



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**Funcionalización de sustratos nanoestructurados
para el desarrollo de un biosensor basado en la
interacción anticuerpo-antígeno en células de
carcinoma de mama**

Tesis que presenta

Q. Alexandro Tellez Plancarte

para obtener el grado de **Maestro en Ciencias (Química)**

Asesor: Dr. Nikola Batina

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

Coasesor: Dr. Michel Picquart

Laboratorio de Físicoquímica de Nanoestructuras, Departamento de Física, UAM-I.

Noviembre 2014

Agradezco el apoyo económico del CONACyT, por medio de la beca (CVU/Número de becario: **507572/286007**) otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias (Química).

Adicionalmente agradezco al ICyT-DF por el apoyo económico recibido a través del proyecto **“Desarrollo de una metodología de alta sensibilidad y especificidad utilizando sustratos nanoestructurados para la detección de cáncer de mama”, (ICyTDF/274/2010-12411497)** bajo el programa: Uso de tecnologías de punta en la investigación (Enero-Diciembre 2013).

Al Dr. Luis Escobar Alarcón del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por su invaluable ayuda en la obtención de espectros Raman.

Al Dr. Emmanuel Haro Poniatowski y al Fis. José Morales Méndez por su ayuda en la preparación de los sustratos nanoestructurados por ablación láser de pulsos.

Al Dr. Nikola Batina y al Dr. Michel Picquart por permitirme formar parte de sus respectivos grupos de trabajo y darme nuevos conocimientos que confío serán de gran utilidad para posicionarme en un futuro cercano como un buen profesional. Y además, por su paciencia, humanismo y consejos.

A mis compañeros de trabajo, Carlos Lara Cruz e Israel Morales Reyes por enseñarme el manejo de equipos y cultivo celular, así como por sus acertados consejos. Adicionalmente a Norma Moreno, Teresa Varela y Elia Karina Velázquez por apoyarme en el laboratorio. A Francisco Reyes Espinoza por ayudarme en la diálisis y conjugación del anticuerpo. A Alexander Pérez de la Luz por su ayuda en la optimización de la geometría de la molécula BODIPY R6G.

A mi novia, Jessica del Rocío Arrieta Aguirre, por apoyarme en mi travesía, por sus invaluable puntos de vista y por ser mi correctora de estilo. ¡Muchísimas gracias!

A mis padres, por confiar en mi perseverancia. A mi hermano Kevin Bryan, para quien espero ser un ejemplo a seguir.

A mis sinodales:

Presidente: Dr. Nikola Batina, Departamento de Química, UAM-I

Secretario: Dr. Andrés Hernández Arana, Departamento de Química, UAM-I

Vocal: Dr. Abel Moreno Cárcamo, Instituto de Química, UNAM

Por sus valiosos comentarios y sugerencias acerca del presente trabajo de tesis.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00053

Matrícula: 2131800294

FUNCIONALIZACION DE
SUSTRATOS NANOESTRUCTURADOS
PARA EL DESARROLLO DE UN
BIOSENSOR BASADO EN LA
INTERACCION
ANTICUERPO-ANTIGENO EN
CELULAS DE CARCINOMA DE MAMA

En México, D.F., se presentaron a las 14:00 horas del día 21 del mes de noviembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA
DR. ABEL MORENO CARCAMO
DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA



ALEXANDRO TELLEZ PLANCARTE
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: ALEXANDRO TELLEZ PLANCARTE

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III 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

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA

VOCAL

DR. ABEL MORENO CARCAMO

SECRETARIO

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

ÍNDICE	Página
Resumen.....	6
Introducción.....	7
CAPÍTULO I (Objetivos)	
1.1 Justificación.....	9
1.2 Objetivos.....	9
1.2.1 Objetivo general.....	9
1.2.2 Objetivos particulares.....	9
CAPÍTULO II (Metodología)	
2.1 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	10
2.2 Espectroscopia Raman.....	12
2.2.1 Dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS).....	14
2.3 Ablación láser de pulsos (PLA).....	16
2.4 Cultivo de líneas celulares.....	17
2.4.1 Material y método.....	18
2.5 Reactivos, preparación y software.....	19
CAPÍTULO III (Resultados y discusión)	
3.1 Preparación de sustratos nanoestructurados por PLA.....	20
3.2 Caracterización de los sustratos nanoestructurados por AFM.....	22
3.3 Caracterización de los sustratos nanoestructurados con una molécula orgánica (dodecil sulfato de sodio-SDS) de prueba a través de espectroscopia Raman.....	45
3.4 Discusión y conclusiones sobre la preparación y caracterización de los sustratos nanoestructurados (NS).....	48
3.5 Funcionalización de la superficie del sustrato nanoestructurado (NS) con ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA).....	49
3.6 Caracterización por AFM del sustrato nanoestructurado con ácido 4-mercapto benzoico (NS-4-MBA).....	54
3.7 Caracterización por espectroscopia Raman del sustrato nanoestructurado con ácido 4-mercapto benzoico (NS-4-MBA).....	62
3.8 Discusión y conclusiones sobre la funcionalización del sustrato nanoestructurado.....	64

3.9 Anclaje del anticuerpo monoclonal trastuzumab al NS-4-MBA mediante la química de unión EDC/NHS.....	65
3.10 Caracterización por espectroscopia Raman del NS-4-MBA-trastuzumab.....	70
3.11 Caracterización por AFM del NS-4-MBA-trastuzumab.....	73
3.12 Discusión y conclusiones sobre el anclaje del trastuzumab al sustrato nanoestructurado	77
3.13 Interacción de células de cáncer de mama (MCF-7) con el NS-4-MBA-trastuzumab.....	78
3.14 Caracterización por espectroscopia Raman del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7	80
3.15 Caracterización por microscopia óptica del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7.....	83
3.16 Caracterización por AFM del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7.....	84
3.17 Discusión y conclusiones sobre la interacción de células MCF-7 con la superficie del biosensor (Principios de funcionamiento de biosensor para detección de cáncer de mama).....	93

CAPÍTULO IV

4.1 Interacción de células MCF-7 y T47D con el sustrato nanoestructurado no funcionalizado (MCF-7 y T47D en presencia del bioconjugado BODIPY R6G-trastuzumab).....	94
4.2 Comparación de células con diferentes afinidades (MCF-7 y T47D) por el sustrato nanoestructurado no funcionalizado a través de AFM.....	98
4.2.1 Caracterización por espectroscopia Raman de BODIPY R6G-trastuzumab con células MCF-7 y T47D.....	101
4.3 Discusión y conclusiones sobre la interacción de células de cáncer con el sustrato nanoestructurado no funcionalizado en presencia de BODIPY R6G.....	103

CAPÍTULO V (Conclusiones)

5.1 Conclusiones globales.....	104
5.2 Perspectivas.....	105

Referencias

Resumen

La tecnología de los biosensores posee un gran potencial para una rápida, confiable y precisa detección temprana del cáncer a través del uso de biomarcadores.

En este trabajo, se describe la exitosa inmovilización del anticuerpo monoclonal recombinante para humanos (trastuzumab) sobre un soporte sólido nanoestructurado de plata hecho por ablación láser de pulsos.

Se logró la inmovilización del trastuzumab vía monocapas auto-ensambladas de ácido 4-mercapto benzoico activadas a través de los reactivos de acoplamiento EDC/NHS, preservando su conformación nativa similar a la de solución. Esto último es una tarea crucial en el desarrollo de cualquier inmunosensor.

El biosensor diseñado fue capaz de reconocer, en condiciones fisiológicas, el dominio extracelular de los receptores HER2 sobreexpresados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El reconocimiento celular (anticuerpo-antígeno) fue detectado a través de dispersión Raman mejorada por el efecto de la superficie (SERS). Así mismo, verificamos que el diseño del biosensor fuese óptimo a través de AFM y SERS.

Introducción

Un biosensor es un dispositivo analítico que tiene un elemento de reconocimiento molecular (bioreceptor) sobre su superficie, el cual al interactuar con el analito (ligando) lleva a cabo una unión específica o reacción bioquímica y mediante un transductor (unidad de conversión de señal), la señal que resulta de la interacción se convierte a una señal eléctrica. La intensidad de la señal generada es directa o inversamente proporcional a la concentración del analito [1].

Existen tres principales tipos de biosensores:

- Biocatalítico (enzimas)
- Inmunológico (anticuerpos)
- Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Los principales tipos de transductores son:

- Electroquímico
 - ❖ Potenciométrico
 - ❖ Amperométrico
 - ❖ Impedancia electroquímica
 - ❖ Conductimétrico
- Óptico
 - ❖ Absorción/Reflexión
 - ❖ Quimiluminiscencia
 - ❖ Fluorescencia/Fosforescencia
 - ❖ Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).
 - ❖ Resonancia de plasmón superficial propagante (PSP) presente en superficies metálicas planas o continuas.
 - ❖ Resonancia de plasmón superficial localizado (LSP) presente en superficies metálicas nanoestructuradas o semicontinuas.
- Piezoeléctrico
 - ❖ Microbalanza de cristal de cuarzo (QMC)
 - ❖ Onda acústica superficial (SAW)
- Colorimétrico

Independientemente del transductor empleado, los biosensores se dividen en dos grandes grupos:

- ✓ Etiquetado: Se basa en la detección de una etiqueta específica.
- ✓ No etiquetado: Se basa en la medición directa del fenómeno durante la unión específica o reacción bioquímica sobre la superficie.

Los bioreceptores pueden ser inmovilizados sobre la superficie (soporte) mediante:

- Fisisorción (adsorción pasiva)
 - ❖ Superficie catiónica / aniónica
 - ❖ Superficie hidrofóbica / hidrofílica
- Quimisorción (formación de enlace covalente)
 - ❖ Monocapas autoensambladas (SAMs) de moléculas heterobifuncionales

El mayor reto al inmovilizar anticuerpos, proteínas o ácidos nucleicos es:

- Retener su actividad biológica

La pérdida de actividad biológica puede ser debida a:

- ❖ Deficiente o excesiva inmovilización del bioreceptor
- ❖ Orientación no adecuada
- ❖ Desnaturalización inducida por pH, temperatura, detergentes

CAPÍTULO I

1.1 Justificación

Existe una gran necesidad de disponer de técnicas analíticas cada vez más sofisticadas con capacidad de detección a niveles nano o picomolar de sustancias nocivas o de interés médico-farmacológico con alta relación señal/ruido. Gracias a los avances recientes en el campo de la plasmónica, es posible manipular las superficies nanoestructuradas para obtener las propiedades ópticas deseadas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Establecer los fundamentos para el desarrollo de un biosensor basado en la detección de la interacción anticuerpo-antígeno en células de carcinoma de mama, haciendo uso de una superficie nanoestructurada.

1.2.2 Objetivos particulares

- Encontrar un sustrato nanoestructurado adecuado que actúe como biosensor.
- Funcionalizar el sustrato nanoestructurado.
- Usar la superficie nanoestructurada para detectar la interacción anticuerpo-antígeno en células de carcinoma de mama por espectroscopia Raman.
- Caracterizar por espectroscopia Raman las interacciones trastuzumab-receptores transmembrana en células de carcinoma de mama.

CAPÍTULO II (Metodología)

2.1 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Existen tres grandes tipos de microscopias: óptica, electrónica y por sonda de barrido (SPM) las cuales tienen sus ventajas y limitaciones.

La microscopia por sonda de barrido (SPM) tiene a su vez dos principales clasificaciones, las cuales son: microscopia de escaneo por tunelaje (STM) y microscopia de fuerza atómica (AFM).

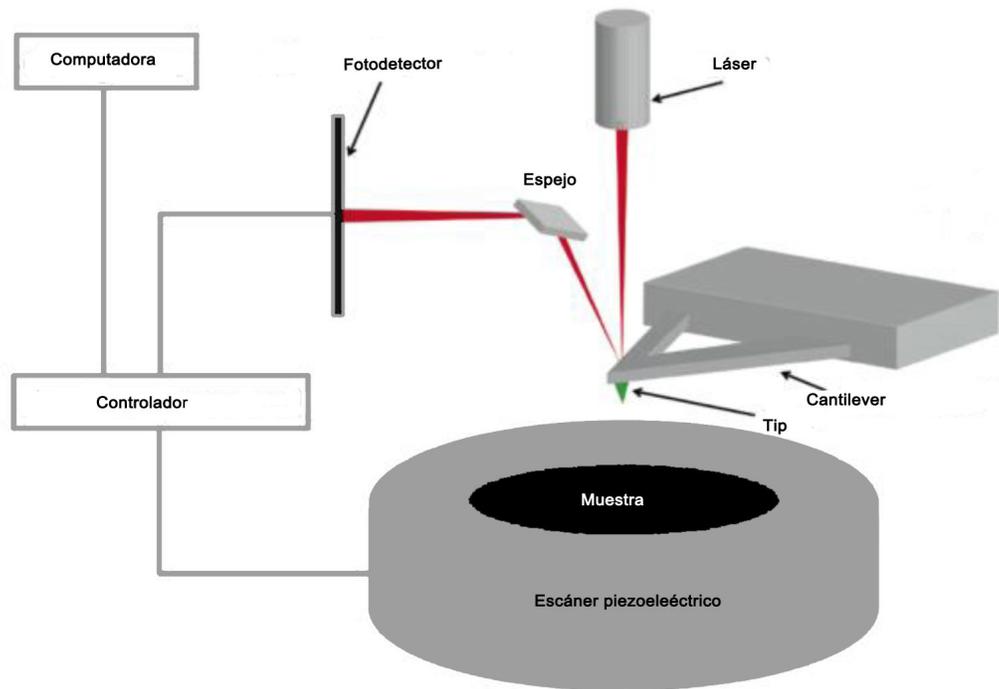
El microscopio de fuerza atómica (AFM) fue inventado por Binnig, Quate y Gerber [2] en 1986 para vencer la limitación del microscopio de escaneo por tunelaje (STM), la cual consiste en que sólo puede tomar imágenes de materiales capaces de conducir una corriente de tunelaje. En cambio el AFM crea una imagen de la topografía tridimensional de la superficie al cuantificar las fuerzas entre la sonda (punta del cantiléver) y la superficie de la muestra.

El AFM fue diseñado desde un inicio para estudiar las superficies de materiales, aunque últimamente el acoplamiento de éste con un microscopio confocal se usa para estudiar muestras biológicas.

Los tipos de estructuras que se pueden escanear con un AFM son: películas delgadas, nanoestructuras depositadas sobre una superficie, polímeros, metales, aislantes, cristales, cerámicas, etc.

Los modos estándar de operación del AFM son:

- Contacto (deflexión, altura)
- Contacto intermitente o Tapping (amplitud, altura, fase)



⁽¹⁾ **Esquema 1.** Representación esquemática de un microscopio de fuerza atómica (AFM).

Las condiciones para la obtención de la topografía de los sustratos nanoestructurados por AFM son:

Modo: Tapping

Velocidad de escaneo: 0.4-0.7 Hz

Área de escaneo: $1 \mu\text{m}^2$

Modelo: Multimode Nanoscope AFM IV (Veeco, Inc.)

Píxeles: 512

Punta: Silicio

Radio de la curvatura de punta nominal: 5-10 nm

2.2 Espectroscopia Raman

Cuando los fotones interactúan con la materia pueden ocurrir muchos procesos tales como: extinción (absorción y dispersión), reflexión, transmisión, fluorescencia o fosforescencia, etc.

La mayoría de los fotones que inciden sobre una molécula son elásticamente dispersados, es decir, siguen teniendo la misma frecuencia (Dispersión Rayleigh). Solamente una pequeñísima fracción [3] (aproximadamente 1 de cada 10^8 fotones) de los fotones incidentes son inelásticamente dispersados, es decir, cambian de frecuencia (Dispersión Raman). Estos fotones al interactuar con los modos vibracionales o rotacionales de la molécula son desplazados en frecuencia, ya sea a alta o baja frecuencia (anti-Stokes o Stokes) según la frecuencia de vibración del enlace. Todos los modos vibracionales de la molécula en conjunto dan lugar a un espectro que provee información cuantitativa acerca de la especie en estudio.

