrosc.* **2010**, *64*(8), 871-887.
- [63] Smith, S.J.; Emery, R.; Pitsillides, A.; Clarkin, C.E.; Mahajan, S. Detection of early osteogenic commitment in primary cells using Raman spectroscopy. *Analyst* **2017**, *142*, 1962-1973.
- [64] Zhang, Z.M.; Chen, S.; Liang, Y.Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst* **2010**, *135*(5), 1138-1146.

- [65] Rakha, E. A.; Boyce, R. W. G.; El-Rehim, D. A.; Kurien, T.; Green, A. R.; Paish, E. C.; Robertson, J. F. R.; O Ellis, I. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod. Pathol.* **2005**, *18*, 1295–1304.
- [66] Schroeder, J. A.; Adriance, M. C.; Thompson, M. C.; Camenisch, T. D.; Gendler, S. J. MUC1 Alters β -catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene* **2003**, *22*, 1324–1332.
- [67] Spicer, A. P.; Rowse, G. J.; Lidner, T. K.; Gendler, S. J. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (50), 30093–30101.
- [68] Takano, M.; Fujii, K.; Kita, T.; Kikuchi, Y.; Uchida, K. Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **2004**, *12*(6), 1177-1182.

5. APÉNDICE

La presente sección es una continuación del punto 2.3.2.4 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). La información cualitativa y cuantitativa obtenida de las presentes imágenes de AFM fueron consideradas en el texto.

Células SKBR3 adheridas sobre un FSNP

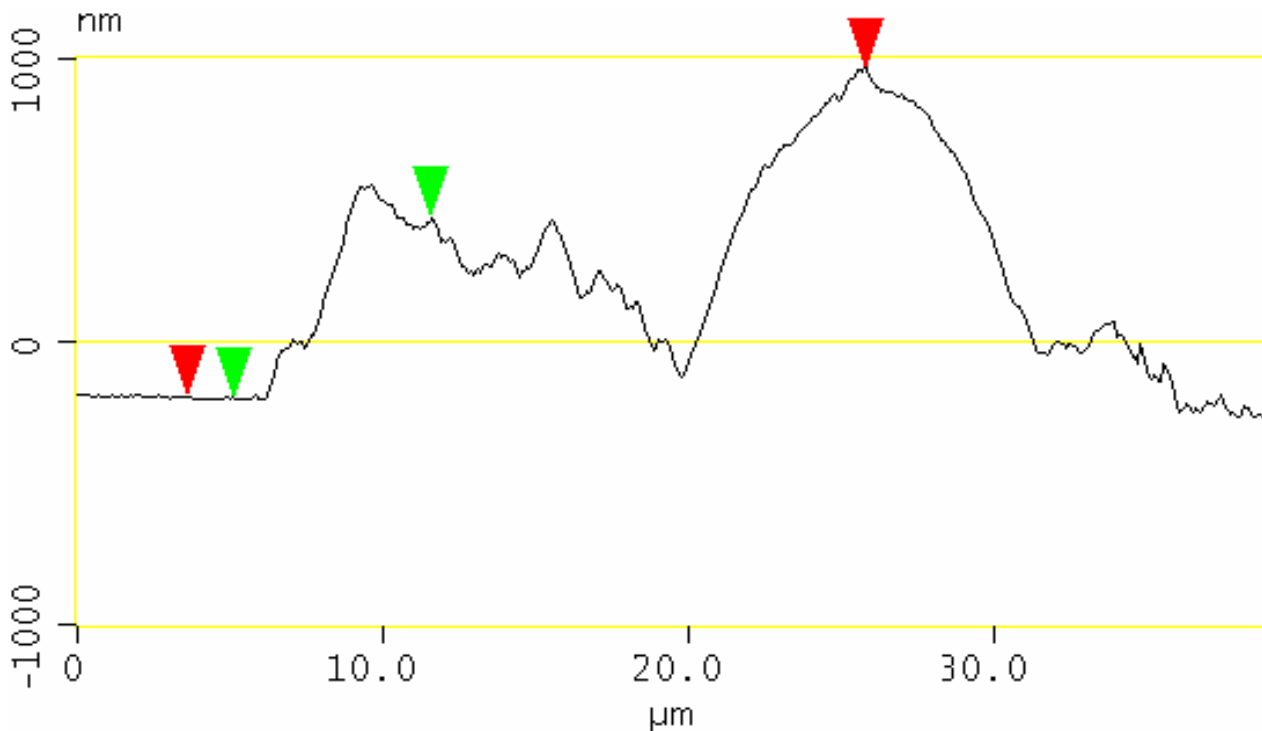


Fig. 21 c) Corte transversal sobre una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP.

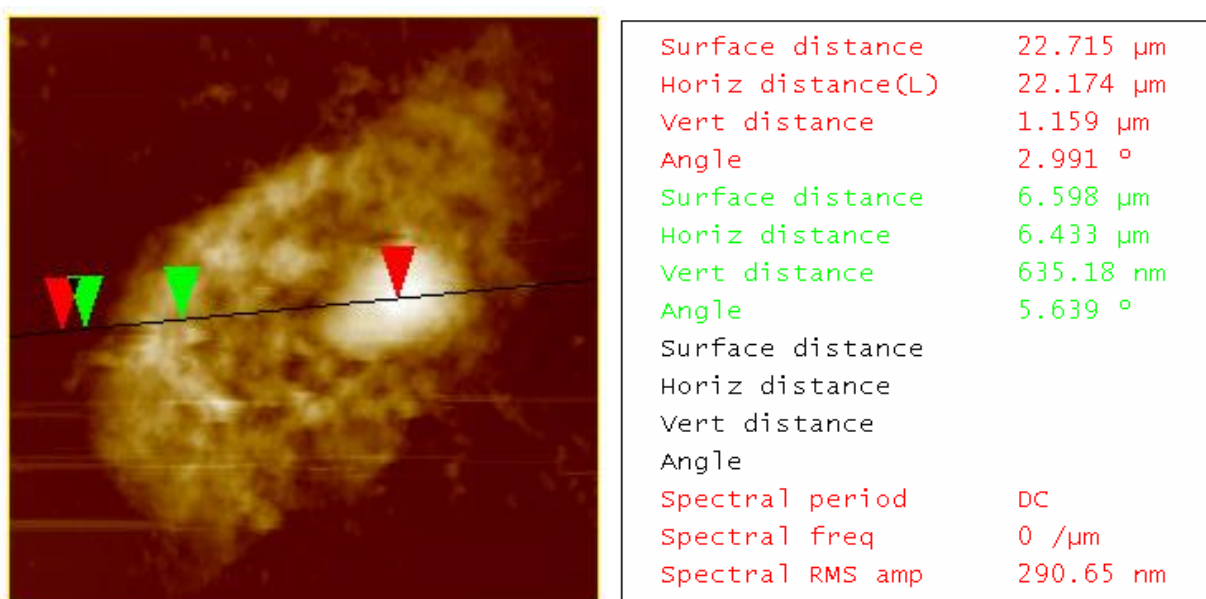


Fig. 21 d) Corte transversal sobre una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP.

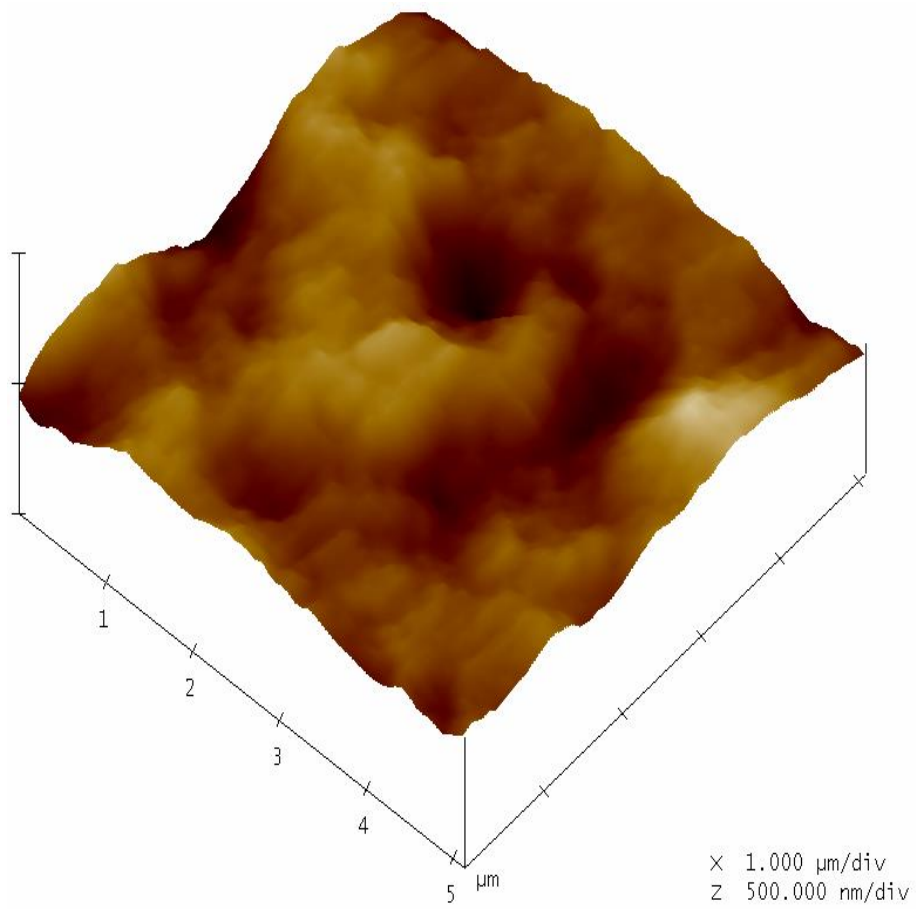


Fig. 21 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula SKBR3 adherida sobre un FSNP.

Células SKBR3 adheridas sobre un sustrato Au(111)

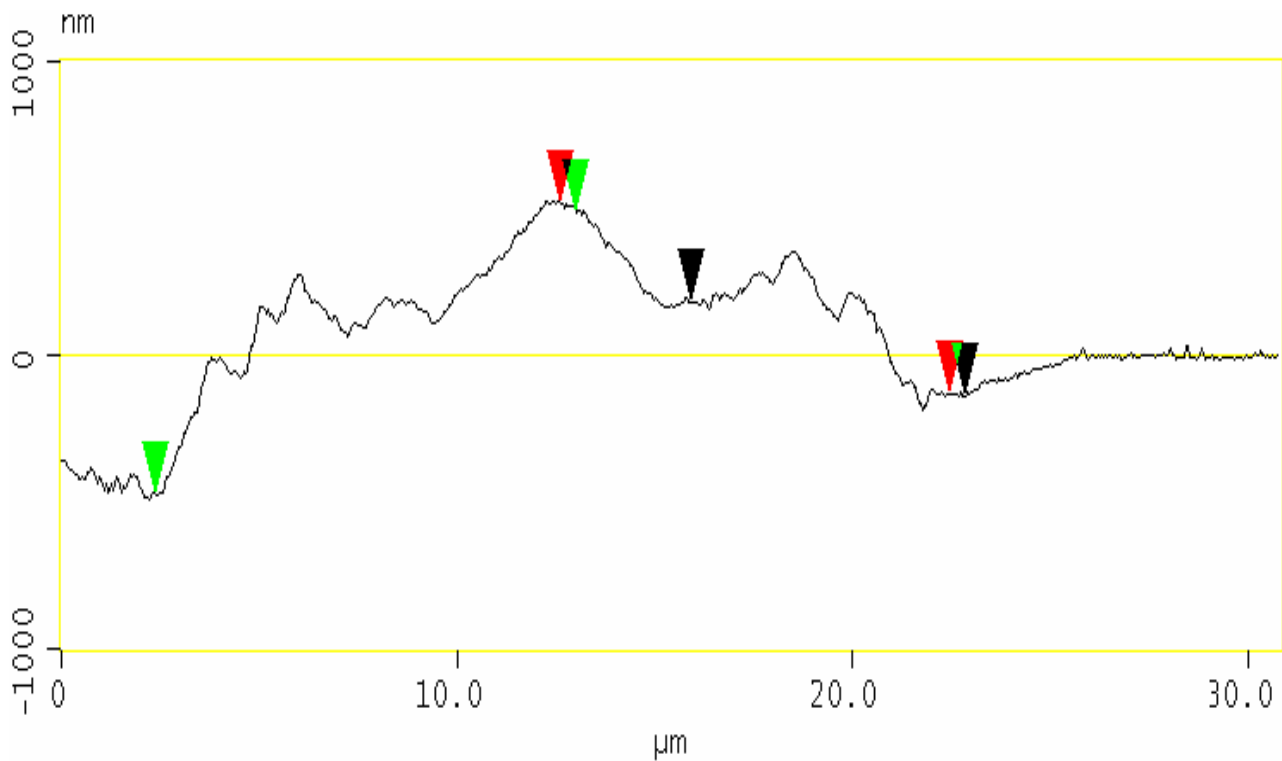


Fig. 22 c) Corte transversal sobre una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

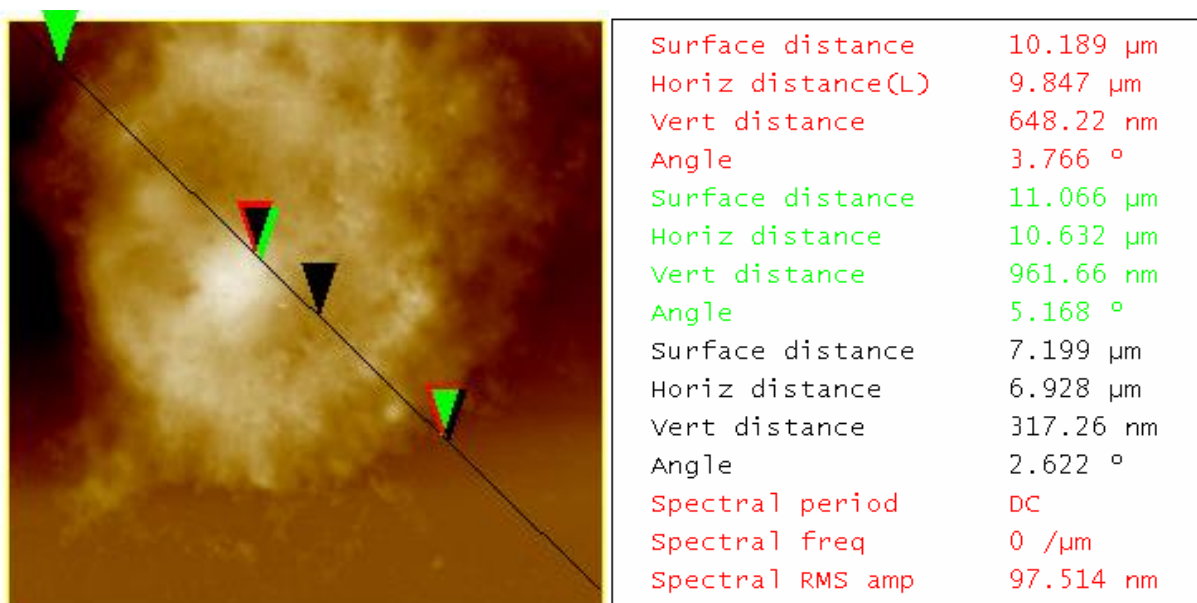


Fig. 22 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

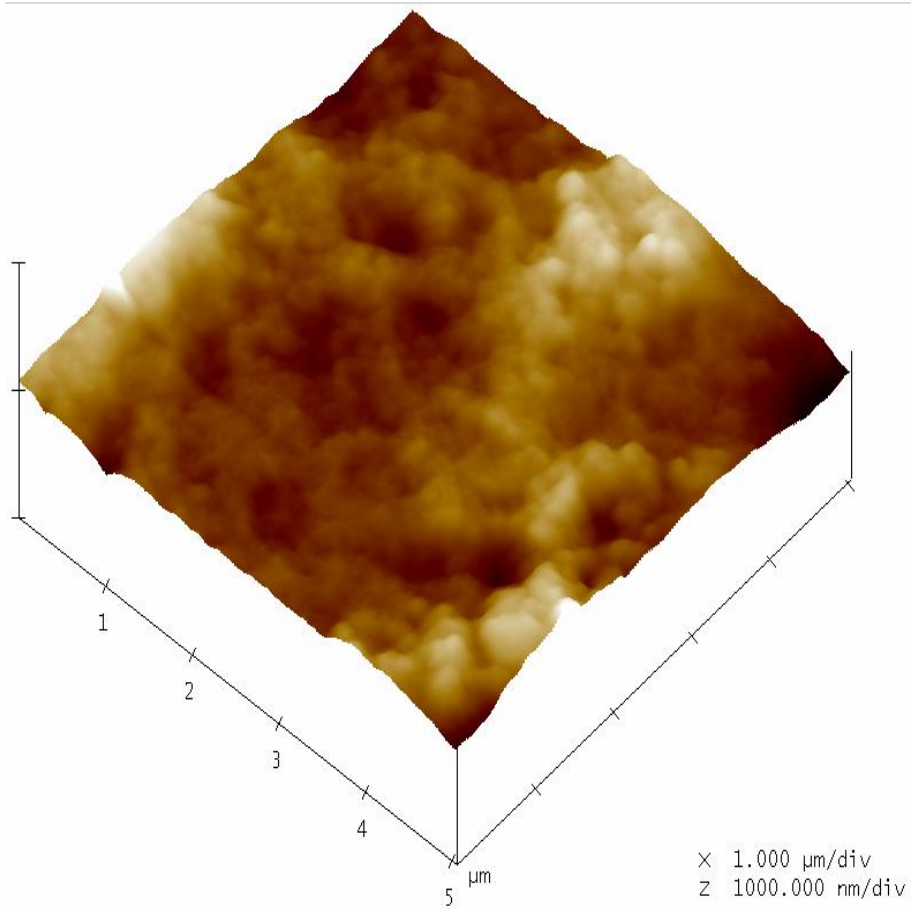


Fig. 22 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula SKBR3 adherida sobre un sustrato Au(111).

Células MCF-7 adheridas sobre un FSNP

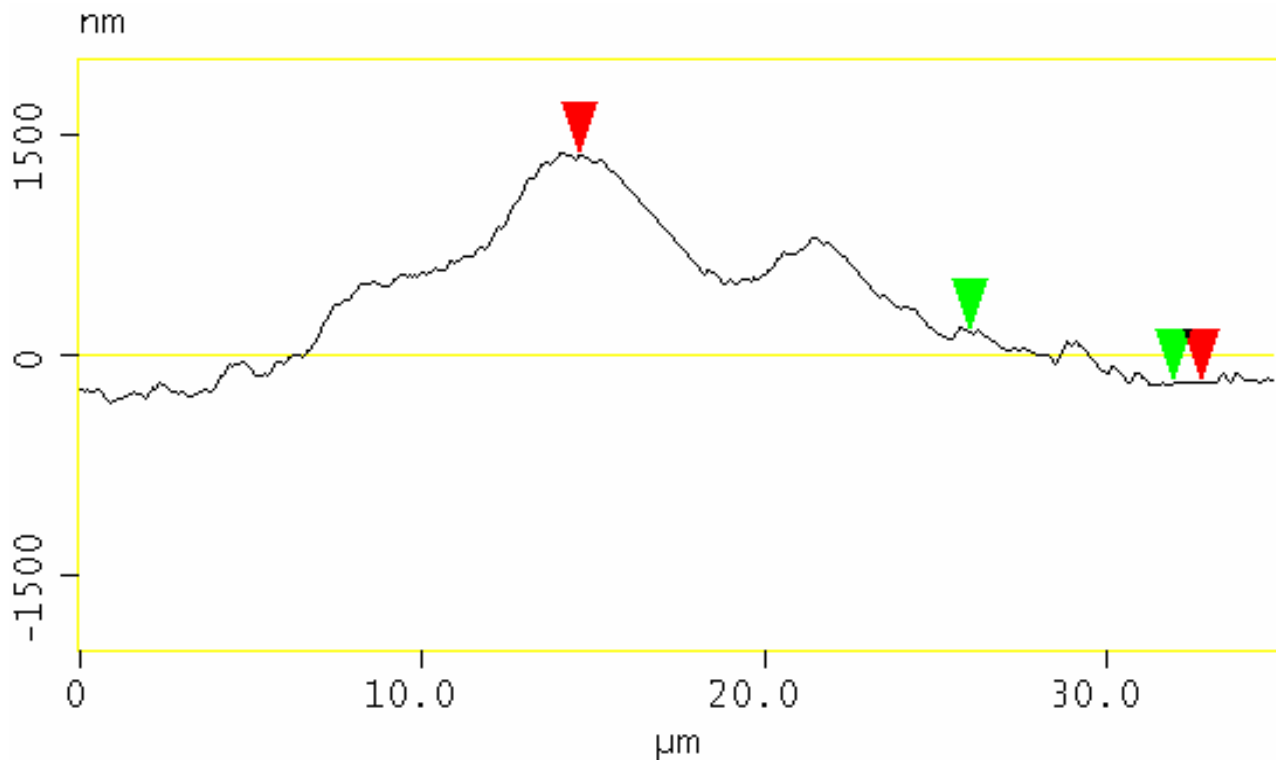


Fig. 23 c) Corte transversal sobre una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP.

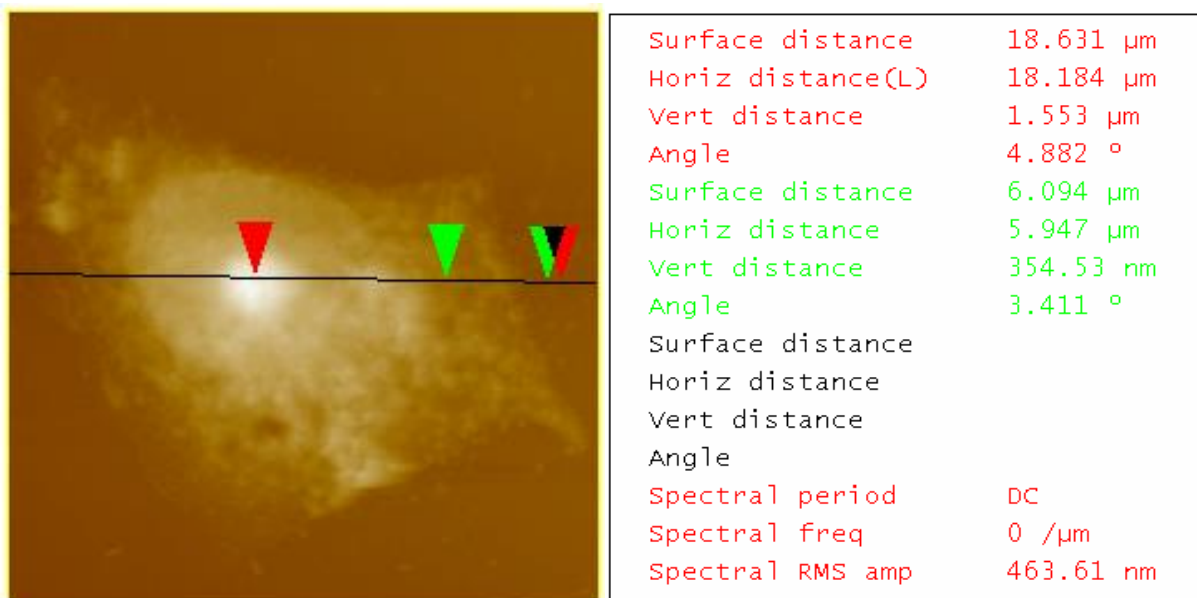


Fig. 23 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP.

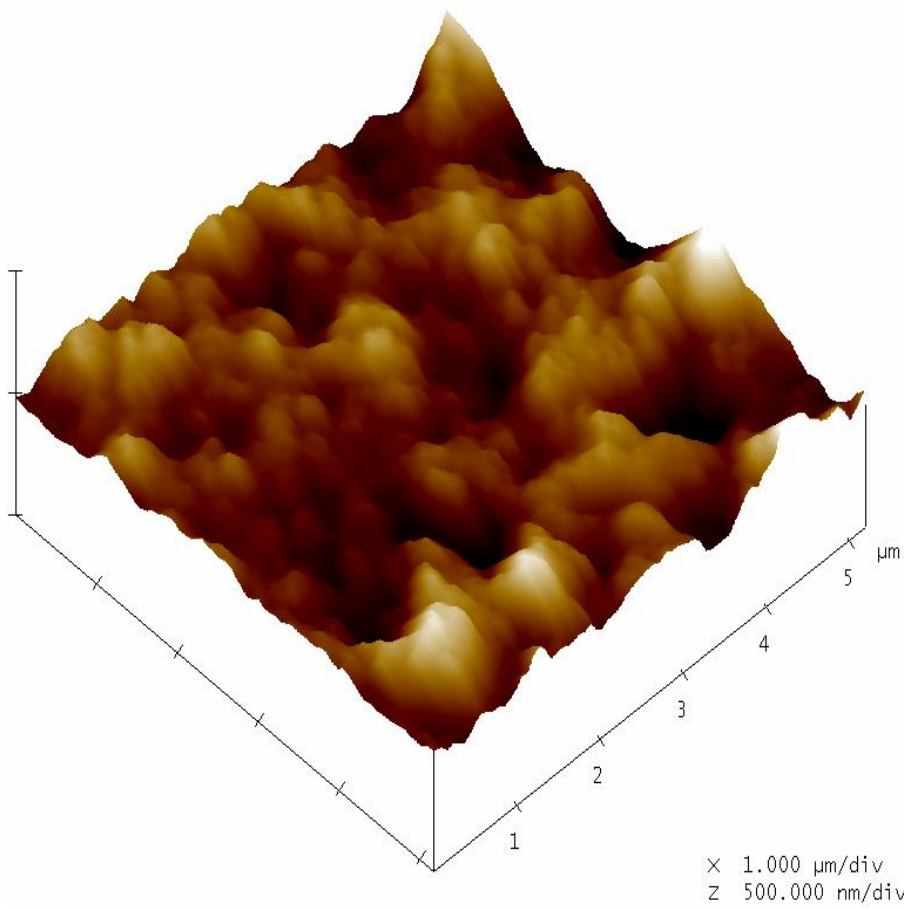


Fig. 23 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula MCF-7 adherida sobre un FSNP.

Células MCF-7 adheridas sobre un sustrato Au(111)

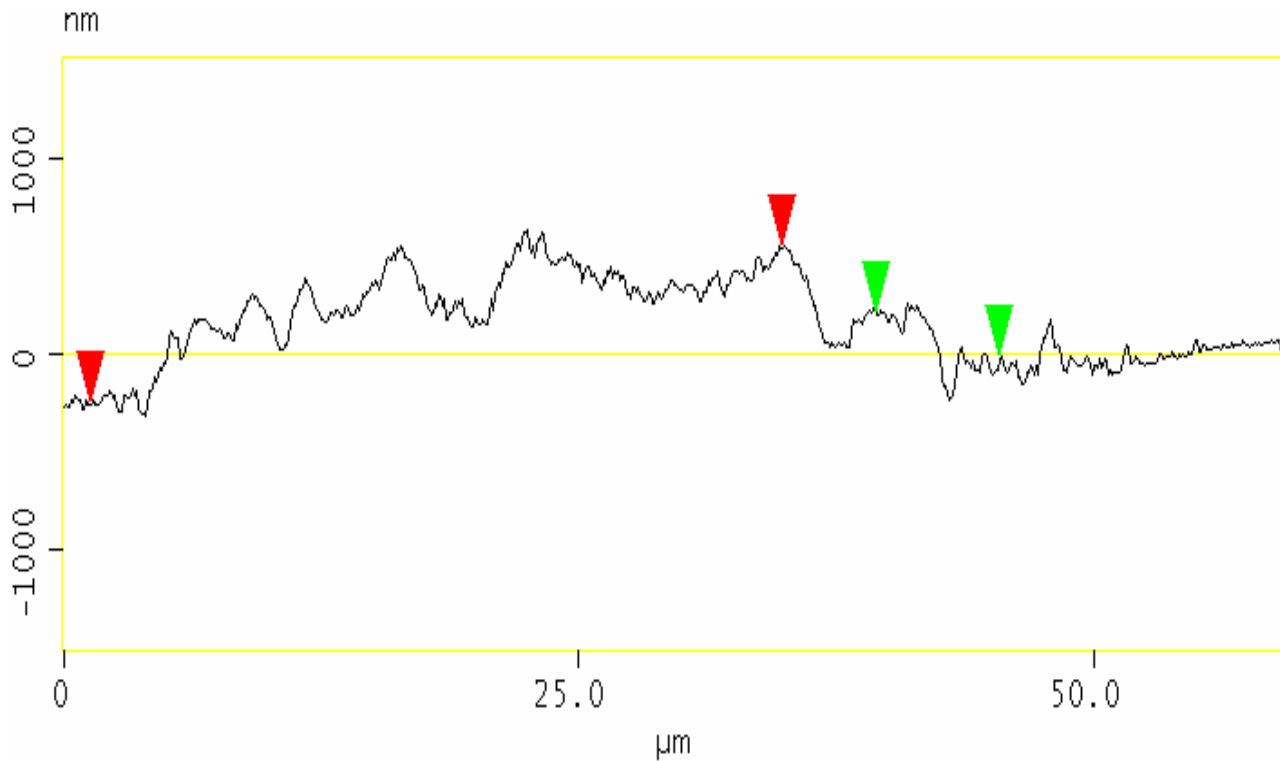


Fig. 24 c) Corte transversal sobre una célula MCF-7 adherida un sustrato Au(111).