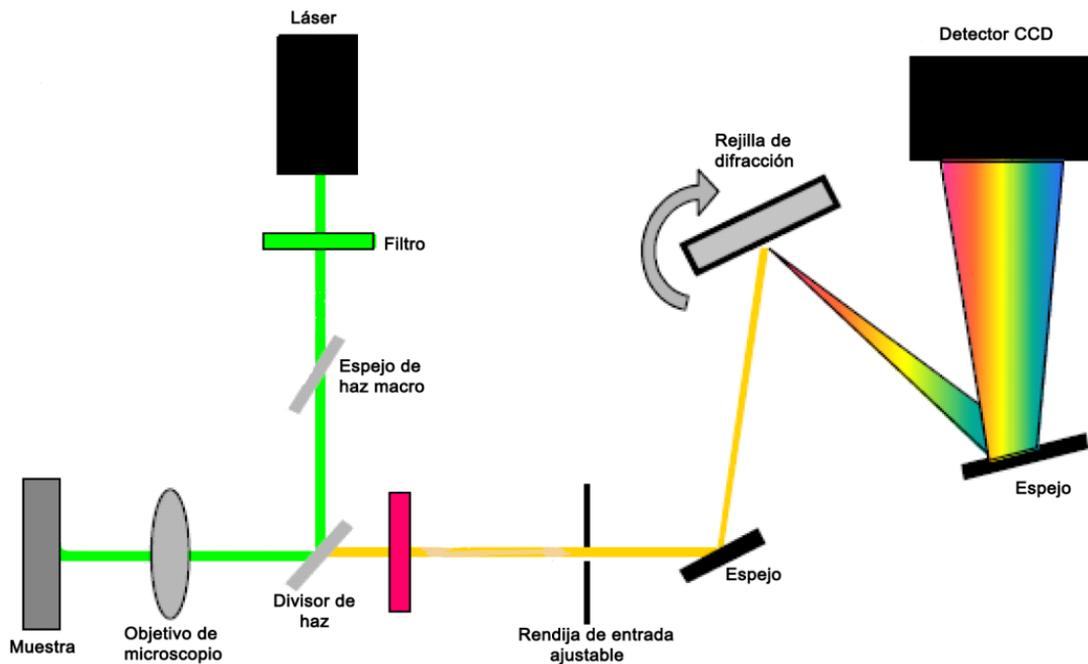
La espectroscopia Raman es una técnica espectroscópica rotovibracional que se basa en la dispersión inelástica de la luz de una fuente de excitación monocromática.

En un inicio, las mediciones Raman estuvieron limitadas a solventes puros, pero con la aparición del láser en los años sesenta el intervalo de analitos disponibles aumentó, pero las señales débiles (muy bajo cociente señal/ruido) aún limitaron la utilidad de este fenómeno para el análisis químico [4]. El espectro Raman consiste en una serie de picos que corresponde a transiciones rotacionales o vibracionales específicas a la estructura molecular, y por lo tanto provee un “huella dactilar” para identificar al analito [3].

Para explotar el potencial total de la espectroscopia Raman, se deben emplear métodos de análisis multivariado, los cuales toman en cuenta la información completa del espectro Raman y no sólo los picos prominentes. Estos métodos permiten obtener mediciones cuantitativas o de clasificación relativamente confiables. Los métodos de estadística multivariada llamados mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componentes principales (PCR) toman en cuenta la no linealidad en los datos. Son frecuentemente llamados técnicas de compresión de datos, porque minimizan el número de parámetros que se necesitan para caracterizar los espectros medidos [5]. También existen métodos más

sofisticados como son los algoritmos genéticos o las redes neuronales artificiales los cuales modelan mucho mejor la no linealidad en los datos.

La dispersión Raman (también llamada efecto Raman) fue descubierta por el físico indio C.V. Raman y K.S. Krishnan [6] en 1928, aunque su predicción teórica había sido hecha desde 1923 por Adolf Smekal [7]. Las secciones transversales de dispersión Raman típicas están entre 10^{-31} - 10^{-26} $\text{cm}^2/\text{molécula}$, las cuales resultan en una intensidad de señal muy baja, además de que se requieren tiempos de integración grandes y alta potencia de energía para generar espectros Raman con suficiente relación señal/ruido [8].



⁽¹⁾Esquema 2. Representación esquemática de un espectrómetro Raman.

2.2.1 Dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS)

En 1974 Fleischmann *et al.* reportaron la adsorción de piridina sobre un electrodo de plata rugoso producido electroquímicamente [9]. Posteriormente en 1977 Jeanmaire y Van Duyne, siguiendo la observación inicial de Fleischmann llegaron a la conclusión de que la adsorción molecular sobre o cerca de la superficie del metal noble rugoso provoca que la señal Raman incremente drásticamente debido a mecanismos de mejoramiento químico y electromagnético [10,11].

Una serie de experimentos subsecuentes confirmaron que películas de metales nobles con superficies rugosas o patrones a nanoescala pueden incrementar dramáticamente las señales de dispersión Raman de analitos al producir factores de mejoramiento (EF) de 10^4 - 10^8 sobre dispersión Raman normal [12,13]. Debido que la espectroscopia Raman sufre tradicionalmente de inherentes bajas intensidades de dispersión Raman, estos factores de mejoramiento (EF) dan lugar a la dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS), la cual es una técnica sensible a la superficie (5-10 nm de distancia superficie-adsorbato).

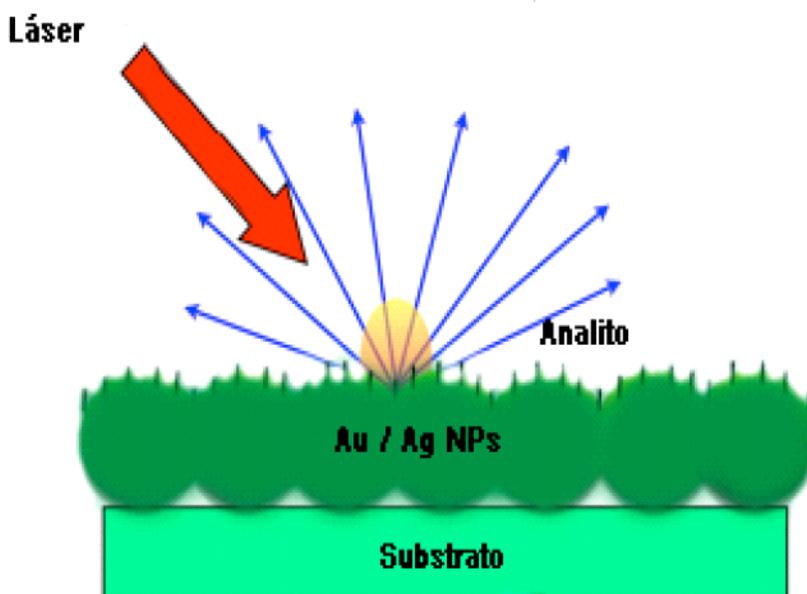
El mecanismo de mejoramiento químico no está completamente entendido, pero se postula que surge de tres procesos distintos: mejoramientos por resonancias de excitación molecular, resonancias de transferencia de carga y cambios no resonantes en la polarizabilidad molecular que ocurre durante la adsorción sobre una superficie metálica [14-16]. Este mecanismo contribuye al mejoramiento de la intensidad de dispersión Raman permitiendo que los electrones de la molécula analito interactúen con los electrones de la superficie metálica. Estas interacciones contribuyen a un mejoramiento de la señal hasta 10^2 , pero este mecanismo puede variar según los sustratos, sitios de adsorción del sustrato y las moléculas adsorbidas [17,18].

Aunque SERS no requiere que el adsorbato esté en contacto directo con la superficie metálica, el mejoramiento electromagnético decrece bruscamente conforme la distancia entre el adsorbato y la superficie incrementa. Para medir señales SERS intensas, los analitos deben estar dentro de los pocos nanómetros de la superficie del sustrato, debido a esto

muchos estudios SERS se realizan con moléculas que contienen un grupo tiol o amino los cuales se adsorben químicamente sobre la superficie metálica nanoestructurada [17].

El mecanismo de mejoramiento electromagnético es un efecto dependiente de la longitud de onda para excitar la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). El fenómeno LSPR resulta del acoplamiento de la excitación colectiva de los electrones de conducción con la luz incidente y puede ocurrir en nanopartículas (NPs) de metales nobles (Au, Ag), puntas metálicas afiladas, superficies metálicas rugosas o con patrones a nanoescala mejorando la intensidad del campo electromagnético incidente de 10^2 - 10^4 veces en la vecindad de la superficie metálica [17,19], haciendo que la dispersión de la luz sea más fuerte así como la aparición de bandas de absorción más intensas. El fenómeno LSPR es fuertemente dependiente del tamaño de las nanopartículas, forma y medio dieléctrico local.

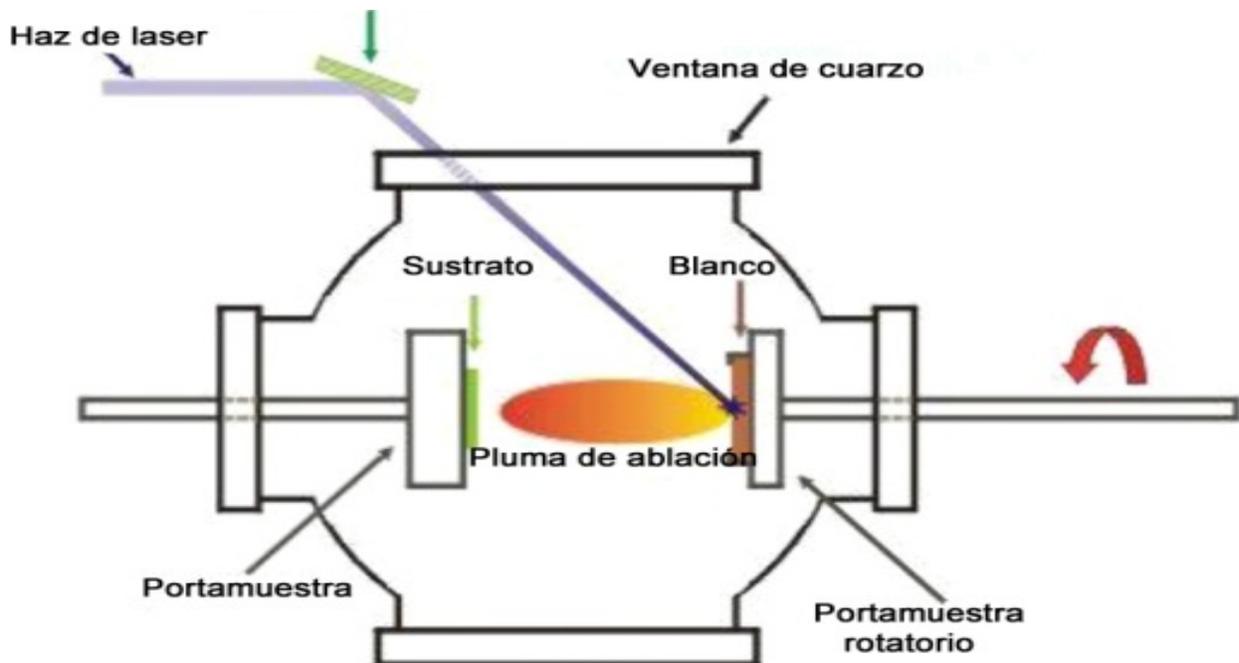
La dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS) es una técnica poderosa no invasiva para la detección sensitiva y selectiva de analitos de baja concentración, por lo que puede usarse para el desarrollo de sensores. Para lograr los límites de detección (LOD) más bajos se deben optimizar las relaciones entre la superficie nanoestructurada y la longitud de onda de excitación del láser, así como también la química de unión entre la superficie-adsorbato.



^(III)Esquema 3. Representación esquemática de la dispersión Raman mejorada por efecto de la superficie (SERS).

2.3 Ablación láser de pulsos

La ablación láser de pulsos (PLA) es una técnica muy simple en teoría, la cual usa pulsos de energía láser para remover material desde la superficie de un blanco. La pluma de plasma producida por el láser se expande rápidamente desde la superficie del blanco hasta el sustrato donde ocurrirá el crecimiento de la película cuando ésta condense. Sin embargo, en la práctica hay muchas variables que afectan las propiedades de las películas formadas, por ejemplo: presión del gas en la cámara de vacío, número de pulsos láser, distancia desde el blanco al sustrato, ángulo de incidencia, longitud de onda del láser, constante de fluencia láser y temperatura [20]. La optimización de estos parámetros requiere mucho tiempo y esfuerzo por lo que casi siempre se realiza empíricamente.



^(iv)Esquema 4. Representación esquemática del proceso de ablación láser por pulsos (PLA).

2.4 Cultivo de líneas celulares

El cultivo celular es la remoción de células de un animal o planta y su subsecuente crecimiento bajo un medio ambiente favorable. Las células se obtienen mediante:

- ✓ Remoción del tejido (cultivo primario) y posteriormente son separadas por medios enzimáticos o mecánicos.
- ✓ Una línea celular o cepa celular previamente establecida.

Normalmente las células se dividen un número finito de veces antes de perder su habilidad de proliferación (senescencia), por lo tanto este tipo de células formarían una línea celular finita. Sin embargo, las líneas celulares finitas pueden convertirse en inmortales a través de un proceso llamado transformación (el cual puede ser química o viralmente inducido). Cuando esto sucede, las células adquieren la habilidad de dividirse indefinidamente, lo cual se llama línea celular continua^(V).

Las líneas celulares continuas son muy utilizadas tanto en investigación básica como aplicada, ya que permiten realizar experimentos de una manera relativamente rápida evitando el tedioso cultivo primario, además de que emulan las características del tejido de origen, aunque realmente esto último es muy dependiente del número de pasajes (usos) de la línea celular.

Las condiciones de cultivo varían de una línea celular a otra pero su ambiente artificial invariablemente es el mismo:

- ✓ Nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales)
- ✓ Factores de crecimiento
- ✓ Hormonas
- ✓ Gases (O₂ y CO₂)
- ✓ Temperatura (37 °C)

Las líneas celulares de cáncer de mama se usan para investigar la biología del cáncer, mecanismos de acción hormonal, estudios de resistencia de fármacos, así como examinar y caracterizar nuevos agentes terapéuticos [21].

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 se derivó de una efusión pleural (fluido atrapado en una cavidad) de un sitio metastásico de una paciente caucásica de 69 años con cáncer de mama metastásico (adenocarcinoma) [22]. El desarrollo de esta importante línea celular de cáncer de mama así como de la línea celular MCF-10 (derivada de tejido mamario fibroquístico humano) [23] fue posible gracias al Dr. Herbert Soule *et al.* del *staff* de la Fundación de Cáncer de Michigan (MCF).

Las células MCF-7 son útiles en estudios *in vitro* de cáncer de mama debido a que retiene varias características del epitelio de mama, una de las cuales es la habilidad de procesar estrógeno (en forma de estradiol) vía receptores de estrógeno en el citoplasma celular.

La línea celular de cáncer de mama T47D fue aislada por I. Keydar *et al.* [24] de una efusión pleural de un sitio metastásico de una paciente de 54 años con cáncer de mama metastásico (carcinoma ductal infiltrante o invasivo).

Debido a esto, las líneas celulares continuas MCF-7 y T47D son modelos de células de carcinoma de mama.

2.4.1 Material y método

Las células MCF-7 y T47D se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, EUA) y se cultivaron en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Life Technologies, EUA), libre de rojo de fenol debido a que este imita a los estrógenos. El medio de cultivo se filtró a través de una membrana de Nylon con poros de 0.22 μm y se le agregó 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies, EUA), 100 μM de aminoácidos no esenciales, 100 μM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 250 ng/ml del antimicótico Anfotericina B (Life Technologies, EUA) y una solución comercial de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina).

2.5 Reactivos, preparación y software

N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC·HCl) (Lote:1235564, Life Technologies, EUA).

N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Lote:MKBK1707V, Pureza:98%, Sigma-Aldrich, México).

Ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA) (Lote:G0611, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA).

Clorhidrato de etanolamina (Lote:SHBC7313V, Pureza:>99.0%, Sigma-Aldrich, México).

Na₂HPO₄ (Lote:79H5400, Sigma-Aldrich, México).

NaH₂PO₄ (Lote:052K01671, Pureza:99%, Sigma-Aldrich, México).

SDS (Lote:93H04232, Pureza:>99%, Sigma-Aldrich, México).

Plata (Pureza:99.99%, Kurt J. Lesker Co., EUA).

Alcohol etílico absoluto anhídrido (Pureza:99.66 %, J.T. Baker, EUA).

Incubadora de CO₂ con chaqueta de agua US Autoflow (NuAire, EUA).

Éster de succinimidil de BODIPY[®] R6G (Lote:1081280, Life Technologies, EUA).

Multiplacas Nunclon[®] Δ de 4 pozos (Lote:D6789, Sigma-Aldrich, México).

Cantiléver para AFM de Veeco probes (Modelo: TESP, Material: silicio dopado con Antimonio (n) de 0.01-0.025 Ω-cm, sin cubierta por ambos lados, k=20-80 N/m, f₀=317-382 kHz).

Placa de oro (111) arrandee (Werther, Alemania).

Agua ultrapura de un sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

Se utilizó la calculadora *online*^(VI) para la preparación de las soluciones amortiguadoras a pH y fuerza iónica impuesta.

Se usaron los softwares OriginPro 8, Matlab R 2012b, airPLS 2.0 [25], SPIP 3D Image 6.2.4, Gaussian 09, ChemBioDraw Ultra 13.