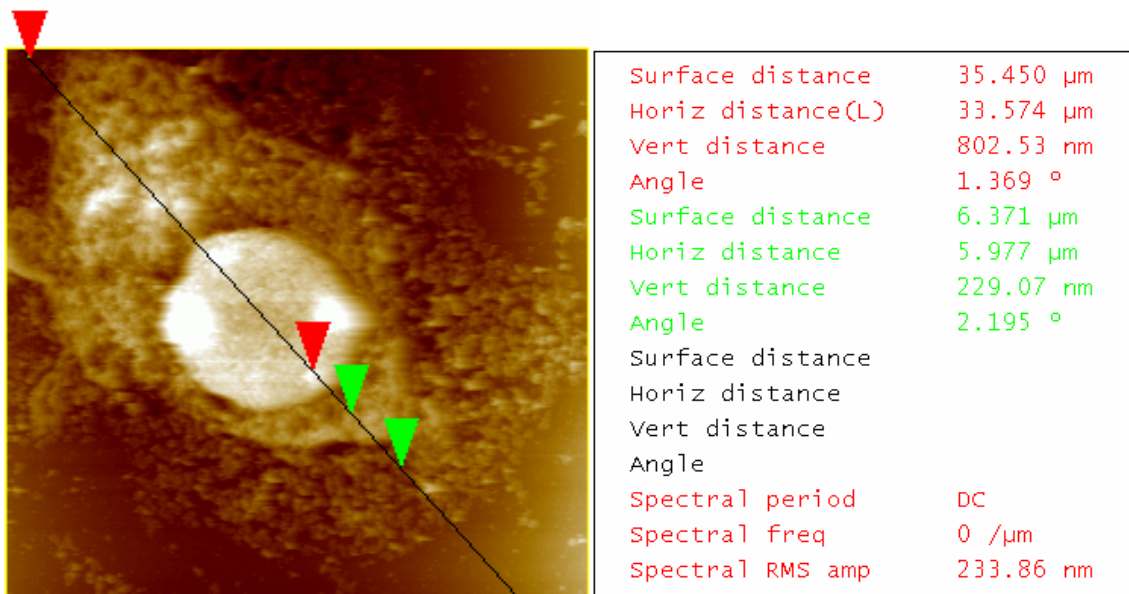


Fig. 24 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula MCF-7 adherida un sustrato Au(111).

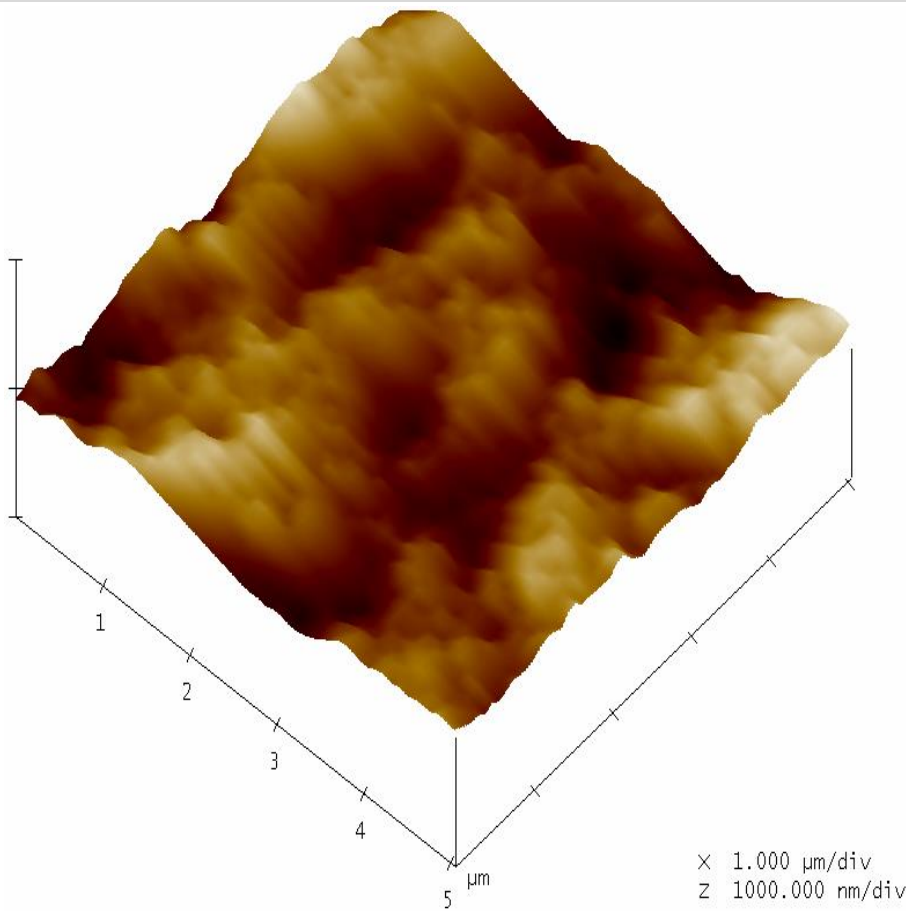


Fig. 24 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula MCF-7 adherida un sustrato Au(111).

Células T47D sobre un FSNP

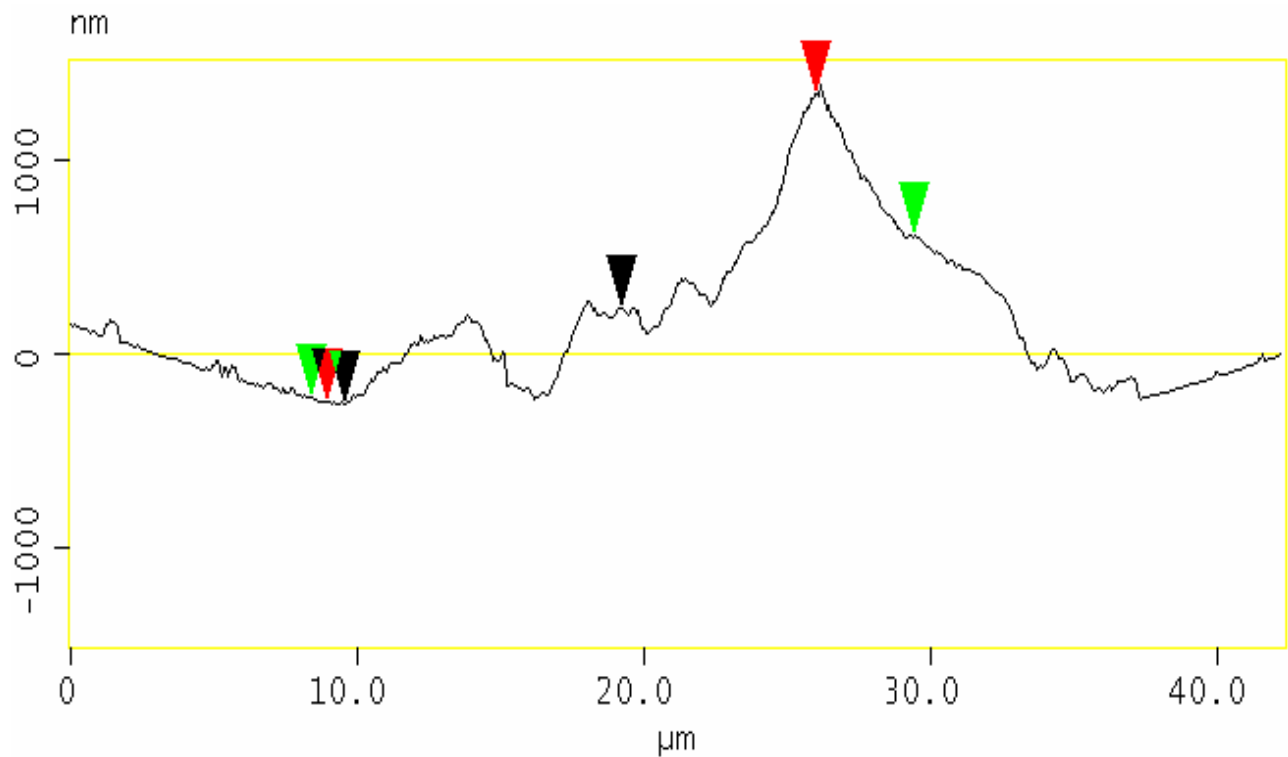
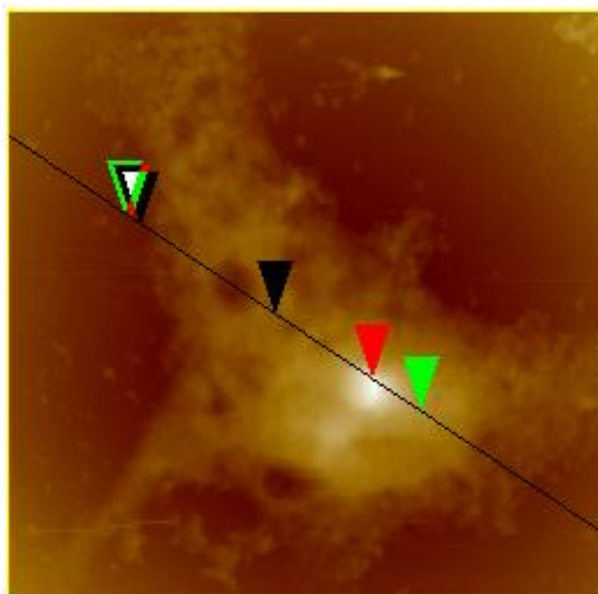


Fig. 25 c) Corte transversal sobre una célula T47D adherida sobre un FSNP.



Surface distance	17.850 μm
Horiz distance(L)	17.055 μm
Vert distance	1.587 μm
Angle	5.315 $^\circ$
Surface distance	22.007 μm
Horiz distance	21.027 μm
Vert distance	842.54 nm
Angle	2.295 $^\circ$
Surface distance	10.061 μm
Horiz distance	9.658 μm
Vert distance	494.16 nm
Angle	2.929 $^\circ$
Spectral period	
Spectral freq	
Spectral RMS amp	

Fig. 25 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula T47D adherida sobre un FSNP.

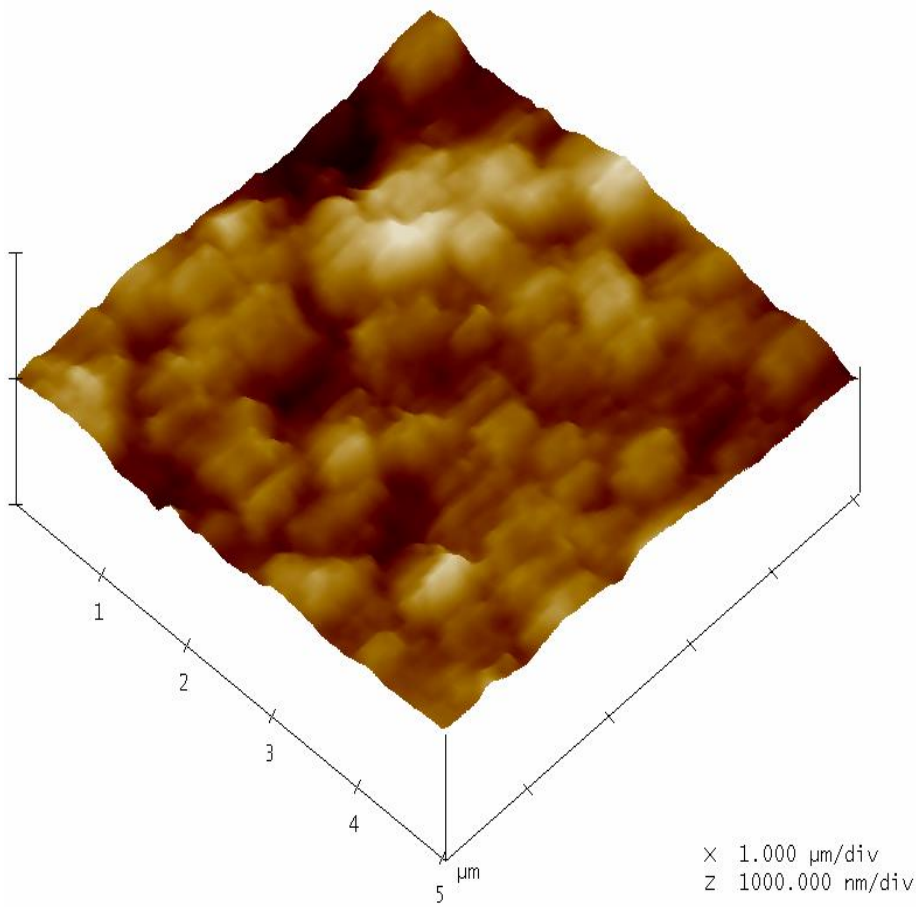


Fig. 25 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula T47D adherida sobre un FSNP.

Células T47D adheridas sobre un sustrato Au(111)

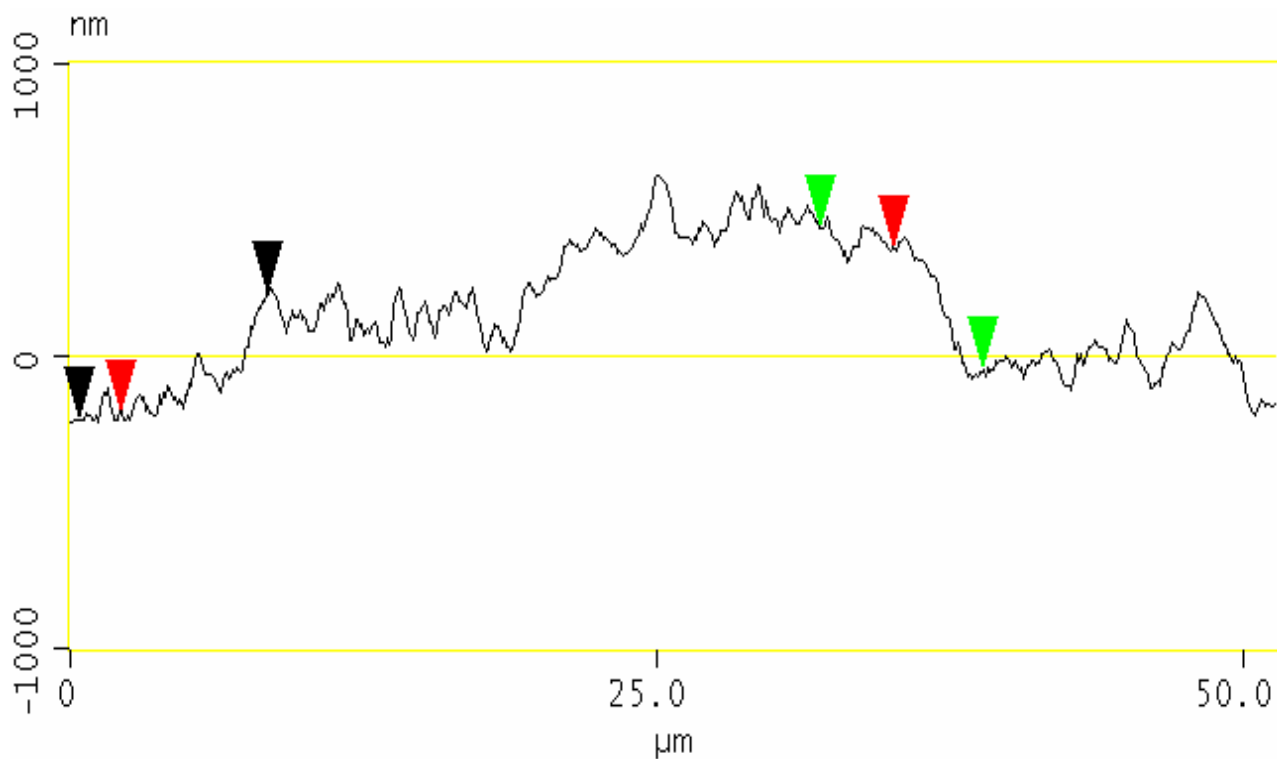


Fig. 26 c) Corte transversal sobre una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