CAPÍTULO III (Resultados y discusión)

3.1 Preparación de sustratos nanoestructurados por PLA

Es ampliamente aceptado que el mejoramiento electromagnético cerca de superficies metálicas semicontinuas (Au, Ag y Cu) es un prerrequisito para adquirir espectros Raman de superficie mejorada (SERS), pero las circunstancias detalladas bajo las cuales las superficies exhiben buenos factores de mejoramiento (EF) se comprenden pobremente y los métodos para preparar tales superficies que exhiban reproduciblemente grandes factores de mejoramiento (EF) son en su mayoría difíciles [26].

Varios sustratos para realizar SERS han sido preparados por diversas técnicas:

- ❖ Deposición electroquímica de metales [27].
- ❖ Evaporación térmica al vacío [28].
- ❖ Película metálica sobre nanoesfera (MFON) [29].
- ❖ Autoensamblado de coloides metálicos [30].
- ❖ Litografía por haz de electrones (EBL) [31].
- ❖ Reacción Tollens (espejo de plata) [32].
- ❖ Ablación laser de pulsos (PLA) [20].
- ❖ Deposición por ángulo oblicuo o inclinado (OAD o GLAD) [33].

Las películas metálicas semicontinuas pueden crecer sobre un sustrato dieléctrico o semiconductor; en el presente trabajo se usó un sustrato conductor (placa de oro arrandee).

A altas concentraciones de metal depositado, la conductividad aumenta, lo que permite que los plasmones superficiales localizados (LSP) presentes en ciertas regiones llamadas *hot spots* (energía electromagnética concentrada en áreas pequeñas de tamaño nanométrico donde los campos electromagnéticos son fuertemente mejorados permitiendo que la intensidad óptica local pueda exceder la intensidad del haz de luz incidente de 4 a 5 órdenes de magnitud) pasen a plasmones superficiales propagantes (polaritones), es decir, el número de *hot spots* se reduce significativamente manifestándose a través de una caída brusca de la intensidad Raman en SERS [34,35].

Se debe recordar que existe una relación lineal entre la intensidad Raman y la concentración del analito [36]. Si se pretende utilizar un sustrato como biosensor basado en SERS se debe poner mucha atención en este punto ya que agregaría no reproducibilidad en los factores de mejoramiento (EF) debido a la caída brusca de la intensidad Raman y por lo tanto no confiabilidad en los experimentos.

Los sustratos nanoestructurados utilizados para el desarrollo del presente trabajo de investigación se prepararon por medio de ablación láser de pulsos (PLA).

Las condiciones a las cuales se realizaron los sustratos nanoestructurados son:

Presión: $(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ torr

Energía de los pulsos láser: 10 mJ

Número de pulsos: Variable

Longitud de onda del láser: 355 nm

Tipo de láser: Q-switched Nd:YAG

Diámetro del haz del láser al blanco: 0.7 mm

Distancia blanco-sustrato: 6 cm

Duración de los pulsos: 10 ns

3.2 Caracterización de los sustratos nanoestructurados por AFM

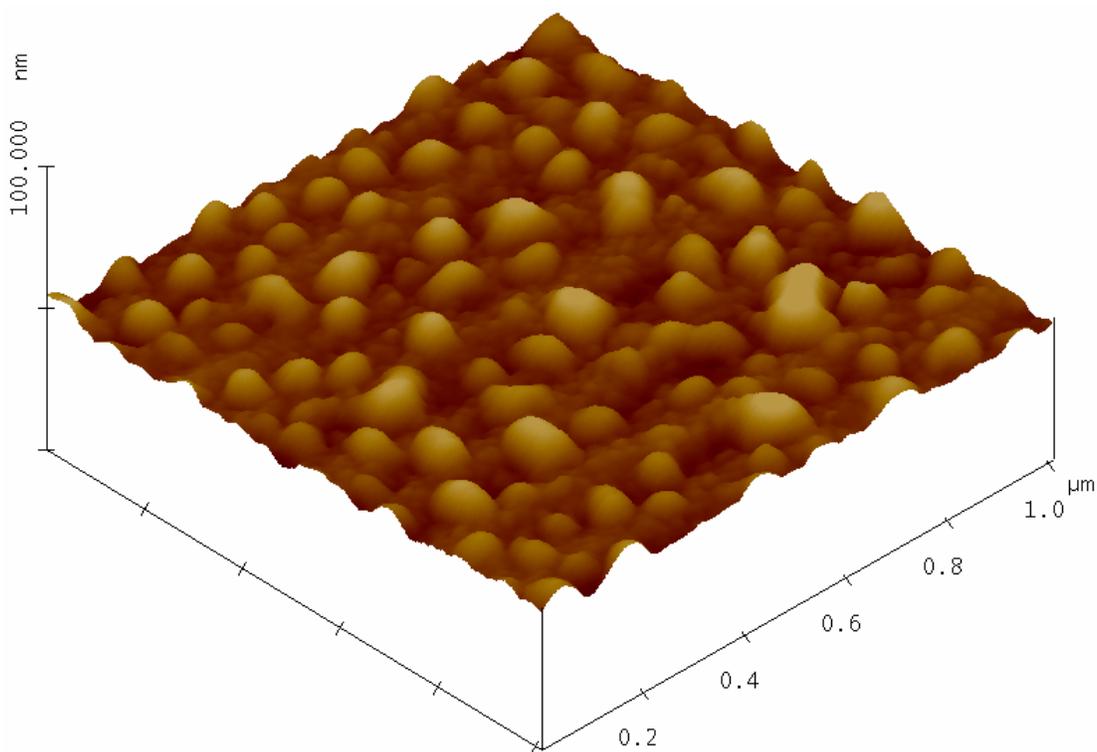
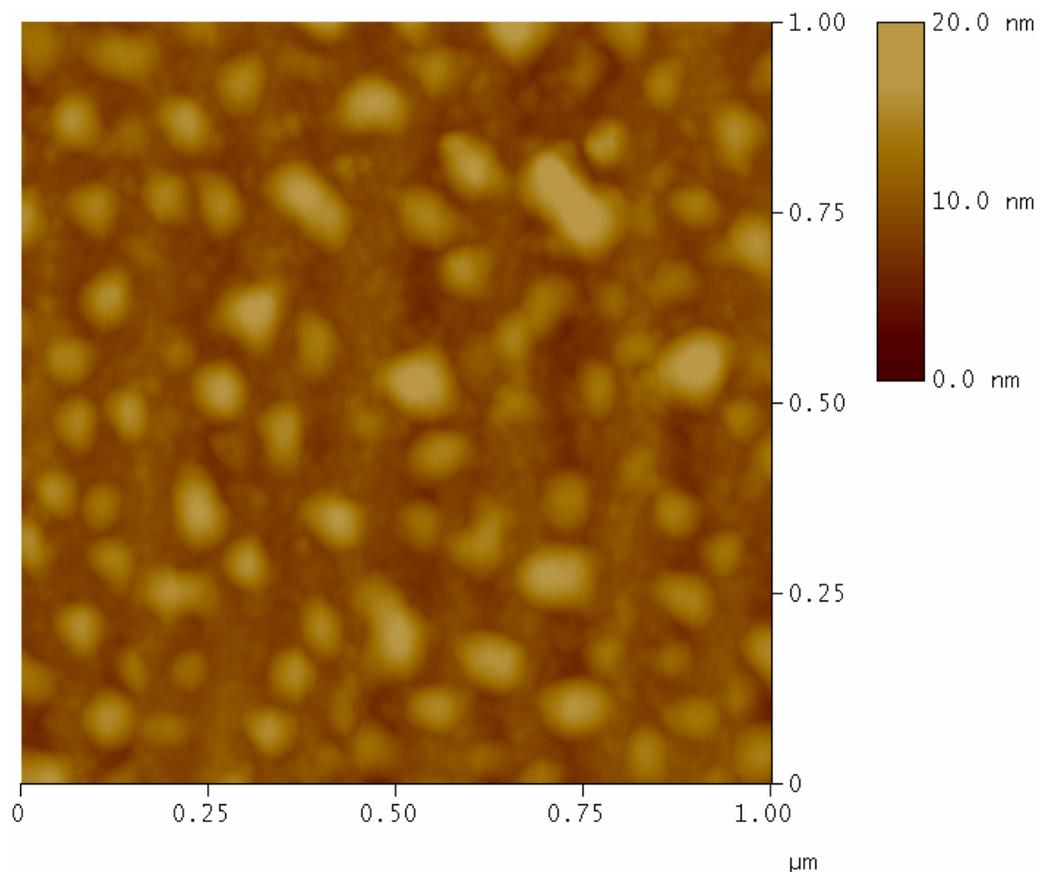


Fig. 1 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 100 p / Vidrio presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

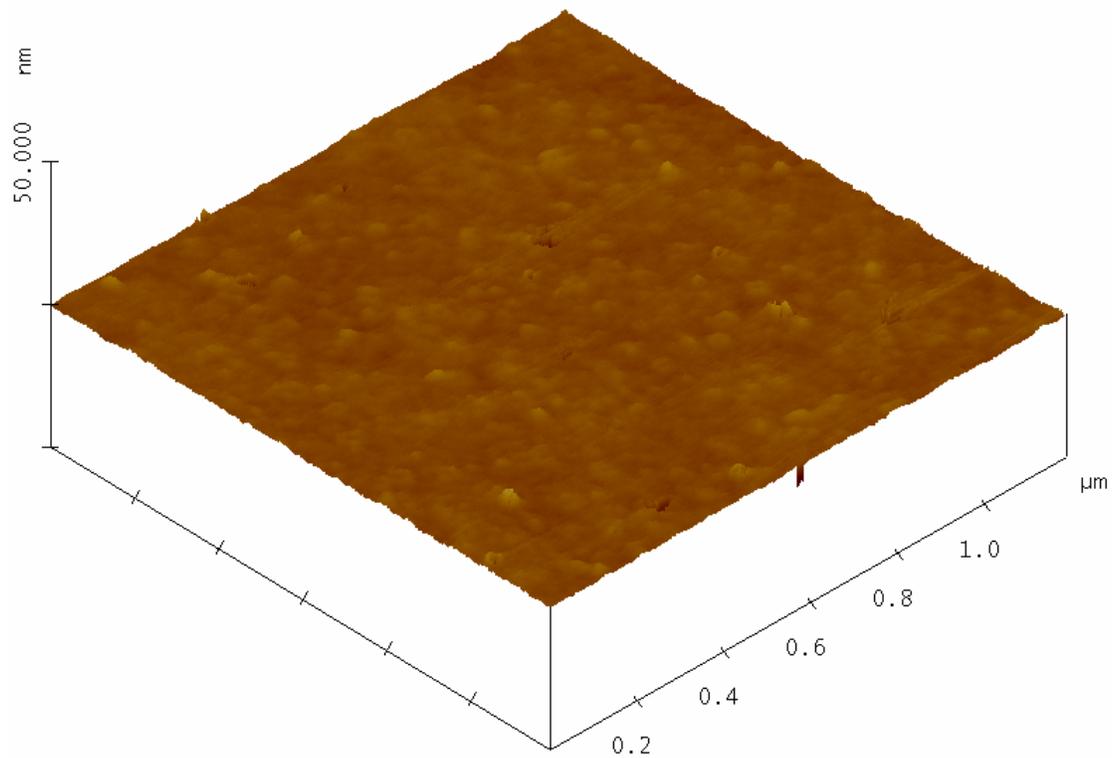
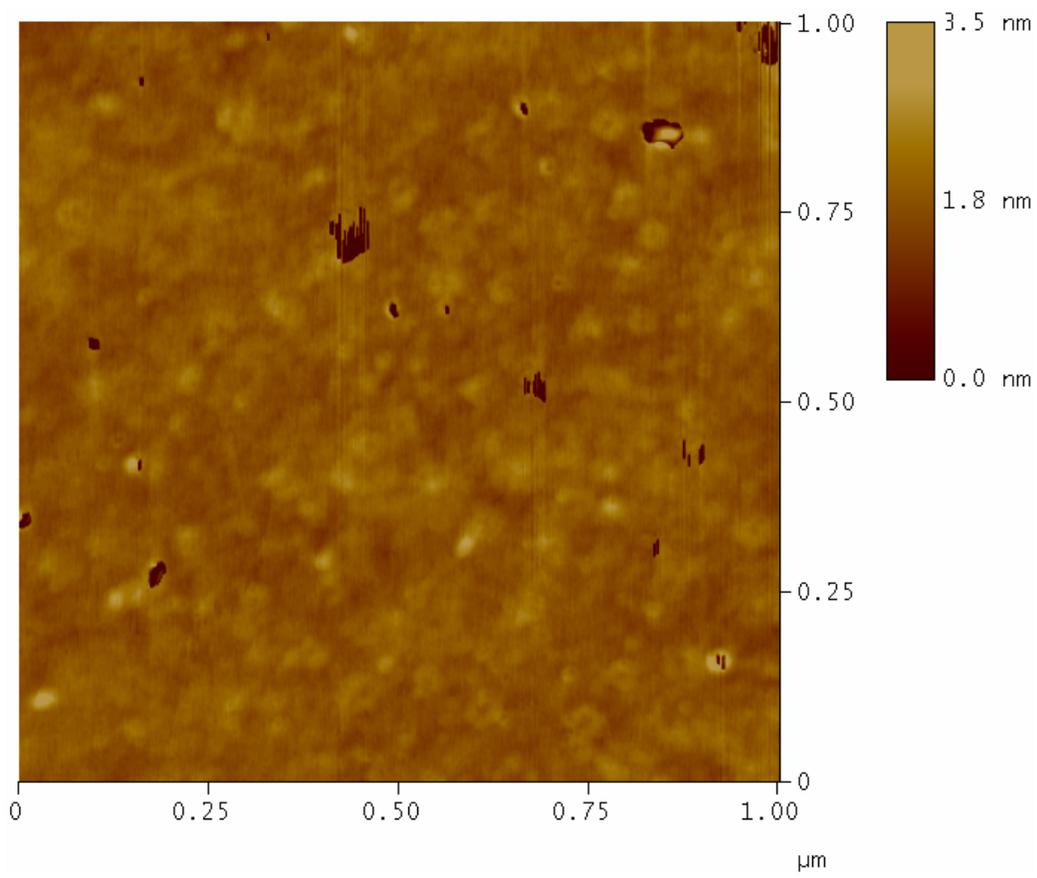


Fig. 2 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Vidrio presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