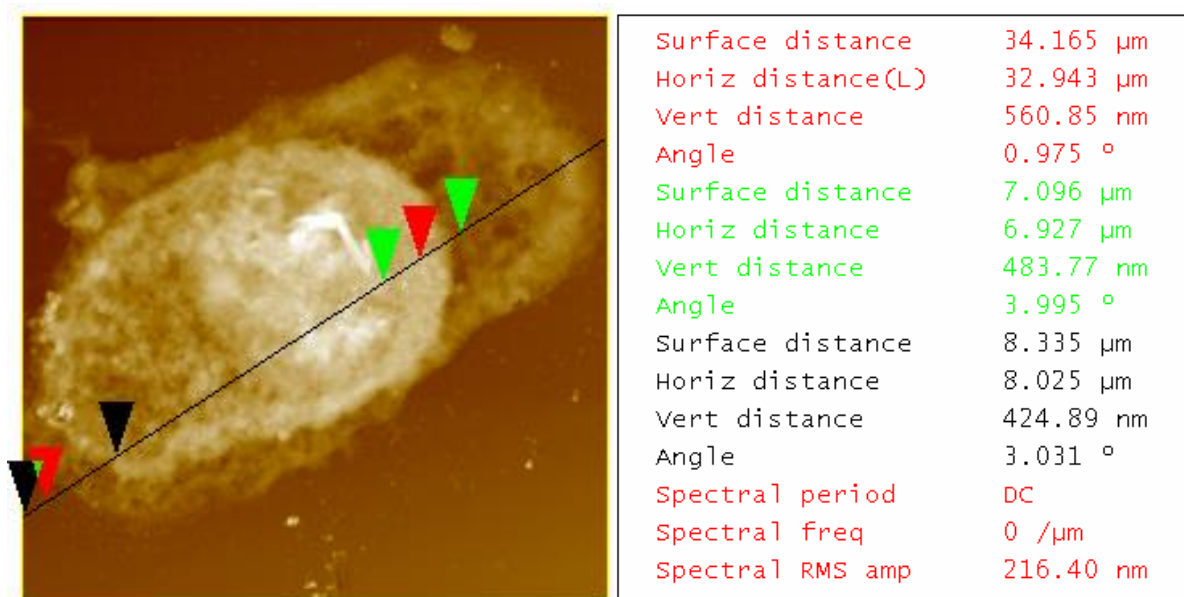


Fig. 26 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

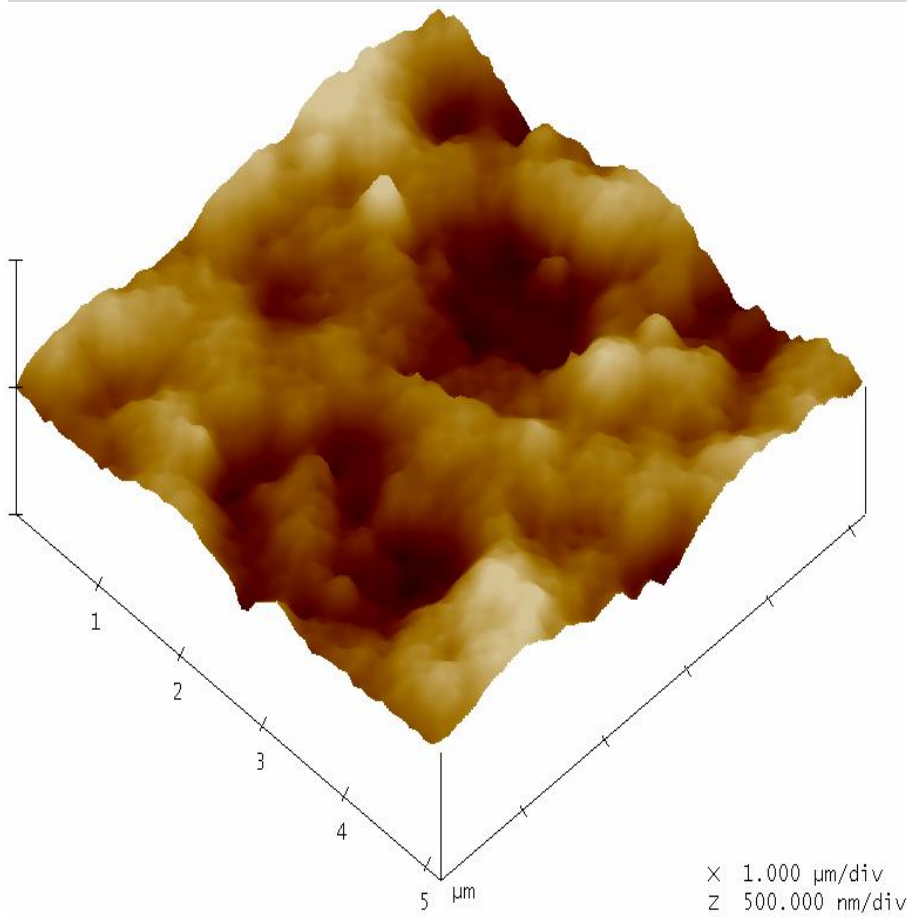


Fig. 26 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula T47D adherida sobre un sustrato Au(111).

Células MDA-MB-231 adheridas sobre un FSNP

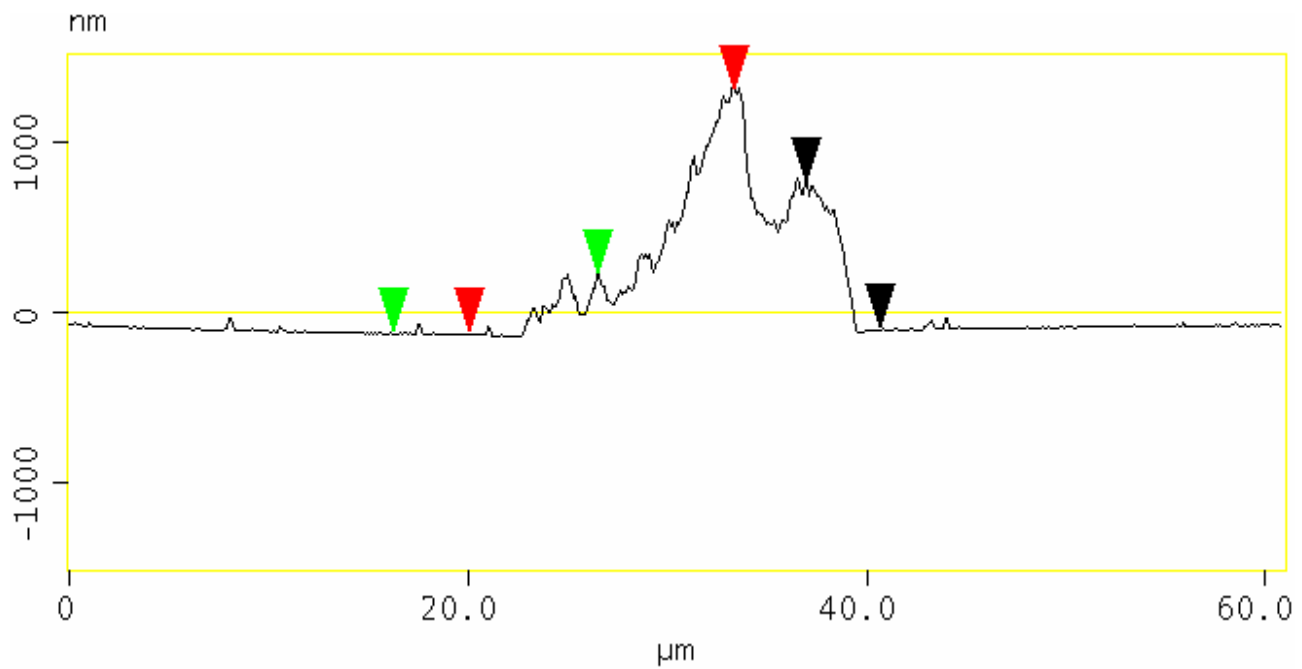


Fig. 27 c) Corte transversal sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP.



Fig. 27 d) Análisis de un corte transversal sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP.

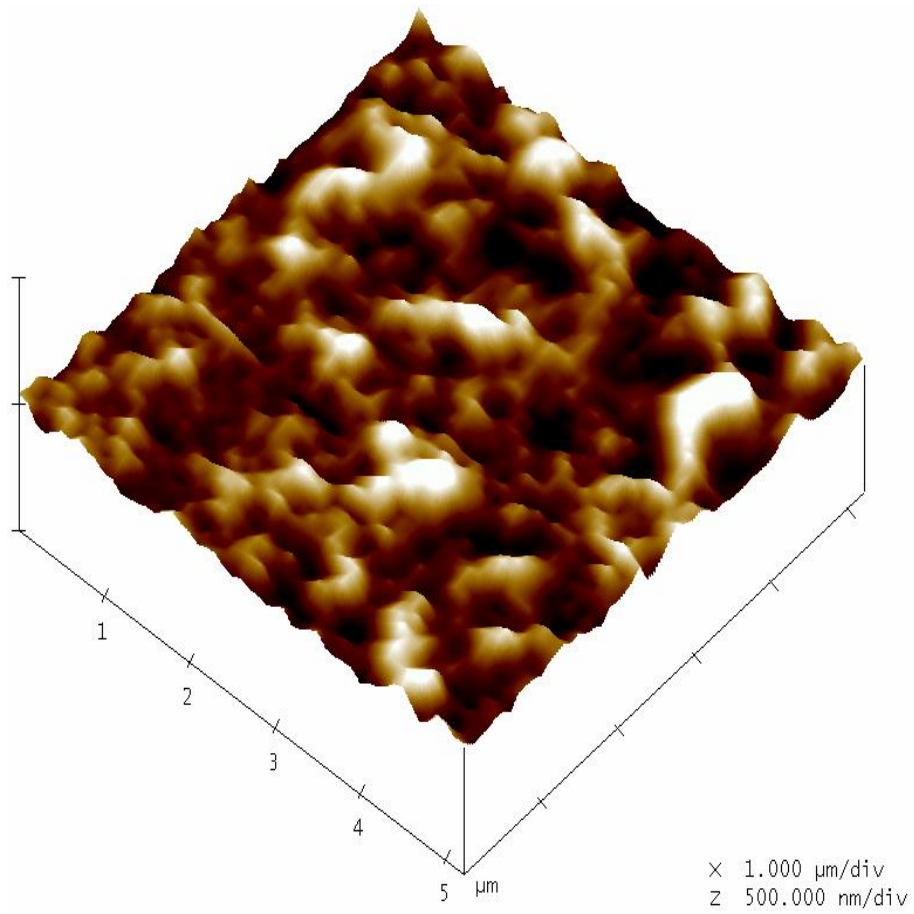


Fig. 27 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un FSNP.

Células MDA-MB-231 adheridas sobre un sustrato Au(111)

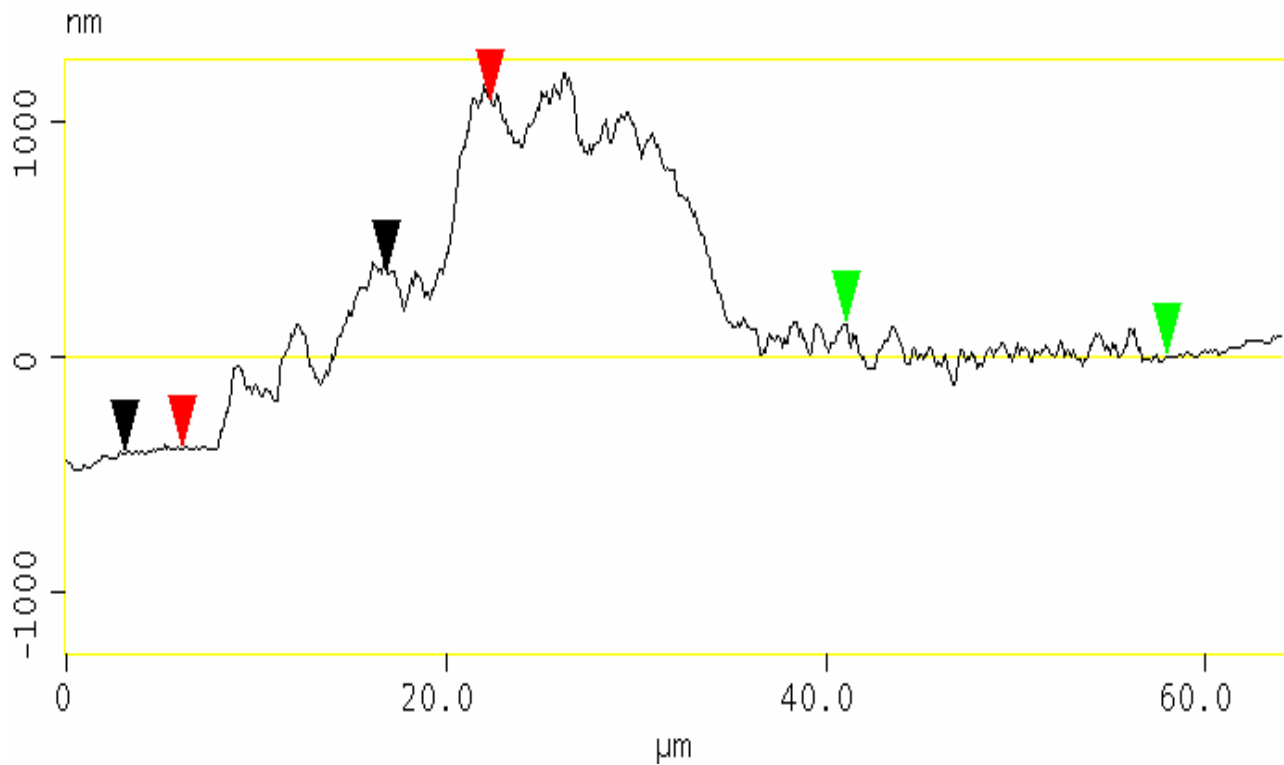


Fig. 28 c) Corte transversal sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

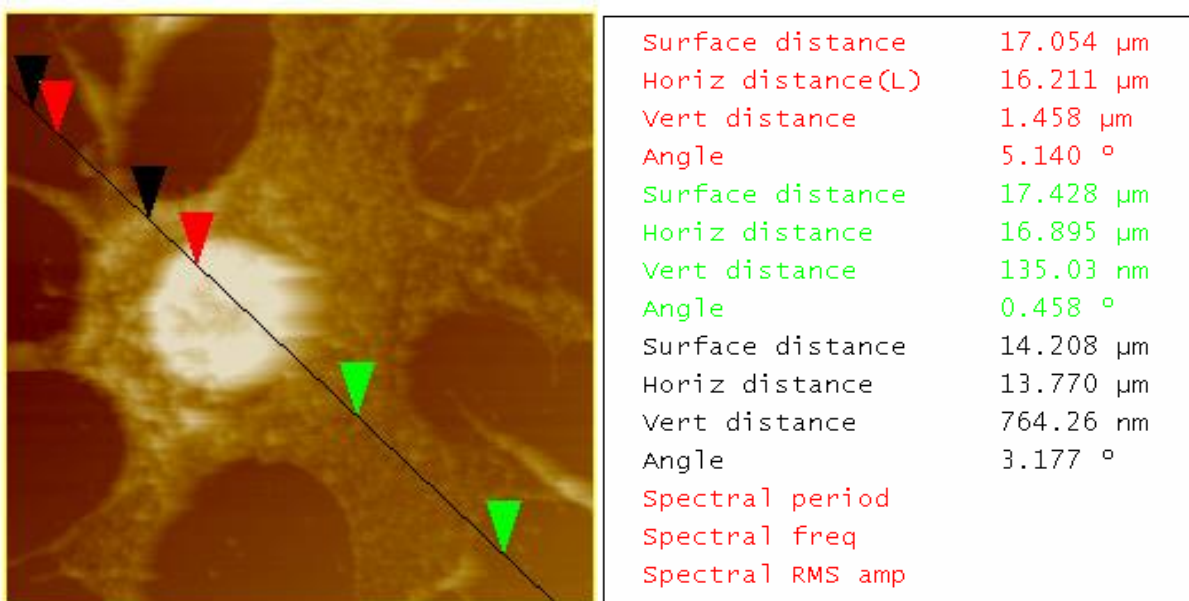


Fig. 28 d) Corte transversal sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).