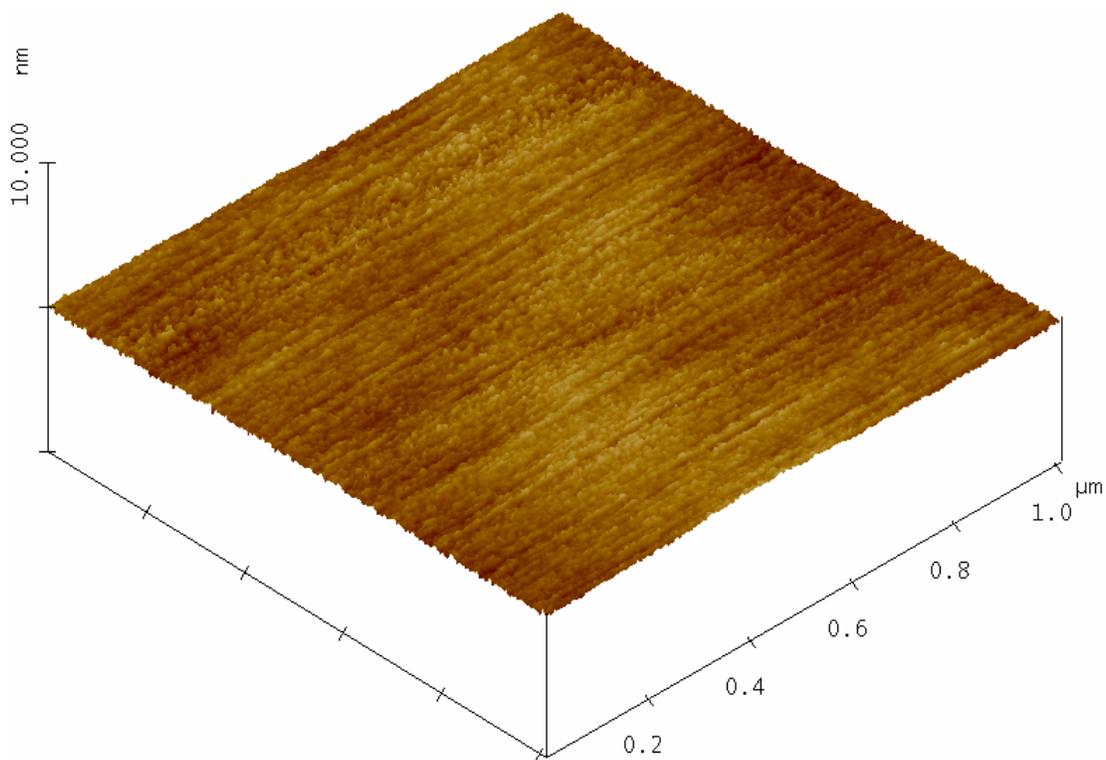
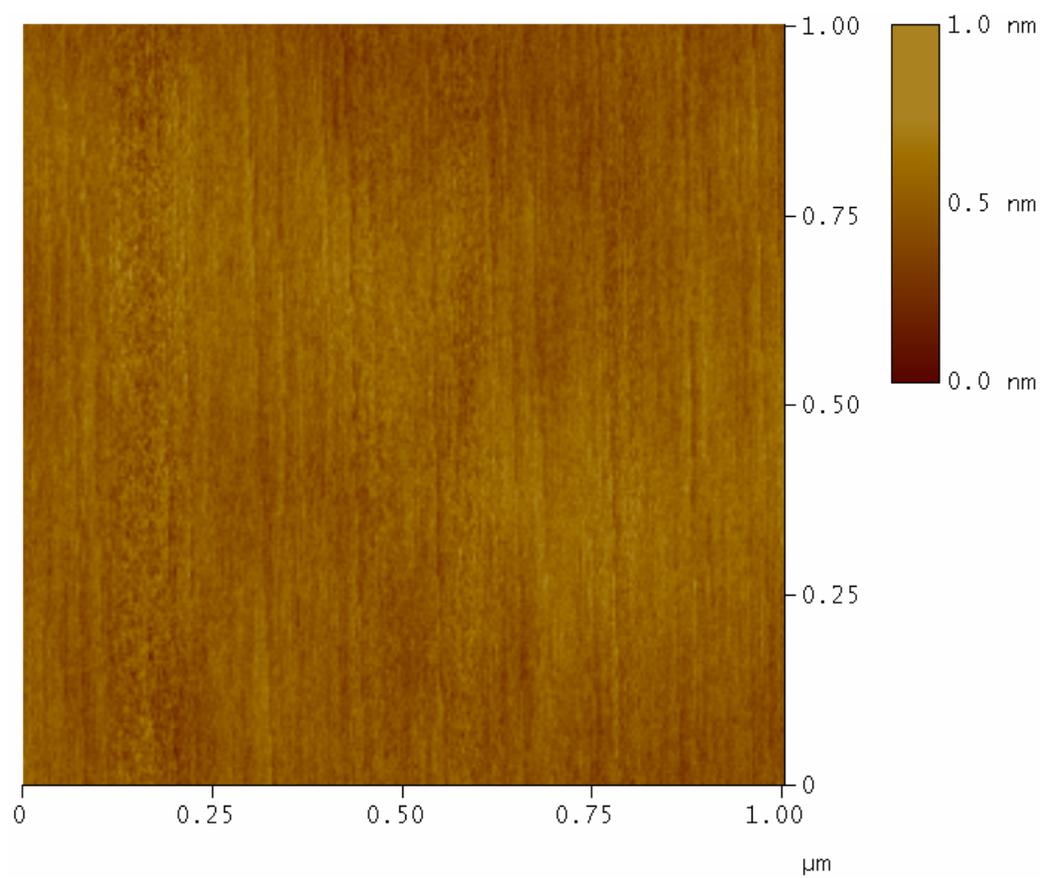


Fig. 3 Imagen AFM de una oblea de Si presentada en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

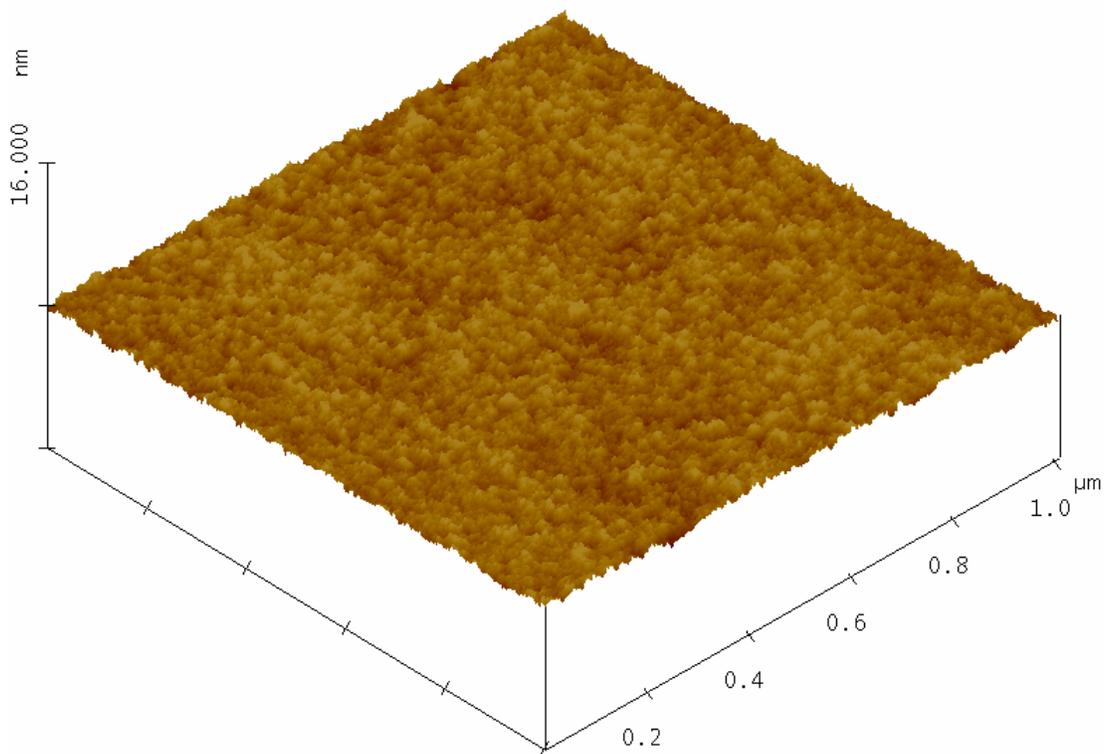
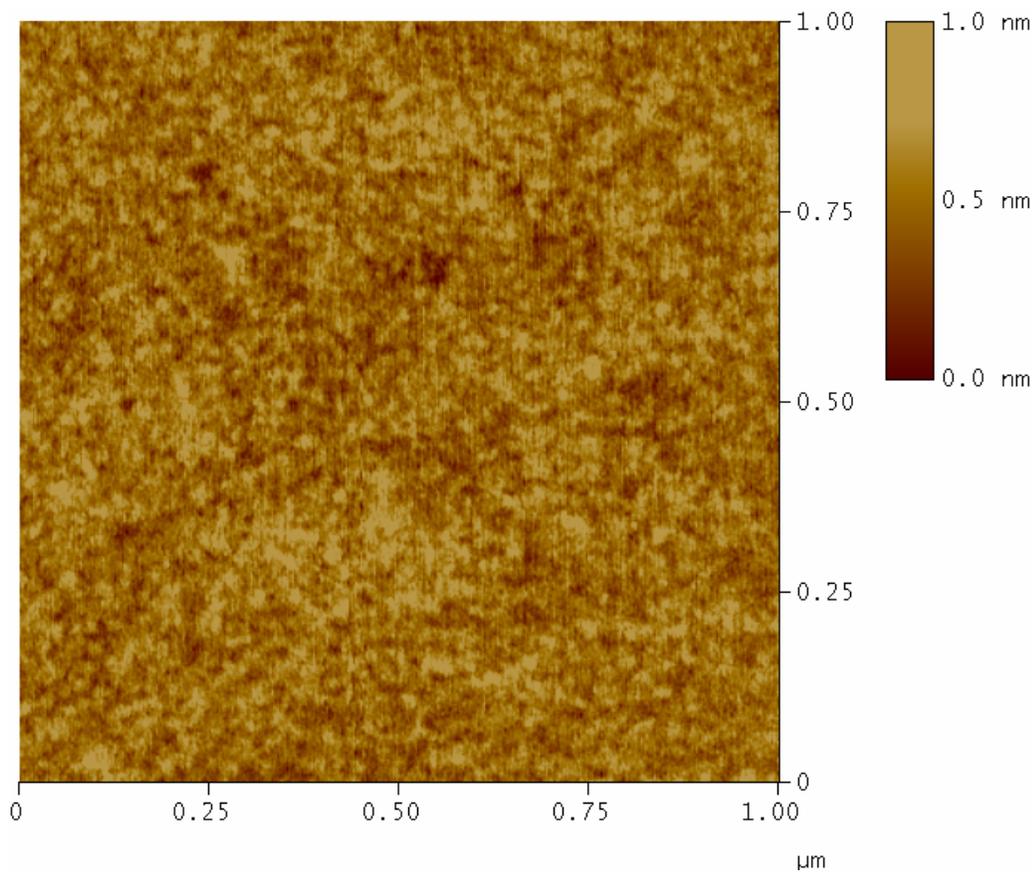


Fig. 4 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 100 p / Si presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

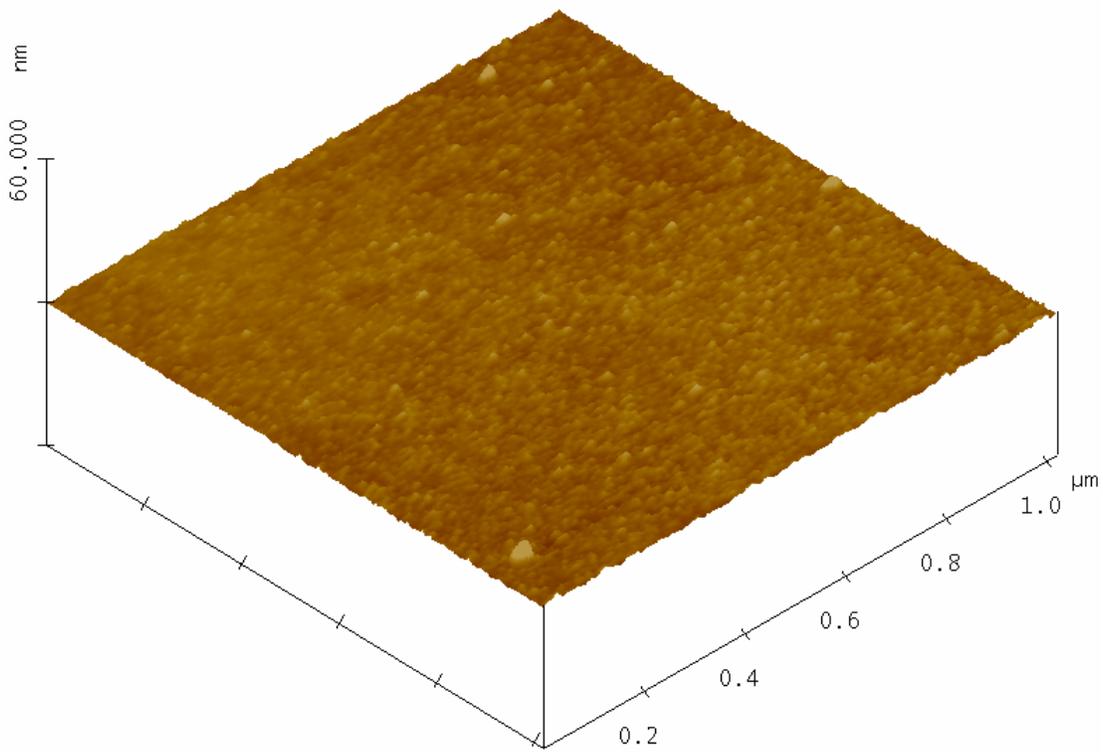
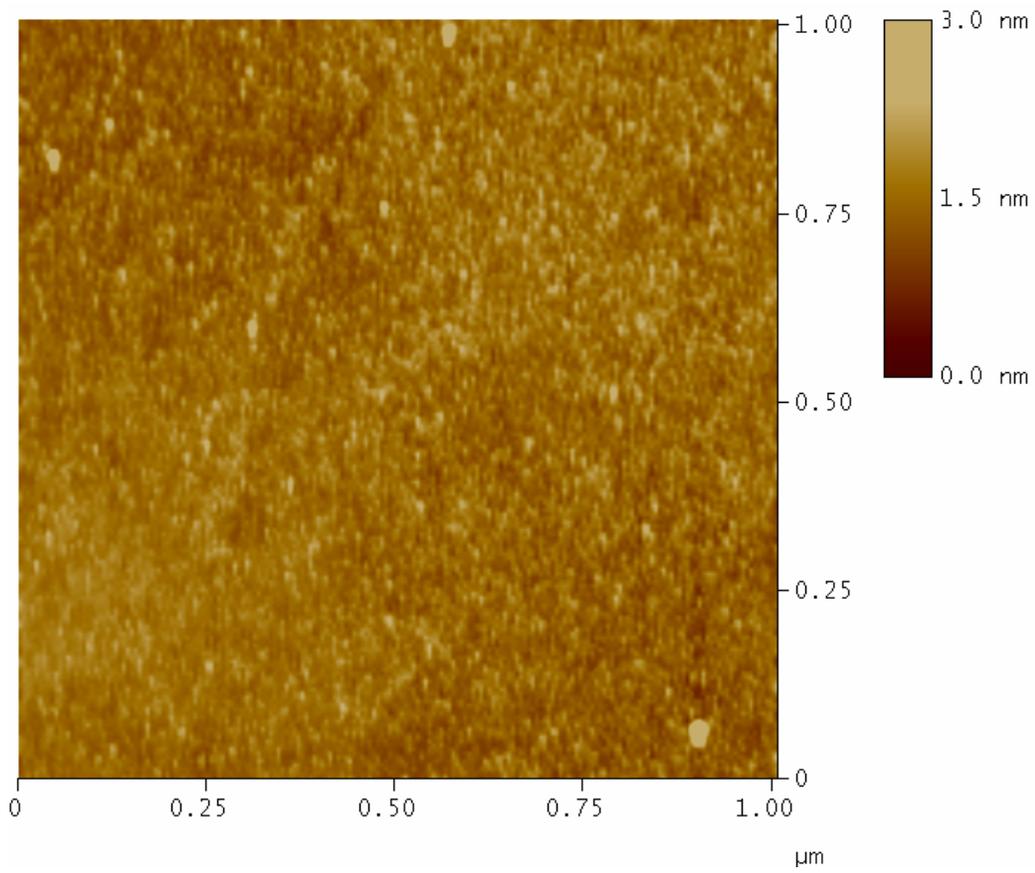


Fig. 5 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 250 p / Si presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