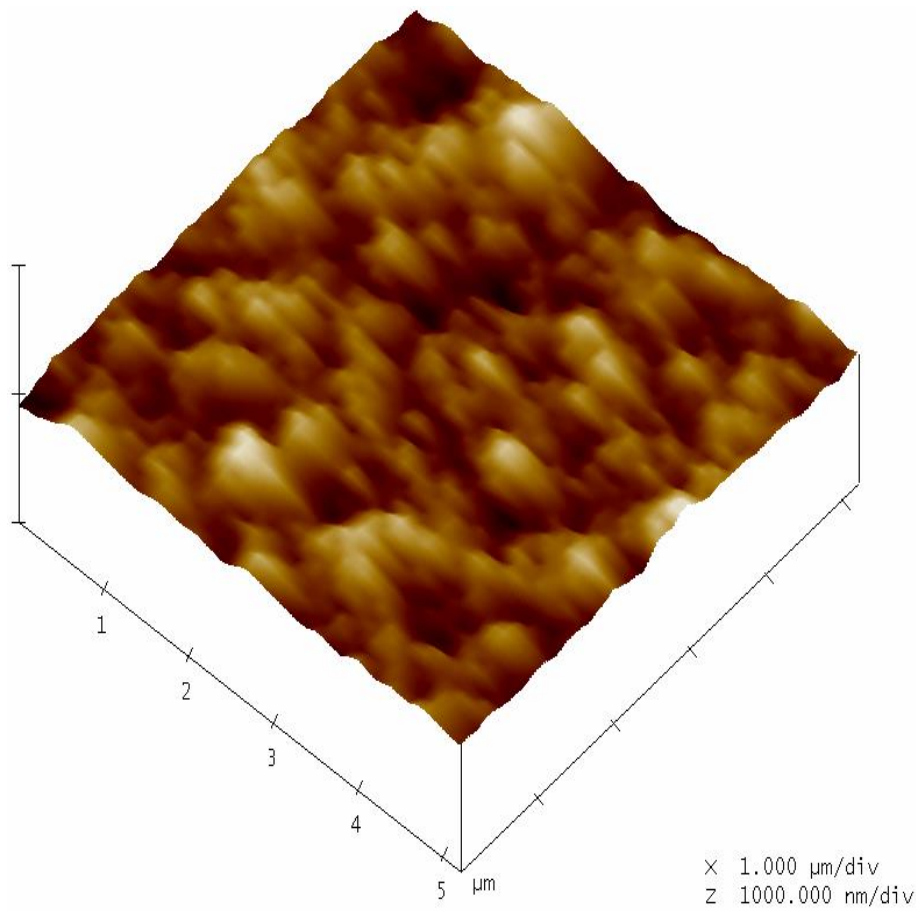


Fig. 29 e) Análisis de la rugosidad superficial sobre una célula MDA-MB-231 adherida sobre un sustrato Au(111).



Article

Development of a Nanostructured Platform for Identifying HER2-Heterogeneity of Breast Cancer Cells by Surface-Enhanced Raman Scattering

Alexandro Téllez-Plancarte ¹, Emmanuel Haro-Poniatowski ², Michel Picquart ², José Guadalupe Morales-Méndez ², Carlos Lara-Cruz ³ , Javier Esteban Jiménez-Salazar ³ , Pablo Damián-Matsumura ³ , Luis Escobar-Alarcón ⁴ and Nikola Batina ^{1,*}

¹ Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P., Ciudad de México 09340, Mexico; alextellez9@xanum.uam.mx

² Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P., Ciudad de México 09340, Mexico; haro@xanum.uam.mx (E.H.-P.); mp@xanum.uam.mx (M.P.); jose_gmm@hotmail.com (J.G.M.-M.)

³ Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P., Ciudad de México 09340, Mexico; carritro@gmail.com (C.L.-C.); bioquimicajejs@hotmail.com (J.E.J.-S.); ppgdm@xanum.uam.mx (P.D.-M.)

⁴ Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, C.P., La Marquesa Ocoyoacac 52750, Mexico; luis.escobar@inin.gob.mx

* Correspondence: bani@xanum.uam.mx; Tel.: +52-55-58044939

Received: 19 June 2018; Accepted: 17 July 2018; Published: 20 July 2018



Abstract: Biosensor technology has great potential for the detection of cancer through tumor-associated molecular biomarkers. In this work, we describe the immobilization of the recombinant humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) on a silver nanostructured plate made by pulsed laser deposition (PLD), over a thin film of Au(111). Immobilization was performed via 4-mercapto benzoic acid self-assembled monolayers (4-MBA SAMs) that were activated with coupling reagents. A combination of immunofluorescence images and z-stack analysis by confocal laser scanning microscopy (CLSM) allowed us to detect HER2 presence and distribution in the cell membranes. Four different HER2-expressing breast cancer cell lines (SKBR3 +++, MCF-7 +/-, T47D +/-, MDA-MB-231 -) were incubated during 24 h on functionalized silver nanostructured plates (FSNP) and also on Au(111) thin films. The cells were fixed by means of an ethanol dehydration train, then characterized by atomic force microscopy (AFM) and surface-enhanced Raman scattering (SERS). SERS results showed the same tendency as CLSM findings (SKBR3 > MCF-7 > T47D > MDA-MB-231), especially when the Raman peak associated with phenylalanine amino acid (1002 cm⁻¹) was monitored. Given the high selectivity and high sensitivity of SERS with a functionalized silver nanostructured plate (FSNP), we propose this method for identifying the presence of HER2 and consequently, of breast cancer cells.

Keywords: atomic force microscopy; surface-enhanced Raman scattering; HER2; breast cancer cells

1. Introduction

Breast cancer is the second cancer cause of death in the United States and it is estimated that 1.7 million new cancer cases will be diagnosed and 609,640 Americans will die of cancer in 2018 [1]. In Mexico, breast cancer is the fifth most common cause of death (n = 4496 average annual deaths from 2000–2013) and the leading cause of cancer mortality in Mexican women [2]. Tumor-associated antigens have been used as molecular biomarkers for cancer diagnosis; these biological molecules can

be detected in or on tumor cells, blood, serum, urine, or cerebrospinal fluids, which are overexpressed due to cell cancer and growth [3].

HER2 is a member of the human epidermal growth factor receptor family, which regulates cell growth and differentiation and is also involved in some human cancers, such as breast and colon cancer [4,5]. The expression of HER2 proto-oncogene in normal breast epithelial cells that gives rise to a 185 kDa trans-membrane glycoprotein and its overexpression, found in 20%–30% of human breast cancers, correlates with more aggressive tumors and a poorer prognosis [6,7]. HER2 overexpression is caused by amplification of the *c-erbB-2* gene, which results in 1 to 2 million receptors per cell, compared to 20,000–50,000 receptors in normal breast epithelial cells [8]. Trastuzumab is a recombinant humanized anti-HER2 monoclonal antibody that selectively binds with high affinity to HER2 extracellular domain, inhibits cell proliferation, attacks HER2-dependent tumors and blocks shedding of HER2 extracellular domain [9,10]. HER2 detection has been used in different biosensors for breast cancer diagnosis and prognosis [11,12].

The surface plasmon resonance (SPR) refers to the collective oscillations of conduction electrons in metal nanostructures and this effect has been used in chemosensors and biosensors. SPR occurs in two different forms: localized surface plasmon resonance (LSPR) and surface plasmon polaritons (SPPs). The LSPR concentrates the incident electromagnetic field around the nanostructured films and this local electromagnetic field can influence processes, such as: plasmon enhanced fluorescence (PEF), surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRAS) and its associated evanescent electromagnetic field that extends to the surrounding medium around 30 nm of distance. In contrast, the SPPs concentrate the incident electromagnetic field around continuous or flat films and their evanescent electromagnetic field decays approximately to 200 nm of distance [13].

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) turns the weak inelastic scattering effect of photons on vibrational quantum states into a structurally sensitive single-molecule and nanoscale probe [14]. SERS ‘hotspots’ are located at the junctions of nanoaggregates, where the local electromagnetic field amplitude is increased by plasmonic field confinement, enabling Raman amplifications up to 10^{10} . Furthermore, the existence of the chemical effect due to chemisorption of molecules on surfaces enables Raman intensity enhancements up to 10^4 , taking into account that, both effects (electromagnetic and chemical) can produce an enhancement of the order of 10^{14} [15,16]. SERS has been used as a technique for biomarker biosensing in yeast, *H. pylori*, *E. coli* and hemoglobin A1c the authors propose a new hyper-spectral imaging system in order to resolve the intrinsic spatial inhomogeneity of SERS spectra [17]. Some of the different merits of SERS are the multiplicity of analyzed molecules against the fluorescence technique, as well as its sensitivity and robustness against laser radiation due to energy transfer from excited molecules to metal surfaces.

New methods for cancer detection, such as biosensors and more reliable molecular biomarkers, are needed for attaining the challenge of an early detection of the disease. A biosensor is an analytical device with a bioreceptor attached on its surface, which, when interacting with the analyte molecule, carries out a biochemical reaction or a specific union and by means of a signal transducer the resulting (bio)chemical signal is converted into an electric one. The intensity of the generated signal is directly proportional to the analyte concentration [18]. One type of biosensors is the immunosensor, which relies on the ability of an antibody to form a stable complex with its corresponding antigen [19].

Increased Raman peaks that correspond to phenylalanine (Phe) vibrational modes have been found in various cancer types, such as prostate, lung, breast, oral and esophageal tissue samples. In this regard, different researches were reported in the scientific literature. Li et al. [20] observed a considerable increase in Raman peaks at 1217 cm^{-1} (C-C₆H₅ bending mode of phenylalanine and tryptophan) and 1586 cm^{-1} (C=C bending mode of Phe, acetoacetate and riboflavin) in serum of prostate cancer patients when analyzed by SERS. Huang et al. [21] showed higher Raman signals for nucleic acids, tryptophan (Trp) and Phe in lung malignant tissue when analyzed by Raman spectroscopy. Zhu et al. [22] found Raman bands at 1004 and 1030 cm^{-1} (assigned to the symmetric

ring breathing mode of Phe) remarkably enhanced in human breast cancer cells when analyzed by SERS. Girish et al. [23] reported intense SERS Raman peaks due especially to aromatic amino acids (Phe, Trp and tyrosine [Tyr]) in oral malignant tissue. Rekha et al. [24] have found marked differences in the Raman spectra of blood plasma from oral cancer patients with respect to healthy subjects, in particular, for the Raman peaks related to Phe and Trp, among others. González et al. [25] observed that Phe band intensity at 1002 cm^{-1} depends on the stage of breast cancer and finally, Feng et al. [26] found increased Raman signals at 1211 cm^{-1} (Phe) and 1583 cm^{-1} (Phe, riboflavin) in esophageal malignant tissue when analyzed by SERS.

In addition to the aforementioned examples, Chaturvedi et al. [27] monitored the biomolecular changes associated with the transformation of a normal cell into an invasive breast cancer cell using Raman microspectroscopy and showed the suitability of this technique as non-invasive and label-free, having the potential to probe changes in the biomolecular composition of living cells as well as fixed cells.

All these data demonstrate that Raman spectroscopy has potential for cancer sample diagnostics and reduces times, cost and traumas of surgical operations. However, the lack of high sensitivity and Raman peak definition, as well as interpretation, are still problems that must be addressed.

In the present work, we designed a FSNP that is able to recognize under pseudo-physiological conditions the HER2 extracellular domain in four breast cancer cell lines with differential expression of surface HER2 and such molecular recognition was detected by SERS. Although we are not the first to point out an increase in Raman intensity of the vibrational modes associated with phenylalanine, to the best of our knowledge, we are the first to point out that phenylalanine Raman peak could be used as a label associated with cancer cells and monitored by SERS through a FSNP, for their identification.

2. Experimental Section

2.1. Materials

MCF-7 (Luminal B), T47D (Luminal A) and MDA-MB-231 (HER2 negative) cell lines acquired from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), SKBR3 (overexpressing HER2) cell line was a gift from Dr. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez from INCAN, Mexico City, Mexico. The following materials were used: Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), RPMI medium, F12 medium, non-essential amino acids, L-glutamine, sodium pyruvate, nunclon 6-well multidish, Alexa Fluor 594 dye (secondary antibody) and Penicillin/Streptomycin (antibiotic/antifungal) were purchased from Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico.

N-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) was purchased from Life Technologies, Mexico City, Mexico. Antibodies against HER2/ErbB2 (D8F12/4290P) were obtained from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA. HER2/Neu MAb (sc-33684) and 4-mercapto benzoic acid (4-MBA) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. Ethanolamine hydrochloride, *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico. Ultrapure water was used from a Milli-Q system (Millipore, Burlington, MA, USA), Herceptin (trastuzumab, generic name) was purchased from Roche-Mexico, 3.5 kDa MWCO dialysis membrane (Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, USA) and other reagents were analytical grade. Au(111) plates for AFM and SERS measurements were obtained from Arrandee Co., Werther (Westfalen), Germany. 99.99% pure silver target (1.00 diameter \times 0.259 thick) for PLD was obtained from Kurt J. Lesker Co., Jefferson Hills, PA, USA.

2.2. Methods

Pulsed Laser Deposition (PLD). Silver nanostructures on Au(111) substrates were prepared at room temperature by ablating a high purity silver target. Laser deposition was carried out in a vacuum chamber at a background pressure close to 2.7×10^{-5} torr, obtained with a turbomolecular pump. The third harmonic ($\lambda = 355\text{ nm}$) of a Q-switched Nd:YAG laser (Spectra Physics), delivering 10 mJ in pulses of 10 nanoseconds of duration, working at a repetition rate of 10 Hz, was used as energy

source. The laser beam was focused on the silver target surface using a quartz lens of 50 cm of focal length, which produced a spot of 0.80 mm mean diameter and an average laser fluence close to 2.0 J/cm^2 . Au(111) plates described above were used as substrates for PLD, placed at a distance of 6.0 cm directly in front of the silver target and subsequently, 3000 laser pulses were used to produce silver nanostructures ($45.0 \pm 16.7 \text{ nm}$) on a surface of approximately 0.5 cm^2 .

Atomic Force Microscopy (AFM). All AFM images (substrates, cell plasma membranes and surface analysis of cell plasma membranes) were characterized at room temperature under atmospheric conditions, in the tapping mode with a NanoScope IIIa (Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA). Probes of antimony (n) doped silicon that had an average resonance frequency of 317–382 kHz with a spring constant of 20–80 N/nm were used at a scan rate of 0.4–0.7 Hz. The amplitude values of the cantilever remained constant at approximately 3000 mV and at 1.5 V set point. AFM images were manually obtained with a mean time of 45 min per sample; the acquisition modes were height and phase and their analyses were performed through the AFM NanoScope III software. Each sample (cell) was examined at five different places over the cell surface in two different series of samples.

Raman and Surface-enhanced Raman scattering (SERS) measurements. All Raman and SERS spectra were recorded at least three times in three different points of the sample, at room temperature with a Horiba Jobin-Yvon LabRam HR 800 micro-Raman system, equipped with an Olympus BX40 confocal microscope (Edison, NJ, USA) and a CCD detector (Edison, NJ, USA). Measurements were performed using an excitation wavelength of 532.1 nm, a $50\times$ objective, at a power close to 7 mW on the sample and 100 accumulations of 10 s per spectrum to improve the signal-to-noise (S/N) ratio. The spectra were calibrated using the 521 cm^{-1} line of monocrystalline silicon. In order to take spatially similar Raman spectra, these were taken near the cell nuclei in all the cases.

Breast cancer cell line cultures. MCF-7 was seeded in Petri dishes containing phenol red-free DMEM supplemented with 2.5% (*v/v*) FBS. T47D and MDA-MB-231 were cultured with RPMI medium and 2.5% (*v/v*) FBS. SKBR3 was cultured with DMEM-F12 medium (3:1 *v/v*) and 10% (*v/v*) FBS. All culture media were supplemented with non-essential amino acids (100 mM), antibiotic/antifungal (Penicillin 100 U/mL/Streptomycin 100 mg/mL), L-glutamine (2 mM) and sodium pyruvate (100 mM) at 1% (*v/v*). Breast cancer cell lines were cultured in a humidified atmosphere (5% CO_2 and 37°C) until 100% confluence, removed by means of trypsin-EDTA, centrifuged at $1500\times g$ during 10 min and re-suspended in new culture medium.

Trastuzumab antibody purification. One mg of Herceptin was dissolved in 1 mL of 10 mM of PBS buffer at pH 8.3 and subsequently dialyzed overnight, using a dialysis membrane of 3.5 kDa MWCO against 1 L of the same buffer. The concentration of trastuzumab was calculated using the Beer-Lambert law, taking into account the following constants: $\epsilon_{280\text{nm}} = 2.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\text{MW} = 145.53 \text{ kDa}$ and measuring its absorbance at 280 nm with a BioDrop spectrophotometer [28,29]. Dilutions of trastuzumab at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ were used for its immobilization on 4-MBA SAMs. Trastuzumab shows an isoelectric point at pH 8.8, so a pH at 0.5 units below its isoelectric point is optimum for amine coupling via NHS-ester intermediates [30].

4-Mercapto Benzoic Self-Assembled Monolayers (4-MBA SAMs) preparation. Fresh silver nanostructured substrates produced by PLD (3000 laser pulses of silver irradiated on an Au(111) thin film) were immersed for 15 s into an ethanol solution of 10 mM of 4-MBA, then cautiously rinsed in an acetic acid solution at pH 1.8 and gently dried [31]. Before use, the substrates were autoclaved.

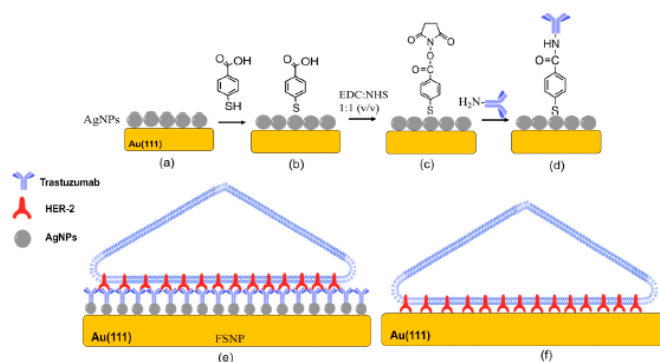
Functionalized Silver Nanostructured Plate (FSNP) Design. Solutions of 0.4 M of EDC·HCl, 0.1 M of NHS and 1.0 M of ethanolamine hydrochloride (adjusted with HCl at pH 8.5) were prepared using water as solvent, separated in small aliquots, frozen at -20°C and used until required [32]. 4-MBA SAMs were activated during 10 min with 15 μL of EDC/NHS (1:1 *v/v*) coupling reagents and afterwards, gently dried; 10 μL of trastuzumab at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ was deposited for 20 min and again gently dried; 15 μL of ethanolamine hydrochloride solution was deposited for 7 min for surface deactivation and finally FSNP was rinsed with PBS and immediately used.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The coverslips for immunocytochemistry were previously washed and autoclaved. In a 6-well multidish cell culture plate, 4 coverslips were placed for each cell line; approximately 150,000 cells were dropped on each coverslip and incubated for 24 h. After this time, the culture medium was withdrawn, coverslips were rinsed $3\times$ with tempered PBS-Tween 20 at 1% (v/v), 1 mL of 4% neutral buffered formalin was added and left to stand for 20 min at room temperature.

Once again, coverslips were rinsed $3\times$ with tempered PBS, primary anti-HER2 monoclonal antibody from mouse dissolved in PBS at 1:100 (v/v) was dropped on each coverslip and incubated during 1.5 h, then rinsed $3\times$ with tempered PBS. One more time, coverslips were incubated with an aliquot of anti-anti-HER2 secondary antibody from mouse, bound to Alexa Fluor 594 fluorophore dissolved in PBS at 1:100 (v/v) that was dropped on each coverslip and incubated during 1.5 h. Finally, nuclei were counterstained with a solution of DAKO DAPI (2 ng/mL) that was placed on each coverslip for 10 min, then coverslips were sealed and refrigerated at 4 °C until use.

3. Results and Discussion

In order to find a method for simple and direct detection of breast cancer, we designed a platform for the identification of HER2 surface receptor on plasma membranes. *As was mentioned in the introduction, the overexpression of HER2 is found in 20%–30% of human breast cancers and it correlates with more aggressive tumors and a poorer prognosis [6]. See Scheme 1.*



Scheme 1. Schematic representation of (a) silver nanostructures deposited by pulsed laser detection (PLD) on Au(111) substrate; (b) formation of 4-mercapto benzoic acid self-assembled monolayers (4-MBA SAMs) on the silver nanostructured substrate; (c) formation of the reactive intermediate (NHS-ester) for amine coupling; (d) formation of a functionalized silver nanostructured plate (FSNP) with anti-HER2 (trastuzumab); (e) a breast cancer cell attached on a FSNP and (f) a breast cancer cell attached on a plain Au(111) substrate (control).

In the present work, we studied four cell lines: SKBR3, MCF-7, T47D and MDA-MB-231, with different HER2 expression levels (from high to low). Figure 1a–d shows the results of CLSM analysis revealing the presence and distribution of HER2 surface receptors in different breast cancer cell lines (red color due to Alexa Fluor 594 fluorophore), previously identified by immunofluorescence technique. The analysis of CLSM images from Figure 1d corroborated that the SKBR3 cell line exhibited high expression of HER2 surface receptor, being 80%–90% of the total cells analyzed on the surface of the membrane and the rest dispersed in the cytoplasm. In MCF-7 cells, HER2 surface receptor was on the membrane in 40%–60% of the total cells analyzed and could also be observed in the nucleus, especially in cells with higher expression; this effect was not observed in SKBR3 cells but its location in these cells was corroborated by the Z-stack analysis (not shown).

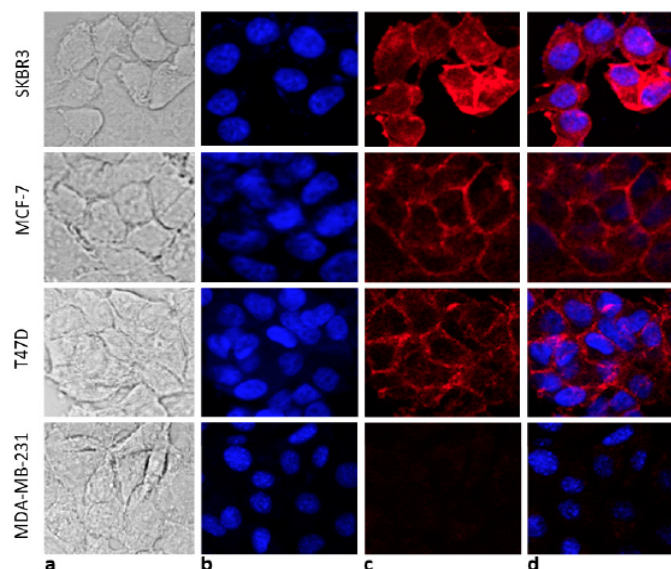


Figure 1. Images of immunofluorescence by confocal laser scanning microscopy (CLSM) of four different breast cancer cell lines: MCF-7, SKBR3, T47D and MDA-MB-231 (a) bright field; (b) staining of the cell nucleus by the fluorophore DAPI (blue); (c) indirect detection of HER2 by a primary anti-HER2 antibody and an anti-anti-HER2 secondary antibody bound to Alexa Fluor 594 fluorophore (red) and (d) cell localization of HER2 receptor by overlapping of images (DAPI + HER2). Magnification: 63 \times .

The expression of HER2 on the membrane surfaces of T47D cells was observed in less than 20% of the total cells analyzed, with less intensity than in the other two cell lines and preferably, in the cytoplasm and nucleus; and lastly, no HER2 expression was found in MDA-MB-231 cells. These results allow us to establish the differential expression of HER2 present on the cell membranes in the following way: SKBR3 > MCF-7 > T47D > MDA-MB-231.

In general, these results are in good agreement with the findings already documented in the scientific literature that SKBR3 is a HER2-overexpressing cell line [33], MCF-7 and T47D are low HER2-overexpressing cell lines [34] and MDA-MB-231 is considered triple negative (no expression of HER2, progesterone and estrogen receptors) [35]. Russo et al. reported that HER2 expressed at T47D is predominantly cytosolic [36]. Therefore, MCF-7 cell line presents more HER2 surface receptors than T47D cell line. It is worthwhile mentioning that for immuno-fluorescence investigations, the substrates have to be transparent (glass plates) due to the optical configuration. Furthermore, the glass plates have, in this case, a transparent polymer thin film that enables cell adhesion. Such substrates were not suitable for AFM and SERS studies.

In order to find a substrate with high affinity and selectivity for breast cancer cells, based on their HER2 expression, we designed a special functionalized silver nanostructured plate (FSNP) with an anti-HER2 layer on a flat Au(111) substrate. This surface is good for AFM analysis and the silver nanoparticle layer is essential to produce SERS, since it requires a nanostructured surface to enhance the Raman signal and, at the same time, improve the S/N ratio of the adsorbate. Note, glass substrates are significantly rougher than Au(111) surface, making difficult the analysis by AFM. Our functionalized silver nanostructured plate (FSNP) is highly defined (homogeneous) with AgNPs of a defined size that can be used as a reference. In the case of glass substrates, it is very difficult to obtain the same characteristics.

Search for the optimum FSNP was carried out as a large and detailed study (not shown), however here we present only the most relevant results. In short, we used PLD technique, with 3000 nanosecond laser pulses to deposit silver nanoparticles of the desired size onto the flat Au(111) substrate. According to Stamplecoskie et al., the silver nanoparticles of 50 nm diameter are favorable for SERS phenomena [37]. A great number of experiments was performed on different substrates by varying the number of laser

pulses, from 500–3000, until finding the best experimental conditions that provided the highest signal intensity and the highest SERS effect, that is, the highest S/N ratio.

Our nanostructured films were characterized and optimized for SERS, using sodium dodecyl sulfate (SDS) as a test molecule (20 mM of SDS dissolved at 1:2 *v/v* chloroform-ethanol). Figure 2a shows an AFM image of the silver nanostructured film prepared by PLD on a flat Au(111) substrate. Figure 2b shows the statistical analysis performed by SPIP 3D Image Processing v6.2.4. (Image Metrology, Horsholm, Denmark) whose results were: density of 538 silver nanostructures/ μm^2 and 45.0 ± 16.7 nm of diameter. In the process of further modification of 4-MBA SAMs, a layer with NHS-esters was formed and trastuzumab was deposited on the nanostructured silver/gold substrate. For more details, see methodology section of this paper. Each step of modification was followed by a detailed characterization (AFM, SERS) of the morphology and optical properties. Figure 2c shows an AFM image of 4-MBA SAMs formed on the nanostructured silver/gold substrate in which some features of the nanostructured surface are clearly observed. Figure 2d exhibits the Raman spectrum of 4-mercapto benzoic acid self-assembled monolayers (4-MBA SAMs), which is characterized by Raman peaks at 630 cm^{-1} (C-S), 1075 cm^{-1} (CH in-plane bending), 1180 cm^{-1} (CH bending), 1357 cm^{-1} (COO⁻ stretching) and 1585 cm^{-1} (C=C stretching). Figure 2e shows an AFM image of trastuzumab oriented-immobilized on 4-MBA SAMs to form a FSNP; again, the nanostructured characteristics of the substrate are observed. Figure 2f shows the Raman spectrum of FSNP, which is characterized by Raman peaks at 864 cm^{-1} (Tyr), 948 cm^{-1} (N-C α -C), 1064 cm^{-1} (C-C or alkyl C-N), 1139 cm^{-1} (C-C or alkyl C-N), 1324 cm^{-1} (Trp, C α -H) and 1609 cm^{-1} (Tyr, Trp, Phe). All Raman peaks were assigned according to the literature [38,39]. The disappearance of the 4-MBA Raman signals after adding the anti-HER2 layer could be due to a screening effect of the latter.