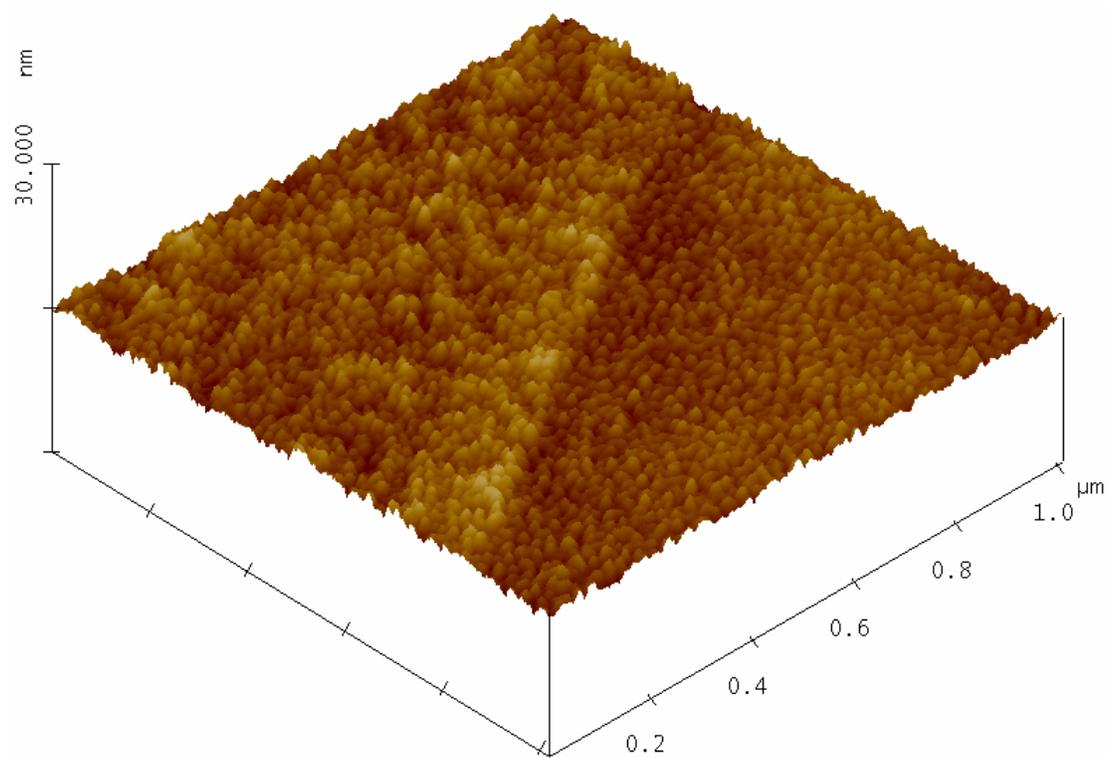
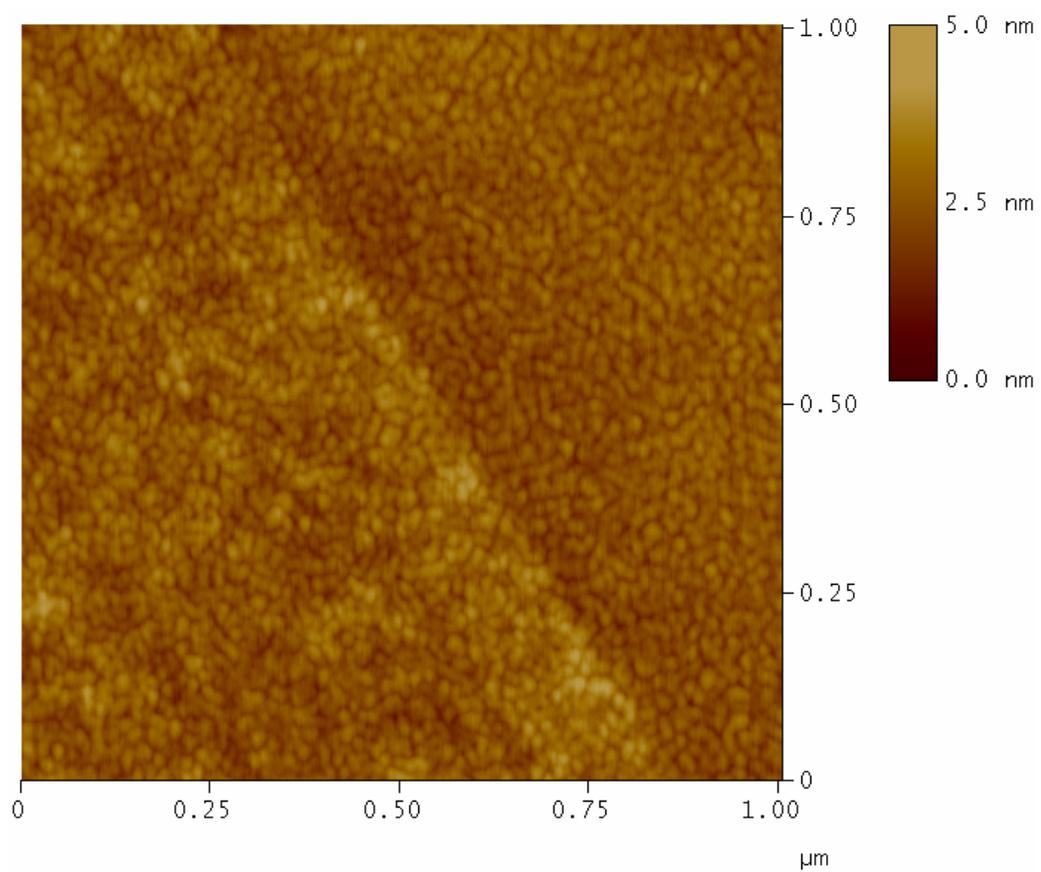


Fig. 6 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 1000 p / Si presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

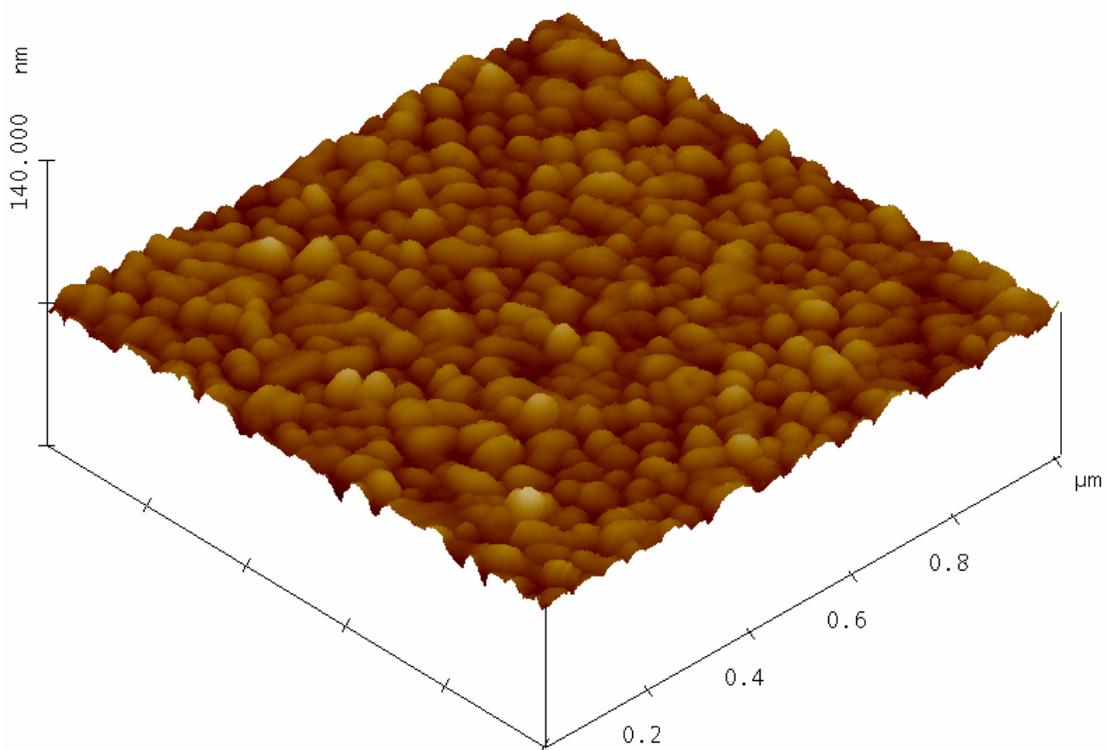
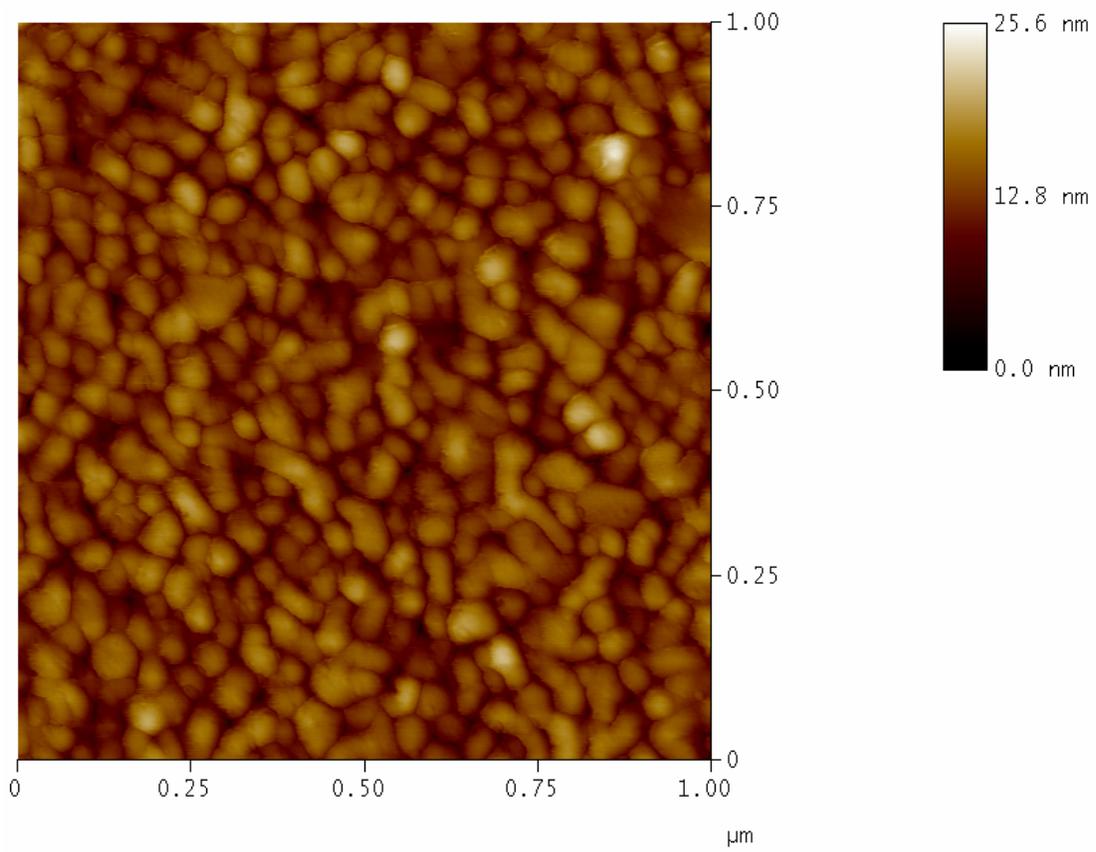


Fig. 7 Imagen AFM de Au (placa de oro arrandee) presentada en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

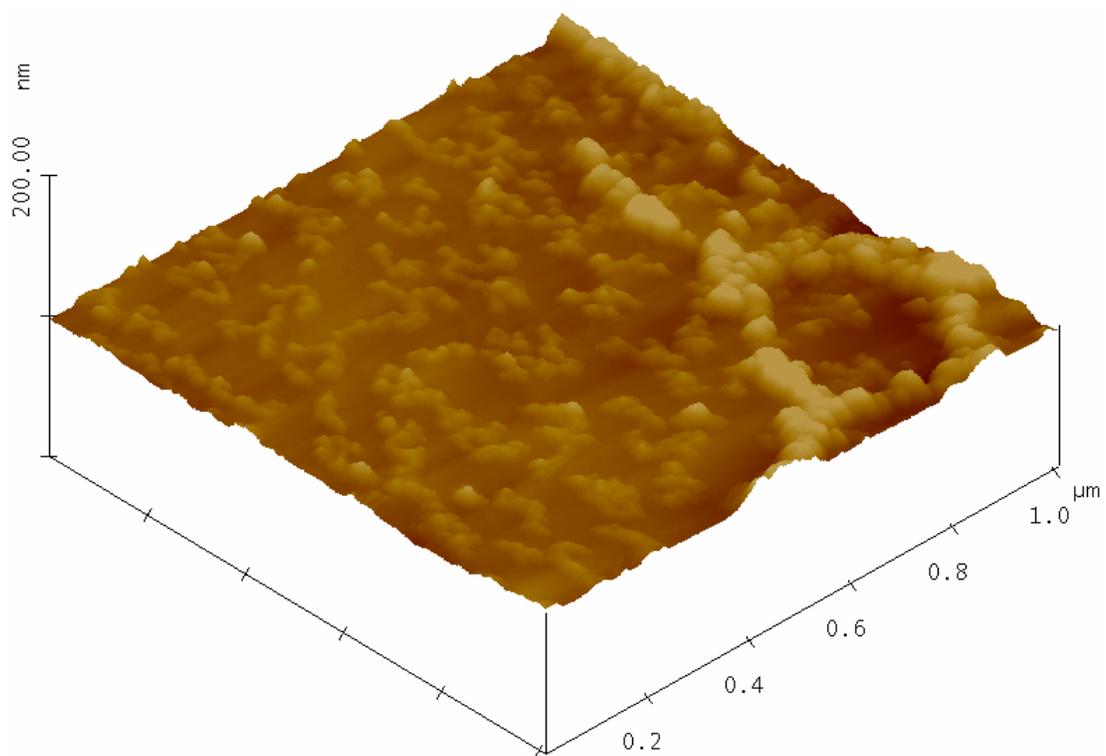
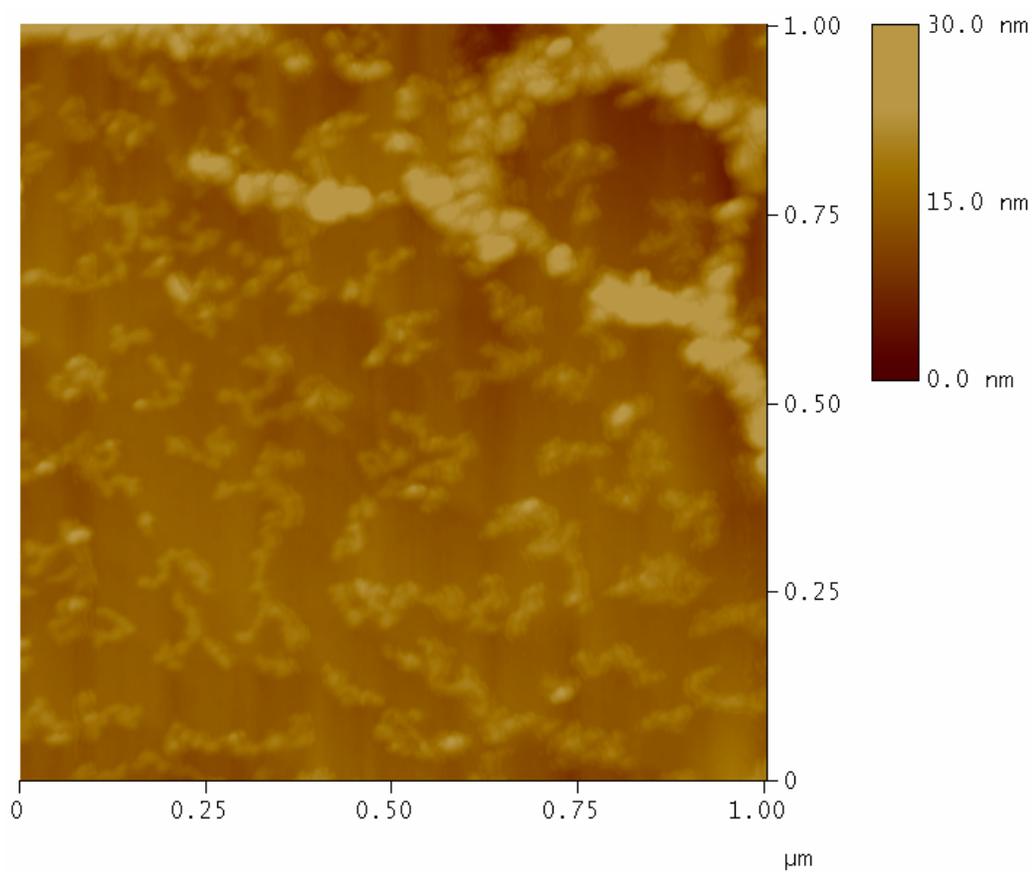


Fig. 8 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 100 p / Au recocido presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