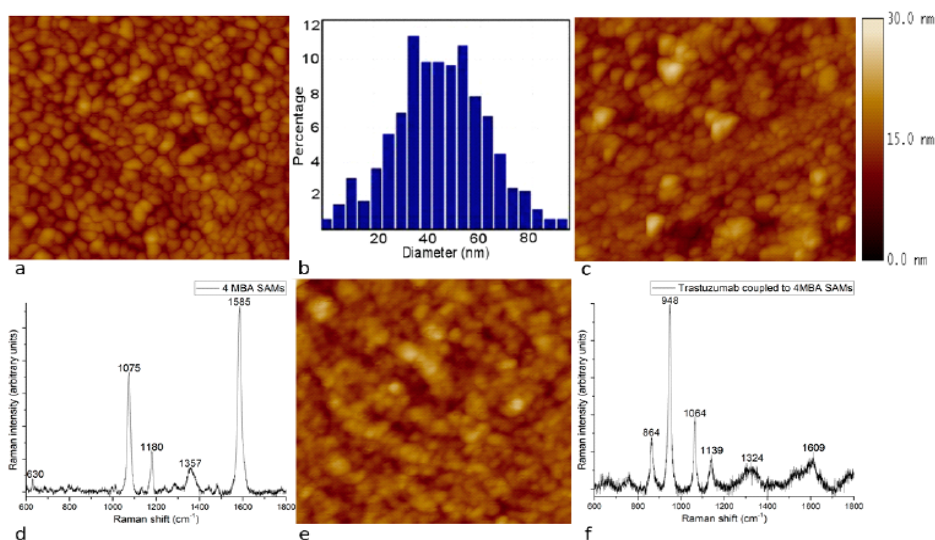


Figure 2. (a) Atomic force microscopy (AFM) image of a silver nanostructured substrate prepared by PLD at vacuum; (b) statistical analysis of the diameter of silver nanostructures; (c) AFM image of 2D morphology of 4-MBA SAMs formed on the silver nanostructured substrate; (d) Raman spectrum of 4-MBA SAMs formed on the silver nanostructured substrate; (e) AFM image of 2D morphology of FSNP with an anti-HER2 layer and (f) Raman spectrum of FSNP. AFM images are ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) and share the same height scale (z-scale: 0–30 nm).

The analysis of the surface roughness of 4-MBA SAMs and FSNP by AFM showed a slight change, which demonstrates that the film morphology was quasi-preserved. The surface roughness values ($\text{RMS}_{[\text{Rq}]}$) were 4.83 ± 0.28 nm and 3.96 ± 0.83 nm, respectively. The process for calculating the surface roughness is reported in the work of Lara-Cruz et al. [40]. At this point, we consider that the FSNP prepared in this work accomplished all requirements to be employed as substrate for identification of breast cancer cells.

In the process of testing the affinity of breast cancer cells for FSNP, four cell lines with different HER2 expression (MCF-7, SKBR3, T47D and MDA-MB-231) were used. The following procedure was carried out: FSNPs were placed in duplicate for each cell line in 4-well multidish cell culture plates, an aliquot containing around 30,000 breast cancer cells (MCF-7, SKBR3, T47D, or MDA-MB-231) was dropped and incubated during 24 h in pseudo-physiological conditions (5% CO₂ and 37 °C) and then fixed by ethanol dehydration train. Since our personal experience with formaldehyde is that it builds up a polymeric layer, which prevents the surface from being probed by an AFM tip, we performed fixation with ethanol dehydration train (ethanol-water solution) using solutions at 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% and 100% (*v/v*) for 3 min in each step.

The same process was carried out in parallel, using a clean Au(111) substrate, which supposedly lacks affinity for the cancer cell lines employed in this study. Both substrates were analyzed by AFM imaging that revealed morphological changes due to presumably different cell attachment. Nevertheless, to our surprise, the cell populations on both substrates were very similar for all cell lines, which could be attributed to a rather long time of cell incubation. As a further attempt to distinguish the difference between the four cell lines with differential HER2 expression, we studied the morphology and surface roughness of the cells attached to FSNPs.

AFM images shown in Figure 3a–d revealed different morphology for each cell line attached on FSNPs. Despite the imaged cells are of the same size, in many cases they possess two or more nuclei (typical for cancer cell lines) as well as cytoplasmic prolongations, which indicates a similar attachment to the surface. All AFM images are given in 2D top-view, however, for illustration a small segment (insert) is presented in 3D mode. Surface roughness of the parts obtained exclusively at the surface of the plasma membrane, was evaluated quantitatively and expressed as RMS_[Rq] factor. We calculated a paired t-test using the R statistical software [41] v3.4.1 in order to find the difference of means between the roughness of the plasmatic membranes adhered on a FSNP and on a flat Au(111) substrate. We only found significant differences (*p*-value < 0.05) in the surface roughness analysis of the plasma membranes of MCF-7 and T47D breast cancer cells. Note that RMS [Rq] and cellular height observed at AFM images are very low, probably due to the ethanol dehydration train.

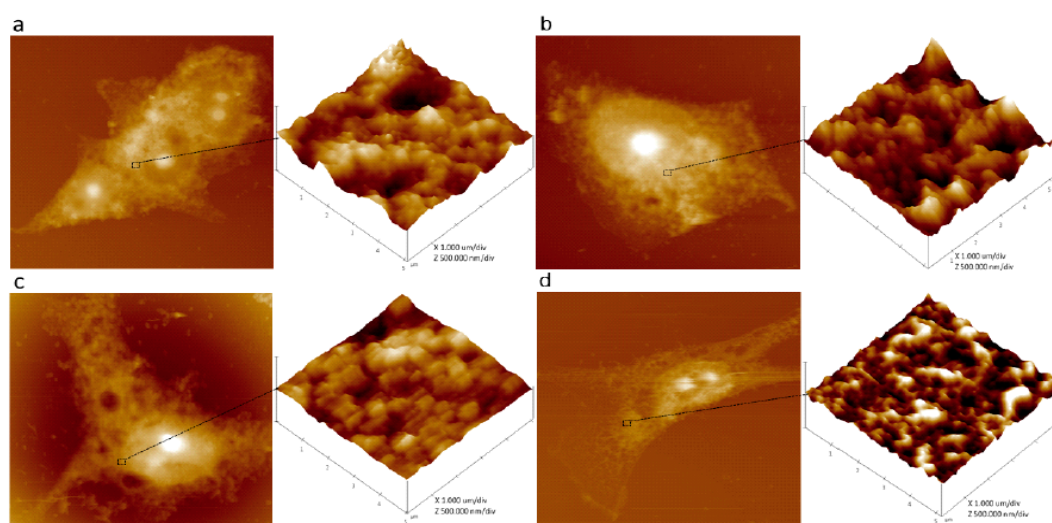


Figure 3. AFM image of (a) SKBR3 cells attached on a FSNP (image size: 55.5 μm × 55.5 μm, with z-scale: 0–3.0 μm); (b) MCF-7 cell attached on a FSNP (image size: 35.0 μm × 35.0 μm, with z-scale: 0–3.0 μm); (c) T47D cell attached on a FSNP (image size: 35.1 μm × 35.1 μm, with z-scale: 0–2.1 μm) and (d) MDA-MB-231 cell attached on a FSNP (image size: 50.0 μm × 50.0 μm, with z-scale: 0–3.0 μm). 3D images of the insert (5.0 μm × 5.0 μm) show a segment of the plasma membrane of each cell selected for surface roughness analysis.

Table 1 shows the results of the surface roughness analysis. In conclusion, we believe that AFM analysis did not satisfy our expectations and is not sufficiently good to discriminate different cell attachments or different cell lines with different HER2 expression.

Table 1. Measurements of the surface roughness by AFM of the different breast cancer cell plasma membranes. The results are shown as: mean \pm S.D.

Breast Cancer Cell Line	RMS _[Rq] (nm)
SKBR3/FSNP	48.9 \pm 15.2
SKBR3/Au(111)	39.3 \pm 7.2
MCF-7/FSNP	43.0 \pm 6.8
MCF-7/Au(111)	58.9 \pm 9.3
T47D/FSNP	50.1 \pm 10.7
T47D/Au(111)	88.4 \pm 27.8
MDA-MB-231/FSNP	40.2 \pm 13.3
MDA-MB-231/Au(111)	43.4 \pm 8.1

Additionally, cellular samples were analyzed by SERS technique. Two types of substrates were used: a clean Au(111) substrate and our specially prepared FSNP with high affinity for HER2 expressed by the breast cancer cell lines analyzed. All Raman measurements were performed at least 30 times in the range of 600–1800 cm^{-1} , where the main peaks were observed. In all spectra, the peaks at 1002 cm^{-1} (Phe), 1030 cm^{-1} (Phe), 1340 cm^{-1} (Amide III), 1450 cm^{-1} (CH_2 and CH_3 asymmetric) and 1667 cm^{-1} (Amide I) were found. Figure 4 shows the obtained SERS spectra of four different breast cancer cell lines (SKBR3, MCF-7, T47D and MDA-MB-231) attached on FSNP (a) and on a flat Au(111) substrate (b), respectively.

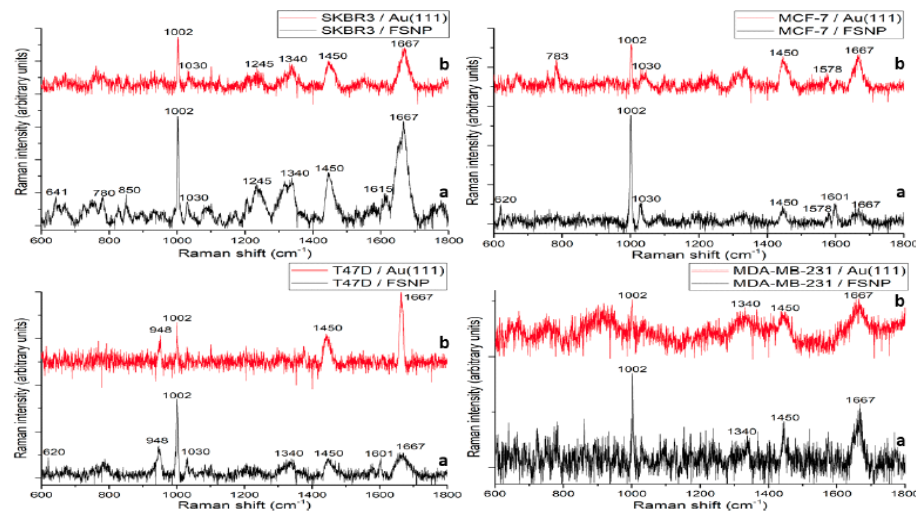


Figure 4. Raman spectra of four different breast cancer cell lines: SKBR3, MCF-7, T47D and MDA-MB-231 (a) attached on a FSNP and (b) attached on a flat substrate of Au(111).

A considerable difference was obtained in the spectra between the two substrates used. All spectra were taken through the cells, preferentially on the nucleus part. Raman spectra obtained on FSNP have higher peak intensity, better peak definition and higher S/N ratio. We believe this improvement is due to SERS phenomena, despite the fact that our cell layer is several times thicker than the theoretically predicted length evanescent electromagnetic field for a nanostructured surface, which is confined to less than 30 nm. Therefore, using FSNP provides specific attachment of the breast cancer cells with differential HER2 expression and better Raman spectra, which is a great advantage in comparison with the plain gold substrate. All Raman spectra shown were baseline-corrected using the adaptive

iteratively reweighted penalized least squares algorithm by Zhang et al. [42] and their assignments are in accordance with scientific literature [43–46] and are summarized in Table 2.

Table 2. Tentative Raman assignments. Abbreviations: (tw) twist, (U) uracil, (A) adenine, (G) guanine, (C) cytosine, (T) thymine, (br) breathing, (str) stretching, (bk) backbone, (sym) symmetric, (def) deformation, (p) protein.

Raman Shift (cm^{-1})	Tentative Assignment
1667	T, G, C, p: Amide I random coil
1615	Tyr, Trp, p: C=C
1601	Phe, Tyr, p: C=C
1578	A, G
1450	CH ₂ def
1335–1340	A, G, p: CH def
1245	Amide III β -sheet
1030	C-H Phe
1002	Phe sym ring br
948	N-C α -C
850	Tyr ring br
780–783	U, T, C ring br; O-P-O str bk
641	C-C Tyr tw
620	C-C Phe tw

The most prominent peaks identified in the Raman spectra for all cell lines are at: 1002 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} attributed to the phenylalanine symmetric ring breathing and the phenylalanine C-H, respectively. The band at 1667 cm^{-1} is due to the amino acid Amide I vibration. According to the scientific literature, the Raman band at 1667 cm^{-1} is mainly attributed to protein Amide I probably from the cell membrane. Some Raman bands can show an overlap of vibrations and others can be Raman inactive. Therefore, using FSNP with high affinity and specificity for breast cancer cells will be of great advantage in the process of detection of such illness by SERS.

The optical image in Figure 5a shows a T47D breast cancer cell attached on a FSNP (just as an example). This breast cancer cell line was incubated during 24 h on a FSNP under pseudo-physiological conditions ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) and then fixed with an ethanol dehydration train. Raman spectra were taken at two positions: one on the cell nucleus (Figure 5b) and another, on FSNP after cell fixation (Figure 5c). The Raman spectrum (Figure 5c) on the surface of FSNP does not present any features, which clearly shows that the above obtained spectra were originated from the cell material.

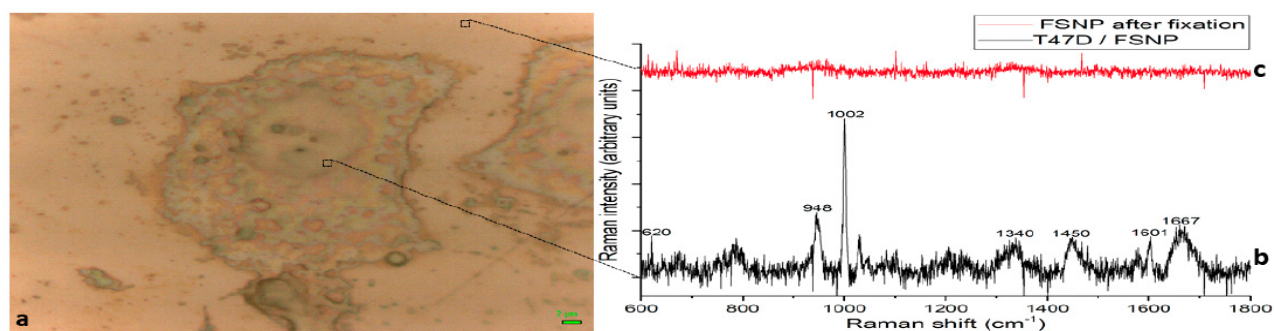


Figure 5. (a) Optical image of a T47D cell attached on a FSNP; (b) Raman spectrum of the T47D breast cancer cell attached on a FSNP and (c) Raman spectrum of the FSNP after cell fixation by an ethanol dehydration train. Scale bar: $2\text{ }\mu\text{m}$.

It means that the prepared FSNP could lead to the development of a biosensor for rapid, direct and highly sensitive identification of breast cancer cells.

At this point, it is interesting to compare spectral peak characteristics between the four cell lines with differential HER2 expression. The obtained Raman peak positions are the same in all spectra, however the intensity ratio between the peaks within each cell line is different. Note that for comparisons, spectra with same S/N were used. The comparison was carried out between the ratio of the two prominent Raman peak intensities: 1002 cm^{-1} and 1667 cm^{-1} . The ratios were determined at each spectrum independently and then compared as a function of HER2 expression (Figure 6a–d). The $1002\text{ cm}^{-1}/1667\text{ cm}^{-1}$ ratio is proposed because these peaks are the most prominent in our Raman spectra. Furthermore, a direct relation between this ratio and the HER2 expression was seen in the different cell lines with the exception of SKBR3.

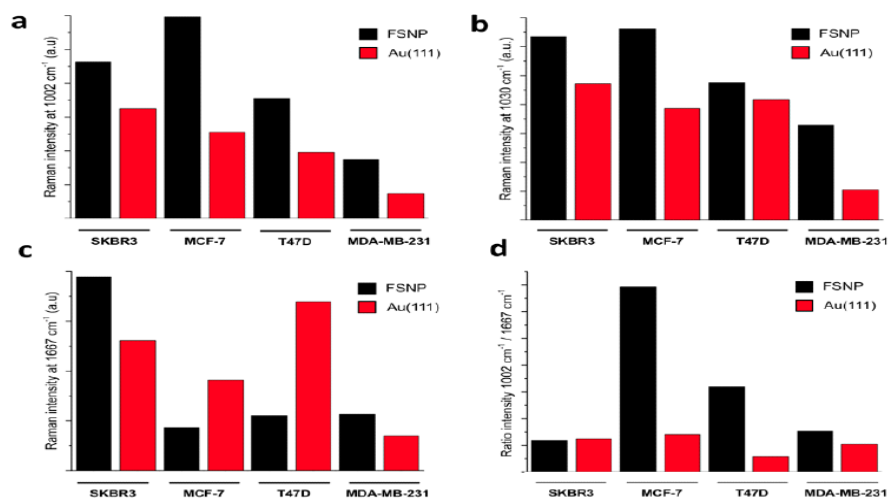


Figure 6. Raman intensities at (a) 1002 cm^{-1} ; (b) 1030 cm^{-1} ; (c) 1667 cm^{-1} and (d) the ratio $1002\text{ cm}^{-1}/1667\text{ cm}^{-1}$ of the different breast cancer cell lines.

By means of this analysis, we found a tendency of the Raman intensity at 1002 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1667 cm^{-1} and $1002\text{ cm}^{-1}/1667\text{ cm}^{-1}$ for the different breast cancer cell lines used in the present work. In Figure 6a–b, the Raman bands at 1002 cm^{-1} and 1030 cm^{-1} show a relationship similar to that found through CLSM. The Raman peaks located at 1002 cm^{-1} and 1030 cm^{-1} (associated with phenylalanine amino acid) for cell lines: SKBR3 and MCF-7 are of higher intensity than T47D and MDA-MB-231, which is in clear agreement with differential expression of HER2 surface receptor. These was observed for both surfaces: Au(111) and FSNP. Thus, using FSNP, the signal is very well defined and intense and has a higher signal-to-noise ratio. Therefore, FSNP is better option for SERS than the Au(111) plate. Based on the obtained results, we propose a new platform Figure 6c does not show any trend. We have evaluated Figure 6d that shows the ratio between the Raman intensity at 1002 cm^{-1} and 1667 cm^{-1} , except for the data of SKBR3 cell line showing an unusual intensity at 1667 cm^{-1} . We considered that it follows the same tendency mentioned before. The data presented here clearly show that SERS technique with a FSNP could be a powerful platform for cancer cell detection and identification of breast cancer cells with differential HER2 expression. A further development of this new platform includes its evaluation under physiological conditions.

4. Conclusions

Four breast cancer cell lines with different HER2 expression were studied by means of three different techniques: CLSM, AFM and SERS. The goal was to develop a platform for possible cancer cell identification and distinction between cells with different HER2 expression. Results obtained by CLSM show differences in the presence and distribution of HER2 on the cell surface membranes. HER2 expression from high to low was found to follow the order: SKBR3, MCF-7, T47D and MDA-MB-231, respectively. The obtained results are in agreement with the previous literature and knowledge.

AFM images obtained at nanometric level with high resolution show differences in surface morphology of the investigated cell lines but without significant changes in surface roughness to be used as a basis for development of a new platform. In order to use highly sensitive SERS, a new type of substrate was developed: functionalized silver nanostructured plate (FSNP) with a preadsorbed anti-HER2 (trastuzumab) layer, which provides a specific interaction between FSNP and HER2 expressed at the cancer cell surface. Indeed, our SERS results revealed that breast cancer cells show high affinity for the FSNP substrate, higher than for the bare gold samples. The SERS spectra of higher quality (higher S/N ratio and the excellent peak definition) were obtained with FSNPs. Among the different peaks identified in the spectra for different cell lines, peaks of higher intensity appear at: 1002 cm^{-1} and 1030 cm^{-1} , associated with the phenylalanine amino acid.

The analysis of SEARS peaks shows that cell lines with higher HER2 expression (SKBR3 and MCF-7) exhibit higher Raman intensity at 1002 cm^{-1} than T47D and MDA-MB-231. These findings are in agreement with our results obtained by immunofluorescence, so there is some correlation between the two techniques. We can say that the most intense SERS signal is probably due to the coupling between trastuzumab and the silver nanostructured surface.

In general, the tendencies of the SERS effect with the FSNP and Au(111) plate are very similar; however, in the case of FSNP, the signal is very well defined and intense and has a higher signal-to-noise ratio. Therefore, we believe that the FSNP is better option for SERS than the Au(111) plate. Based on the obtained results, we propose a new platform capable of recognizing breast cancer cells with HER2 expression by using a FSNP with SERS technique. This platform could be used for cells with different HER2 expression levels and is mostly based on the identification of the most prominent Raman peak at 1002 cm^{-1} .

Author Contributions: The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by SECITI-CDMX grant number ICyTDF/274/2010-12411497 and CONACyT-Mexico grant number INFR-2016-01-270227.

Acknowledgments: A. Téllez-Plancarte thanks the CONACyT for the PhD scholarship (507572/286007) provided for Postgraduate studies in Chemistry at UAM-I (I.D. 1825). We are grateful for the technical support provided by Confocal Microscopy Laboratory, Division of Biological and Health Sciences and Division of Science and Engineering of Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus, Mexico City, Mexico.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing financial interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mohar-Betancourt, A.; Reynoso-Noverón, N.; Armas-Texta, D.; Gutiérrez-Delgado, C.; Torres-Domínguez, J.A. Cancer trends in Mexico: Essential data for the creation and follow-up of public policies. *J. Glob. Oncol.* **2017**, *3*, 740–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tothill, I.E. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ferguson, K.M.; Berger, M.B.; Mendrola, J.M.; Cho, H.S.; Leahy, D.J.; Lemmon, M.A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 507–517. [[CrossRef](#)]
5. Yarden, Y.; Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bazley, L.A.; Gullick, W.J. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr. Relat. Cancer* **2005**, *12* (Suppl. 1), S17–S27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cho, H.S.; Mason, K.; Ramyar, K.X.; Stanley, A.M.; Gabelli, S.B.; Denney, D.W., Jr.; Leahy, D.J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **2003**, *421*, 756–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Eladdadi, A.; Isaacson, D. A mathematical model for the effects of HER2 overexpression on cell proliferation in breast cancer. *Bull. Math. Biol.* **2008**, *70*, 1707–1729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hudis, C.A. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 39–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Valabrega, G.; Montemurro, F.; Aglietta, M. Trastuzumab: Mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol.* **2007**, *18*, 977–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Loo, L.; Capobianco, J.A.; Wu, W.; Gao, X.; Shih, W.Y.; Pourrezaei, K.; Robinson, M.K.; Adams, G.P. Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3392–3397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Monteiro, J.P.; Predabon, S.M.; Bonafé, E.G.; Martins, A.F.; Brolo, A.G.; Radovanovic, E.; Girotto, E.M. SPR platform based on image acquisition for HER2 antigen detection. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 045206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, M.; Cushing, S.K.; Wu, N. Plasmon-enhanced optical sensors: A review. *Analyst* **2015**, *140*, 386–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kneipp, J.; Kneipp, H.; Kneipp, K. SERS—a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1052–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yamamoto, Y.S.; Itoh, T. Why and how do the shapes of surface-enhanced Raman scattering spectra change? Recent progress from mechanistic studies. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *47*, 78–88. [[CrossRef](#)]
16. Itoh, T.; Yamamoto, Y.S.; Ozaki, Y. Plasmon-enhanced spectroscopy of absorption and spontaneous emissions explained using cavity quantum optics. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 3904–3921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yamamoto, Y.S.; Ishikawa, M.; Ozaki, Y.; Itoh, T. Fundamental studies on enhancement and blinking mechanism of surface-enhanced Raman scattering (SERS) and basic applications of SERS biological sensing. *Front. Phys.* **2014**, *9*, 31–46. [[CrossRef](#)]
18. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ju, H.; Zhang, X.; Wang, J. Nanomaterials for Immunosensors and Immunoassays. In *NanoBiosensing; Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*; Springer: New York, NY, USA, 2011. [[CrossRef](#)]
20. Li, S.; Zhang, Y.; Xu, J.; Li, L.; Zeng, Q.; Lin, L.; Guo, Z.; Liu, Z.; Xiong, H.; Liu, S. Noninvasive prostate cancer screening based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *105*, 091104. [[CrossRef](#)]
21. Huang, Z.; McWilliams, A.; Lui, H.; McLean, D.I.; Lam, S.; Zeng, H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*, 1047–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhu, J.; Zhou, J.; Guo, J.; Cai, W.; Liu, B.; Wang, Z.; Sun, Z. Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Girish, C.M.; Iyer, S.; Thankappan, K.; Rani, V.V.D.; Gowd, G.S.; Menon, D.; Nair, S.; Koyakutty, M. Rapid detection of oral cancer using Ag-TiO₂ nanostructured surface-enhanced Raman spectroscopic substrates. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 989–998. [[CrossRef](#)]
24. Rekha, P.; Aruna, P.; Daniel, A.; Wilfred Prasanna, S.; UdayaKumar, K.; Ganesan, S.; Bharanidharan, G.; David, B. Raman spectroscopic characterization of blood plasma of oral cancer. In Proceedings of the 2013 IEEE 4th International Conference on Photonics (ICP), Melaka, Malaysia, 28–30 October 2013; pp. 135–137. [[CrossRef](#)]
25. González-Solís, J.L.; Aguiñaga-Serrano, B.I.; Martínez-Espinosa, J.C.; Ocegüera-Villanueva, A. Stage determination of breast cancer biopsy using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *AIP Conf. Proc.* **2011**, *1364*, 33–40. [[CrossRef](#)]
26. Feng, S.; Lin, J.; Huang, Z.; Chen, G.; Chen, W.; Wang, Y.; Chen, R.; Zeng, H. Esophageal cancer detection based on tissue surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 043702. [[CrossRef](#)]
27. Chaturvedi, D.; Balaji, S.A.; Bn, V.K.; Ariese, F.; Umapathy, S.; Rangarajan, A. Different phases of breast cancer cells: Raman study of immortalized, transformed, and invasive cells. *Biosensors* **2016**, *6*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bhattacharyya, S.; Wang, S.; Reinecke, D.; Kiser, W., Jr.; Kruger, R.A.; DeGrado, T.R. Synthesis and evaluation of near-infrared (NIR) dye-Herceptin conjugates as photoacoustic computed tomography (PCT) probes for HER2 expression in breast cancer. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1186–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Law, V.; Knox, C.; Djoumbou, Y.; Jewison, T.; Guo, A.C.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Arndt, D.; Wilson, M.; Neveu, V.; et al. DrugBank 4.0: Shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1091–D1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fekete, S.; Beck, A.; Fekete, J.; Guillarme, D. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: PH gradient approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *102*, 282–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Scaffidi, J.P.; Gregas, M.K.; Seewaldt, V.; Vo-Dinh, T. SERS-based plasmonic nanobiosensing in single living cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1135–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fischer, M.J.E. Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In *Surface Plasmon Resonance; Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; De Mol, N.J., Fischer, M.J.E., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Volume 627. [[CrossRef](#)]
33. Wilson, K.S.; Roberts, H.; Leek, R.; Harris, A.L.; Geradts, J. Differential gene expression patterns in HER2/*neu*-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1171–1185. [[CrossRef](#)]
34. Emde, A.; Mahlknecht, G.; Maslak, K.; Ribba, B.; Sela, M.; Possinger, K.; Yarden, Y. Simultaneous inhibition of estrogen receptor and the HER2 pathway in breast cancer: Effects of HER2 abundance. *Transl. Oncol.* **2011**, *4*, 293–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Etti, I.C.; Abdullah, R.; Kadir, A.; Hashim, N.M.; Yeap, S.K.; Imam, M.U.; Ramli, F.; Malami, I.; Lam, K.L.; Etti, U.; et al. The molecular mechanism of the anticancer effect of artonin E in MDA-MB 231 triple negative breast cancer cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cordo Russo, R.I.; Béguelin, W.; Díaz Flaqué, M.C.; Proietti, C.J.; Venturutti, L.; Galigniana, N.; Tkach, M.; Guzmán, P.; Roa, J.C.; O'Brien, N.A.; et al. Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance. *Oncogene* **2015**, *34*, 3413–3428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stamplecoskie, K.G.; Scaiano, J.C.; Tiwari, V.S.; Anis, H. Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 1403–1409. [[CrossRef](#)]
38. Michota, A.; Bukowska, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 21–25. [[CrossRef](#)]
39. Ma, W.Q.; Fang, Y.; Hao, G.L.; Wang, W.G. Adsorption behaviors of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold films. *Chin. J. Chem. Phys.* **2010**, *23*, 659–663. [[CrossRef](#)]
40. Lara-Cruz, C.; Jiménez-Salazar, J.E.; Ramón-Gallegos, E.; Damian-Matsumura, P.; Batina, N. Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5149–5161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 17 October 2017).
42. Zhang, Z.M.; Chen, S.; Liang, Y.Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst* **2010**, *135*, 1138–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chan, J.W.; Taylor, D.S.; Zwerdling, T.; Lane, S.M.; Ihara, K.; Huser, T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 648–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Matthews, Q.; Jirasek, A.; Lum, J.; Duan, X.; Brolo, A.G. Variability in Raman spectra of single human tumor cells cultured in vitro: Correlation with cell cycle and culture confluency. *Appl. Spectrosc.* **2010**, *64*, 871–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K.M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. Raman spectroscopy of proteins: A review. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 1061–1076. [[CrossRef](#)]
46. Matthews, Q.; Brolo, A.G.; Lum, J.; Duan, X.; Jirasek, A. Raman spectroscopy of single human tumour cells exposed to ionizing radiation in vitro. *Phys. Med. Biol.* **2011**, *56*, 19–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