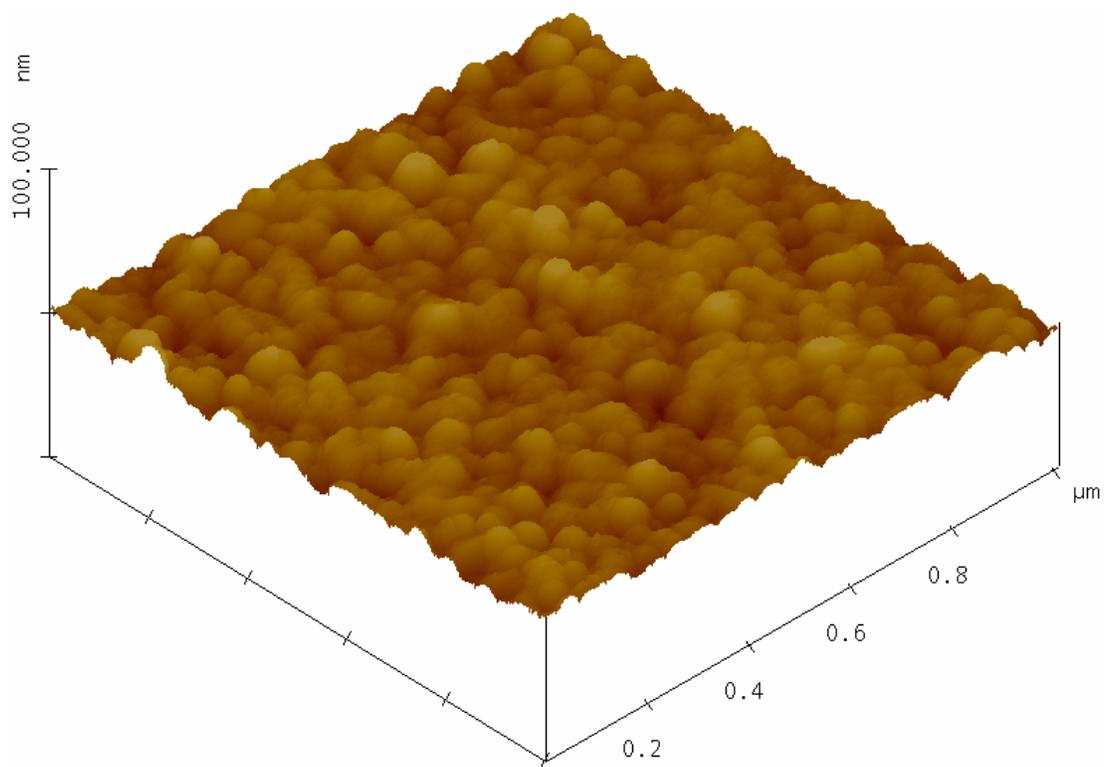
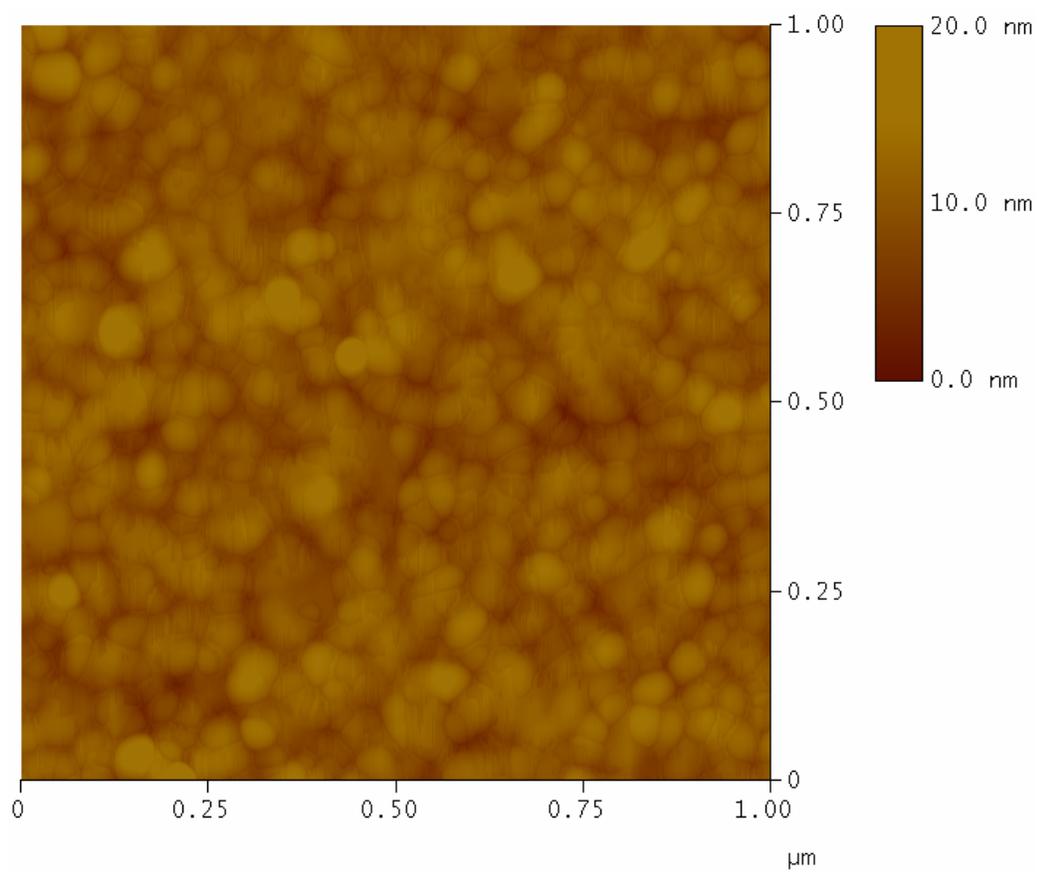


Fig. 9 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 500 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

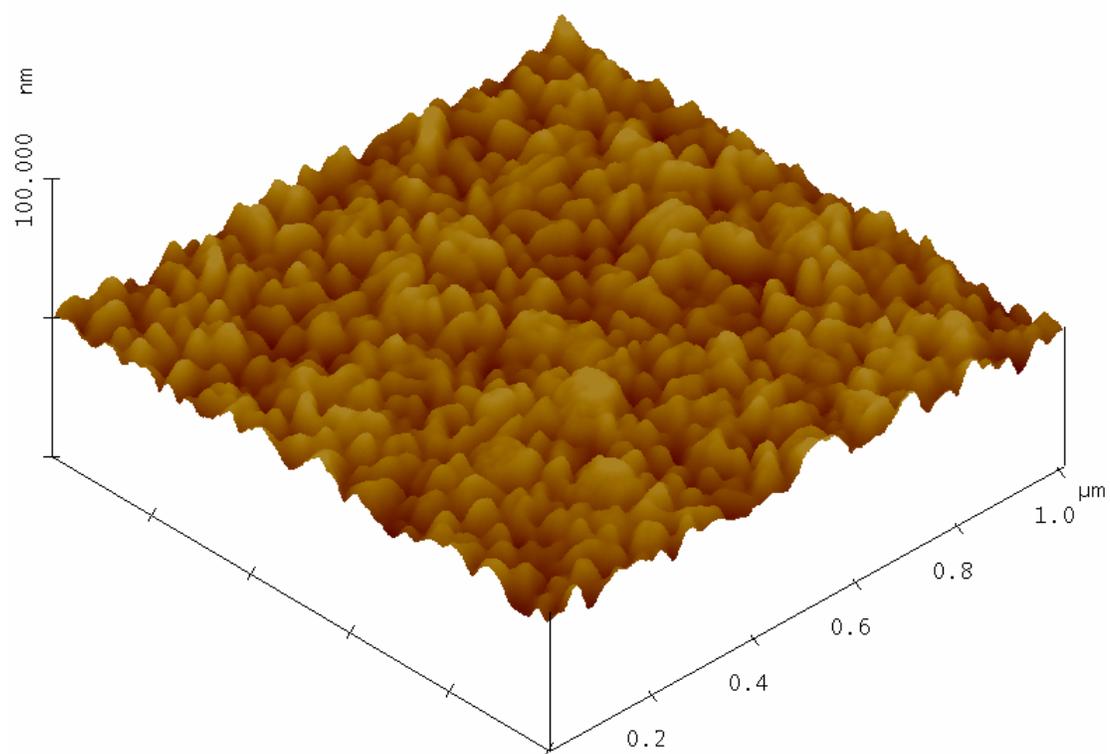
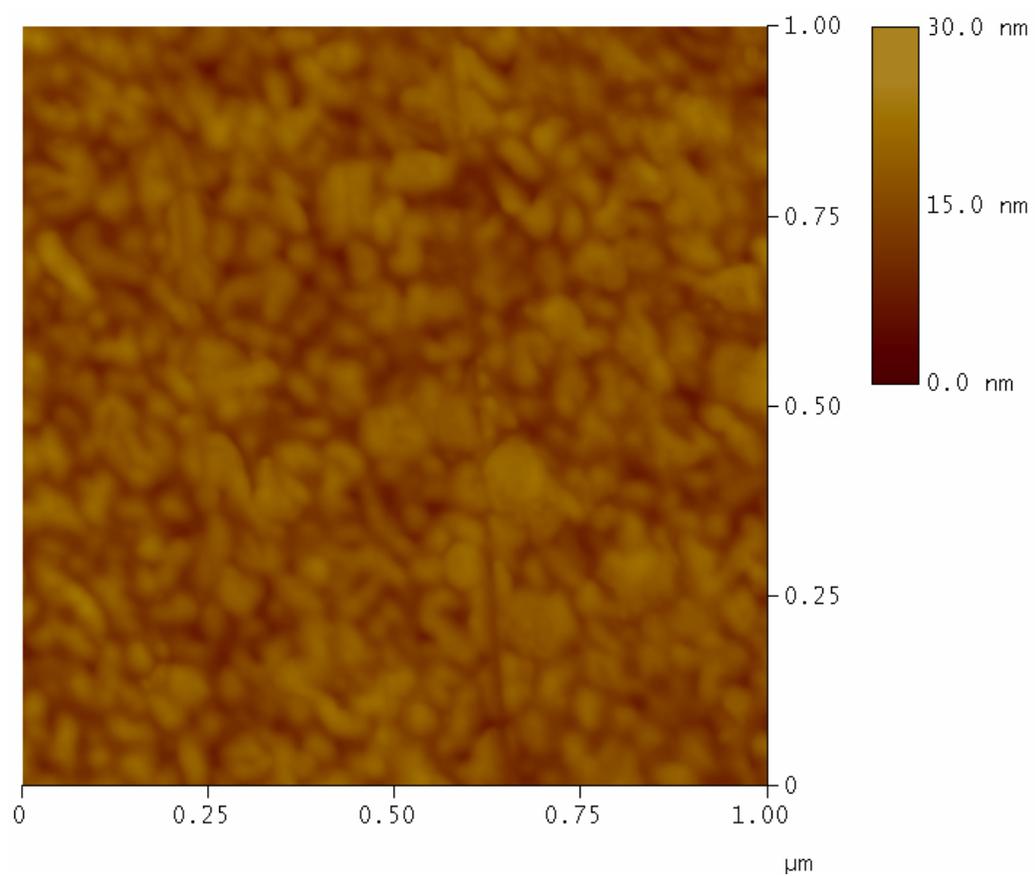


Fig. 10 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AuNP 2000 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

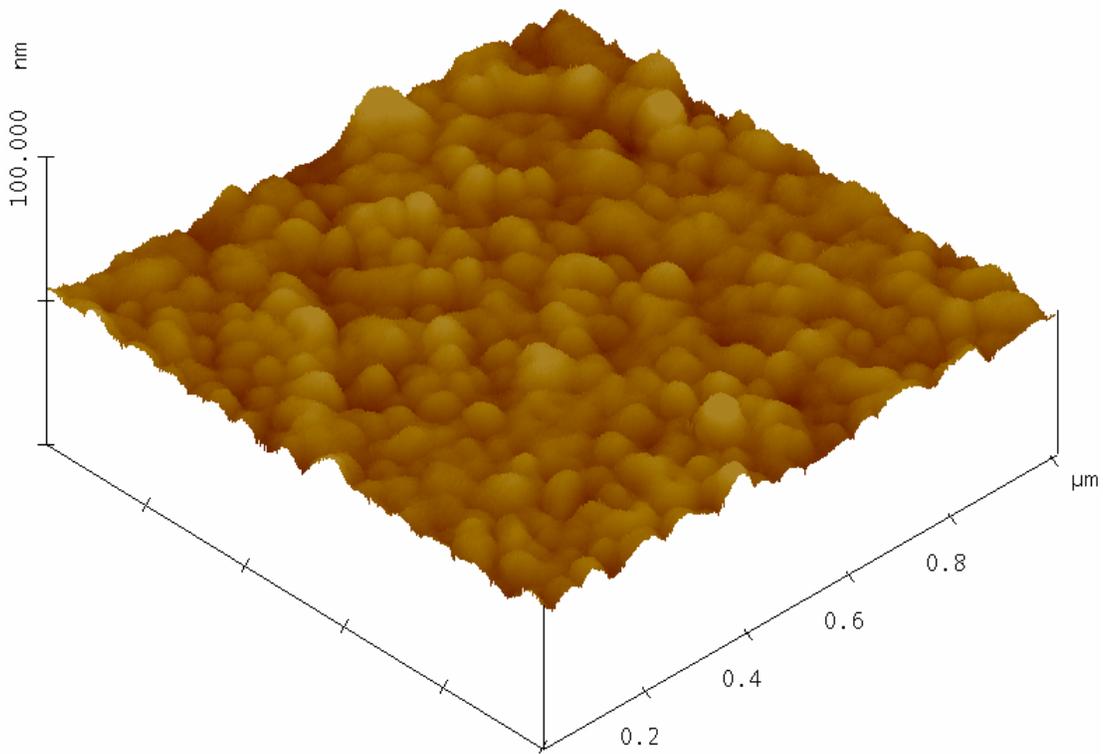
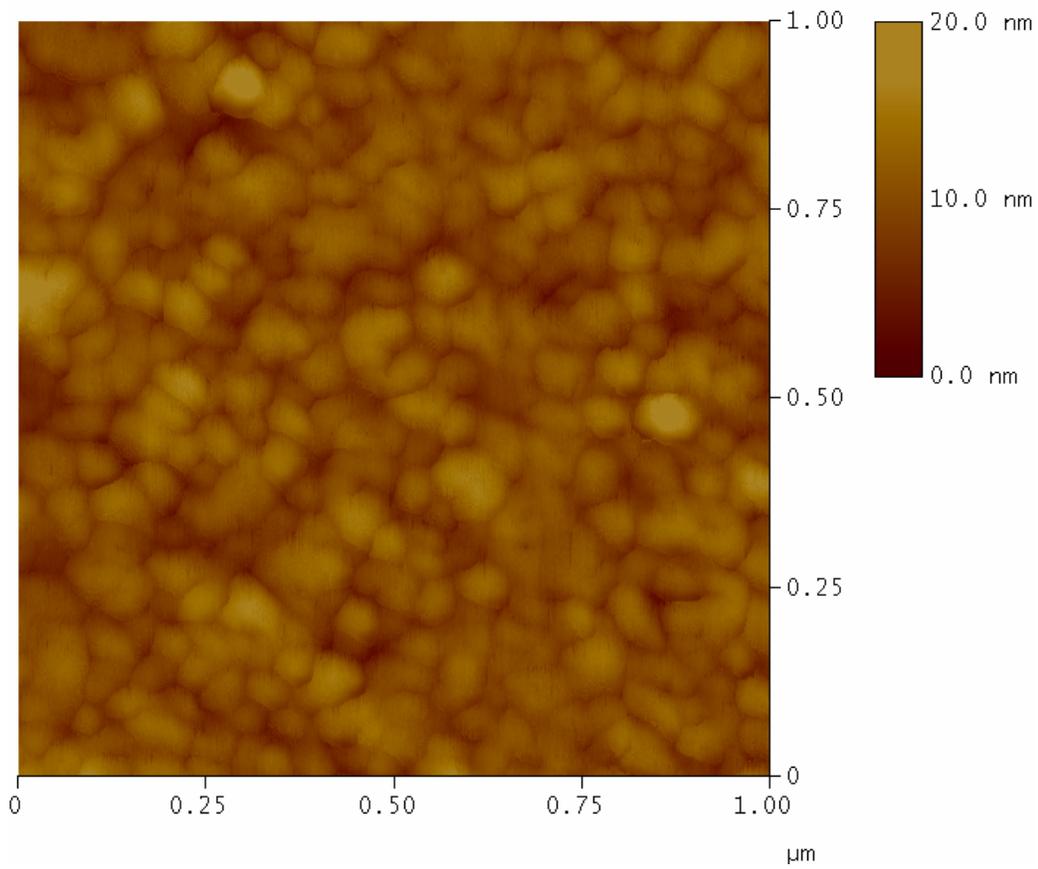


Fig. 11 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado Ag-AuNP 500 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

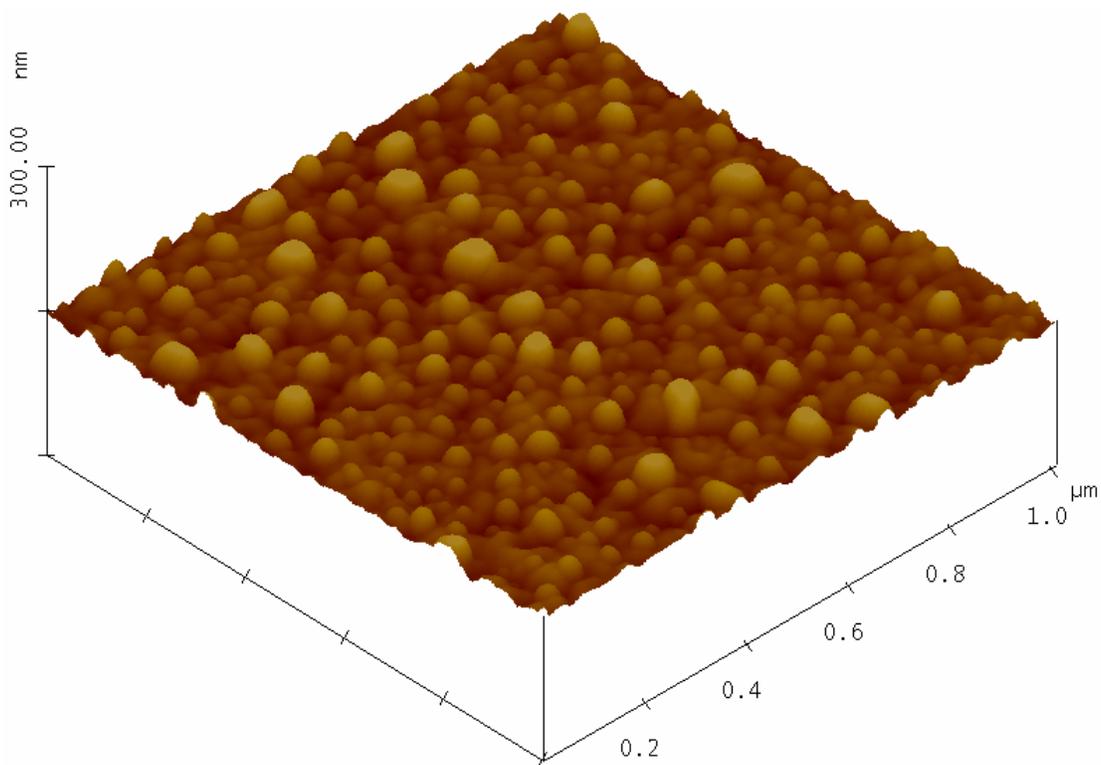
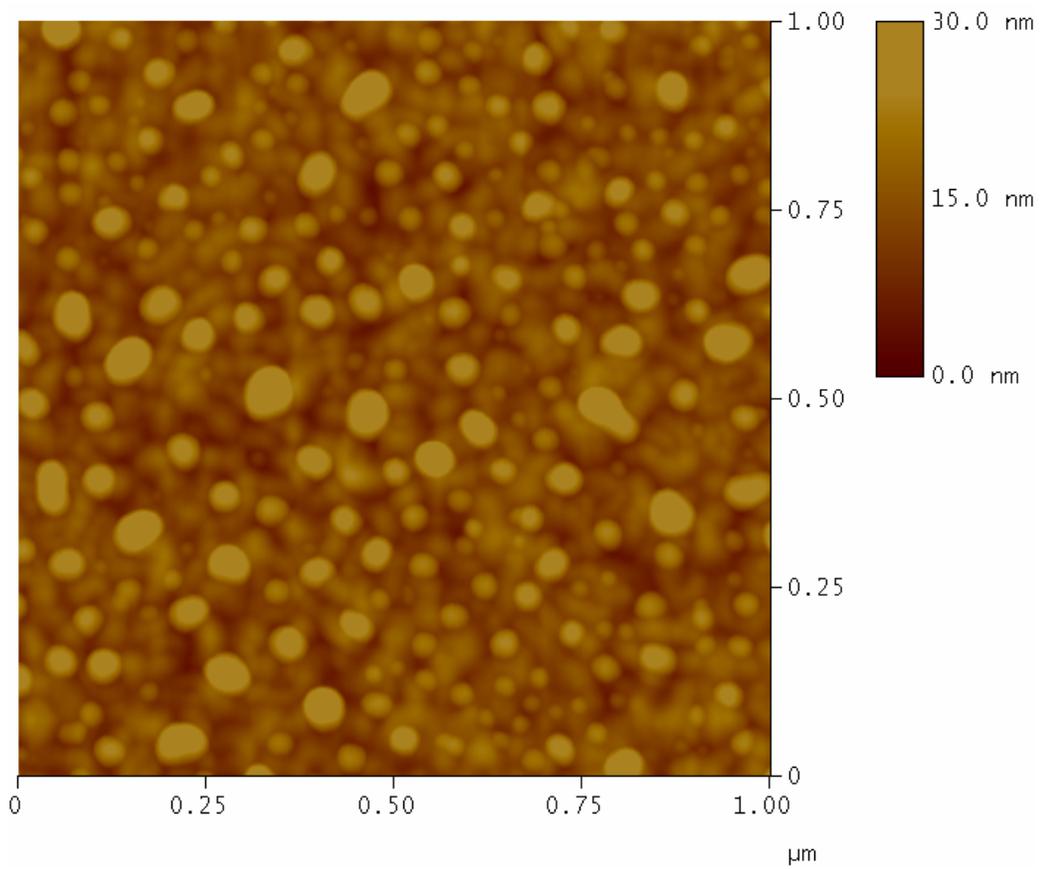


Fig. 12 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado Ag-AuNP 2000 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

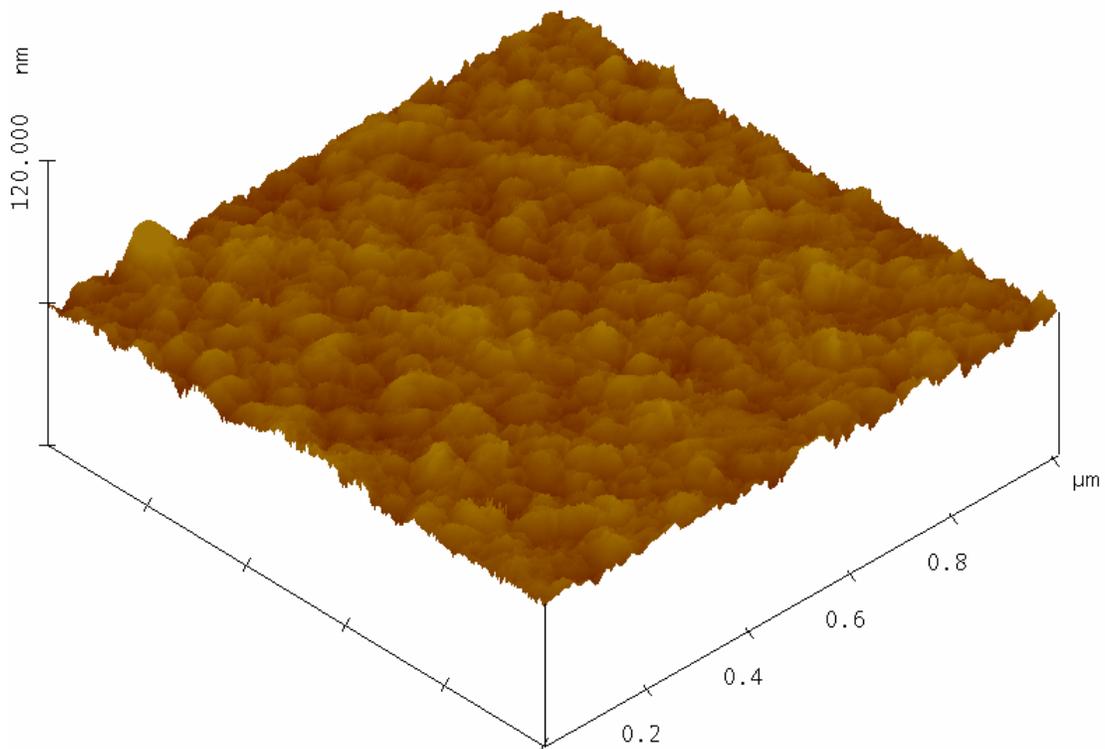
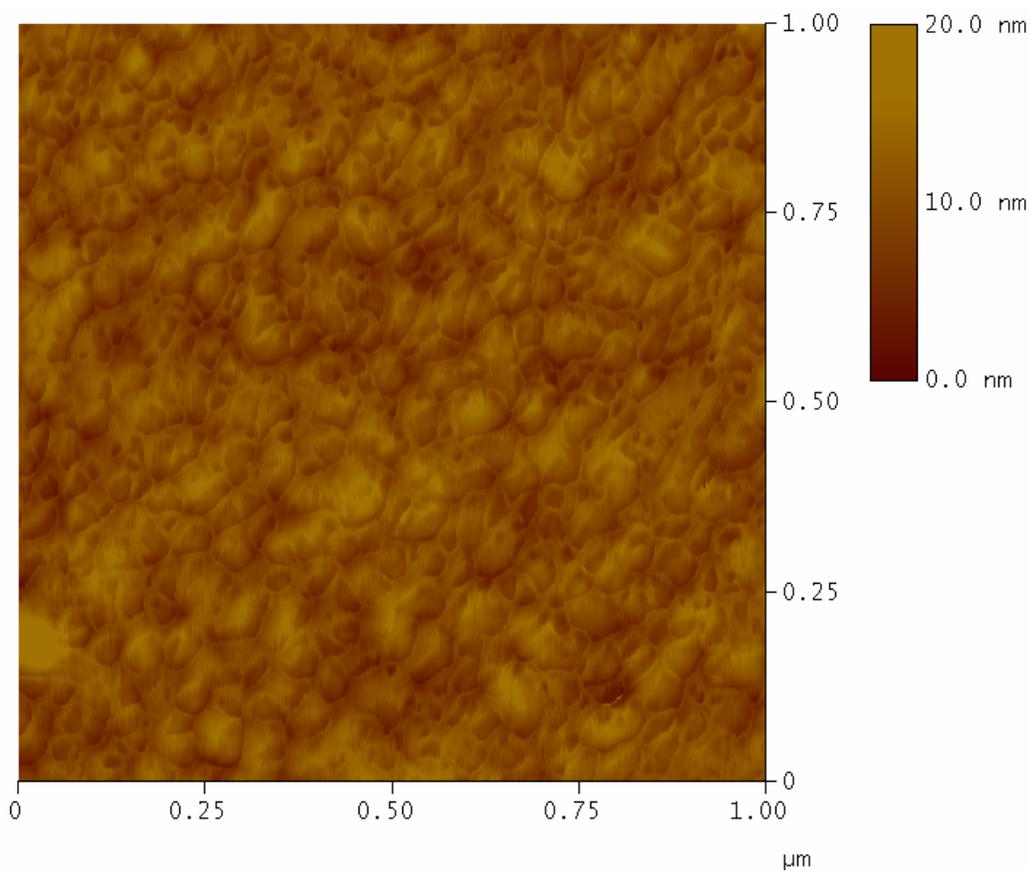


Fig. 13 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 500 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

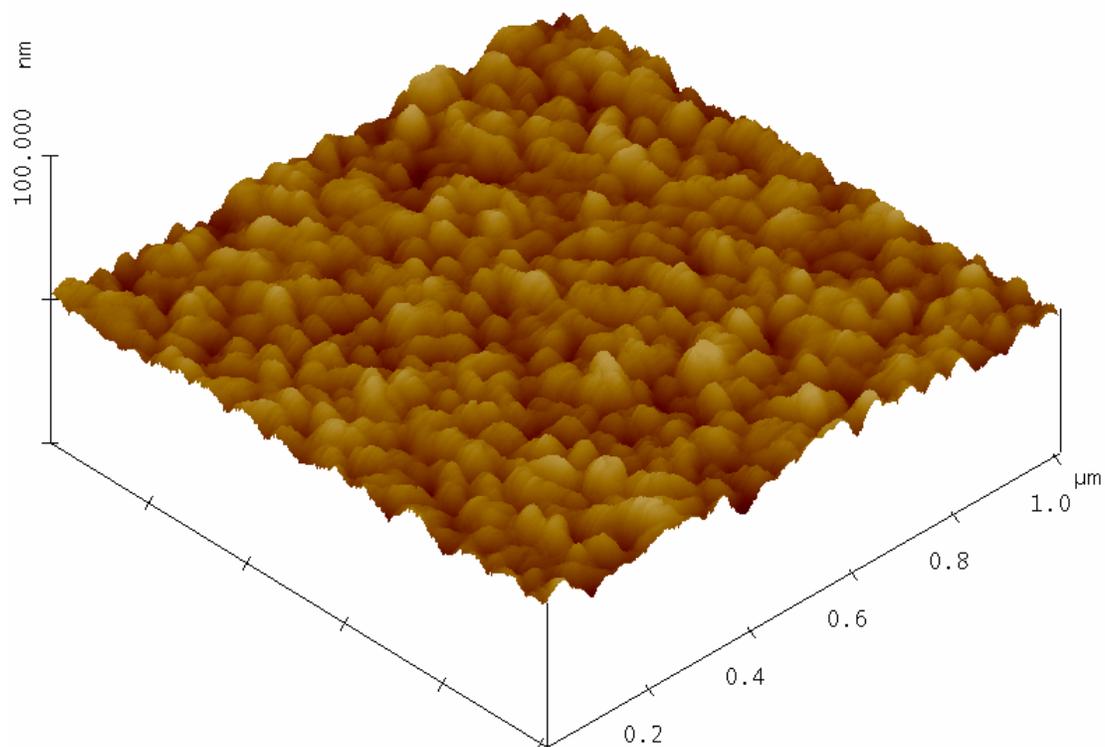
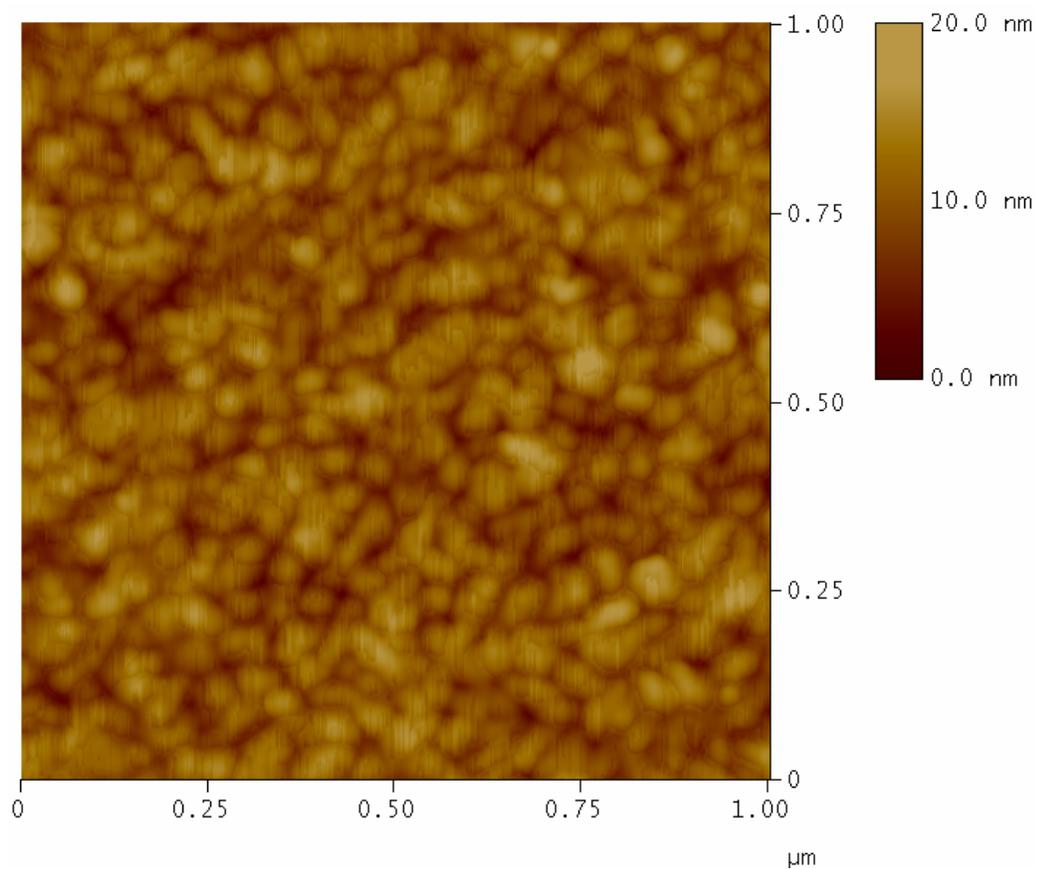


Fig. 14 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 1500 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

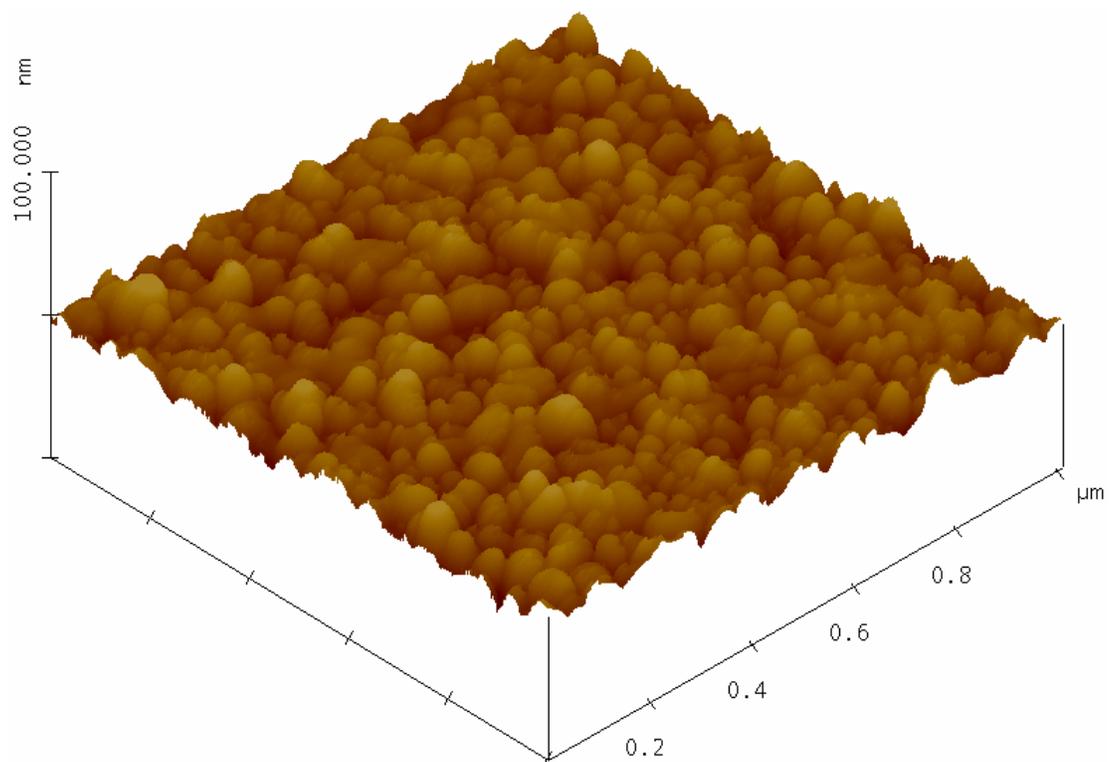
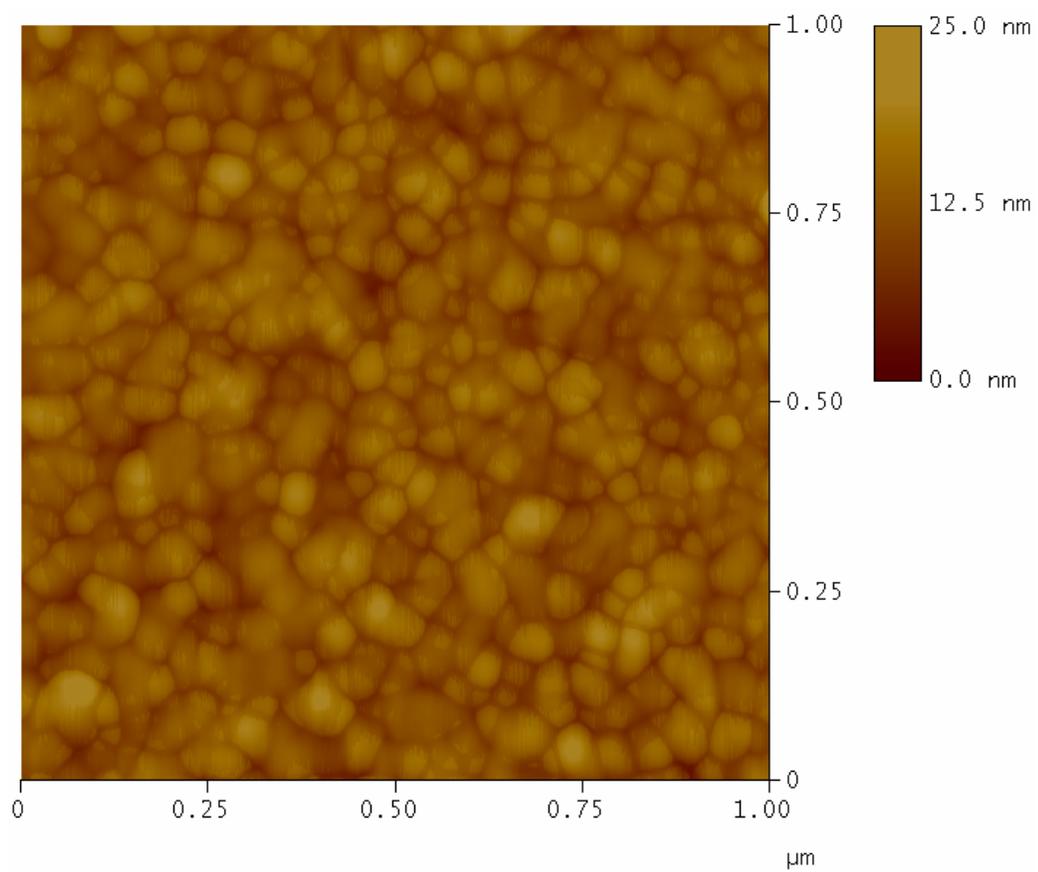


Fig. 15 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 2000 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

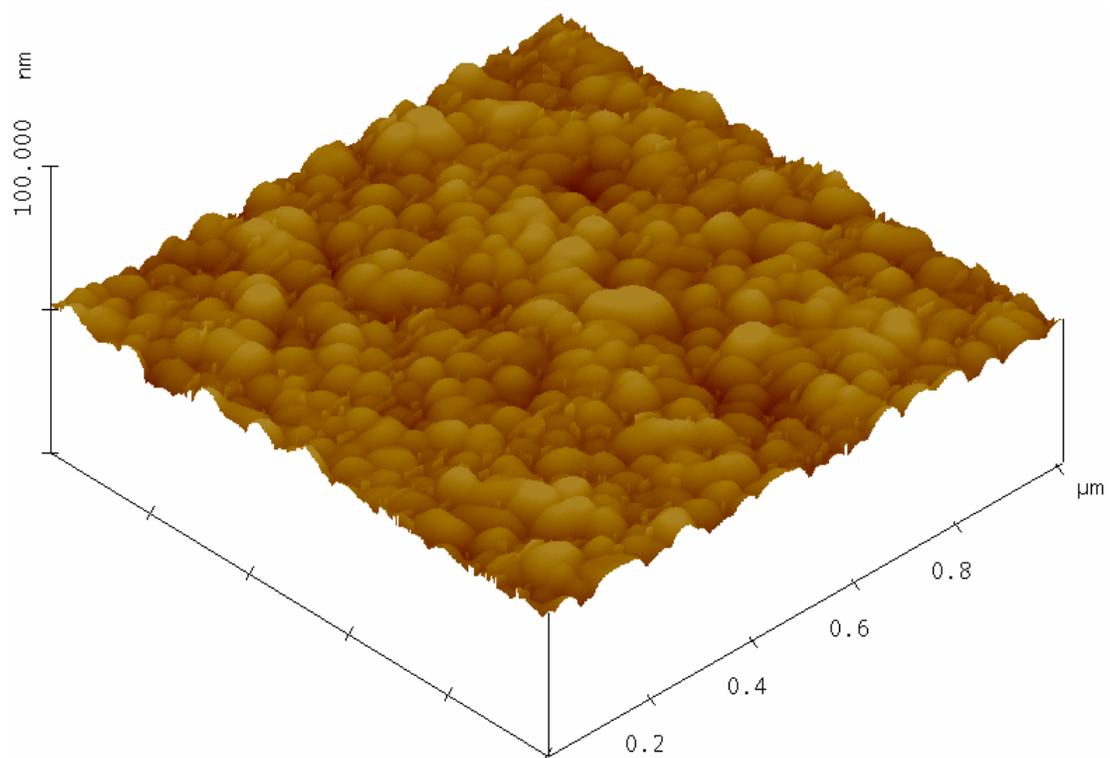
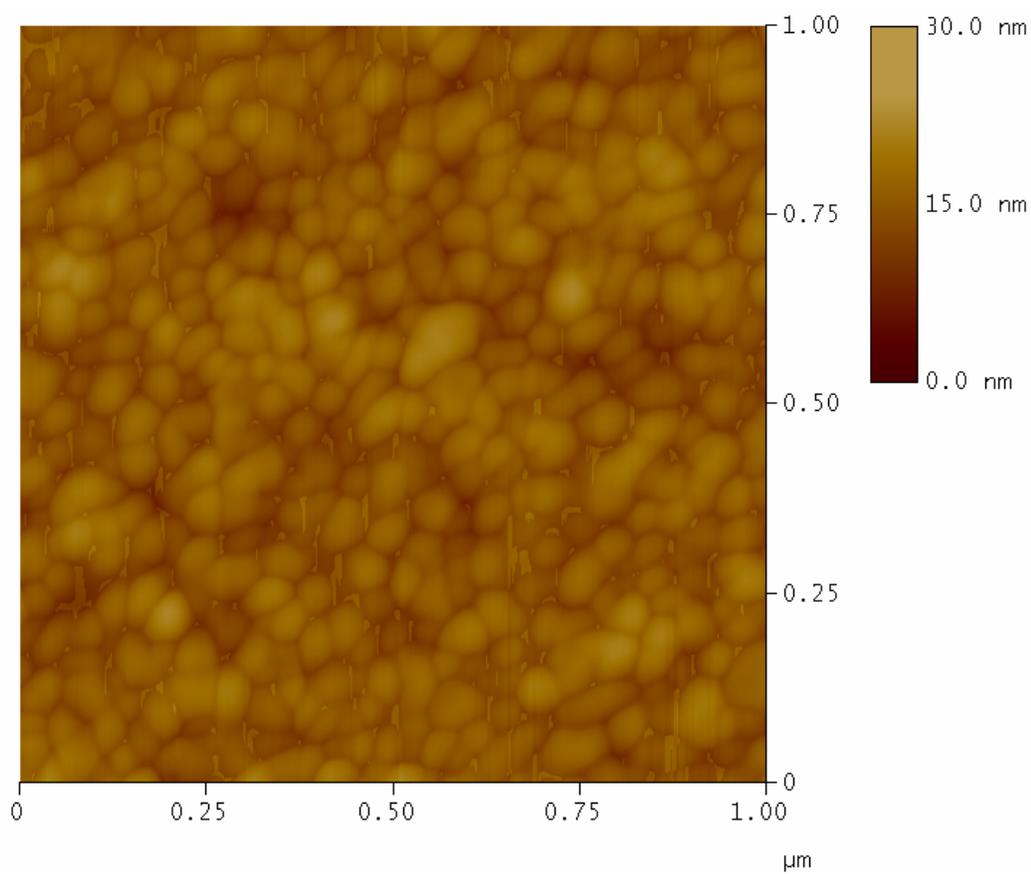


Fig. 16 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 2500 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).

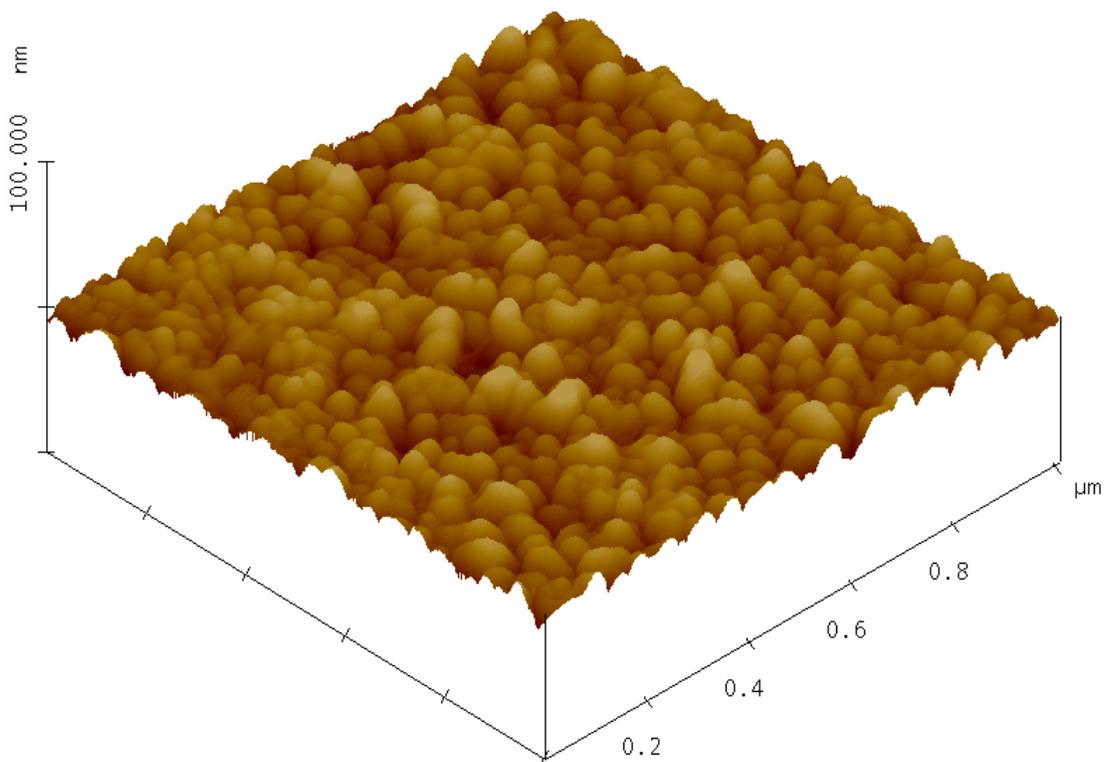
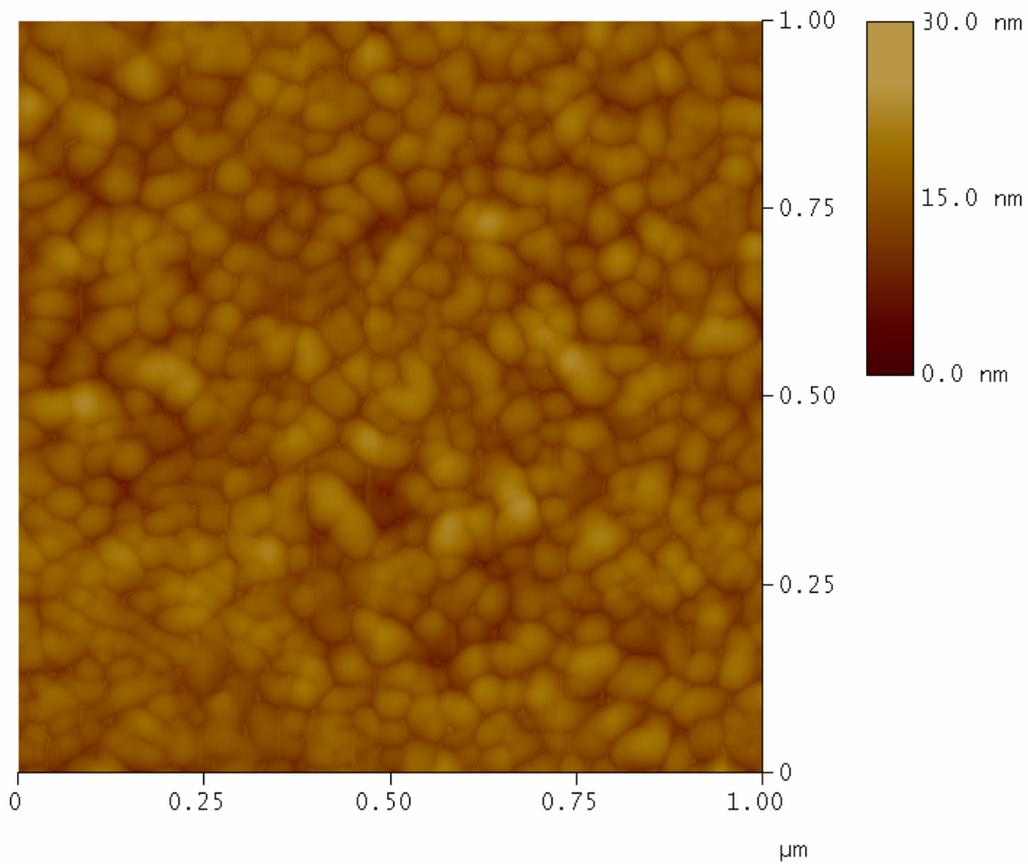
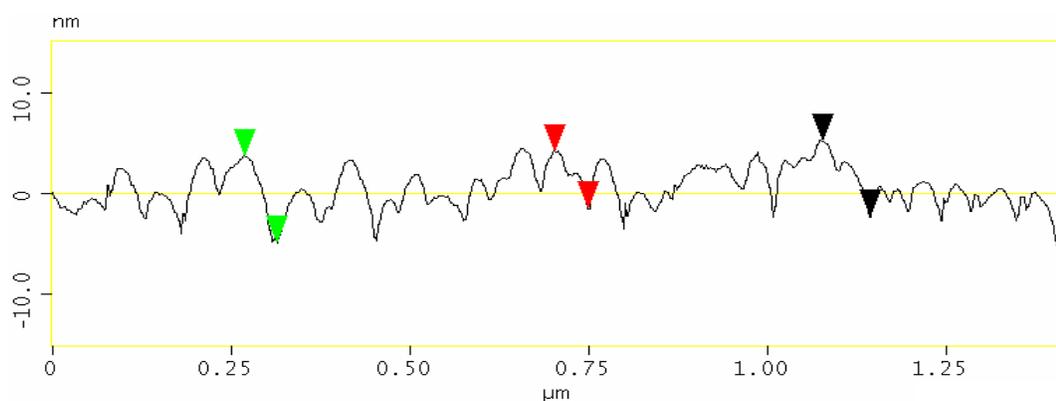
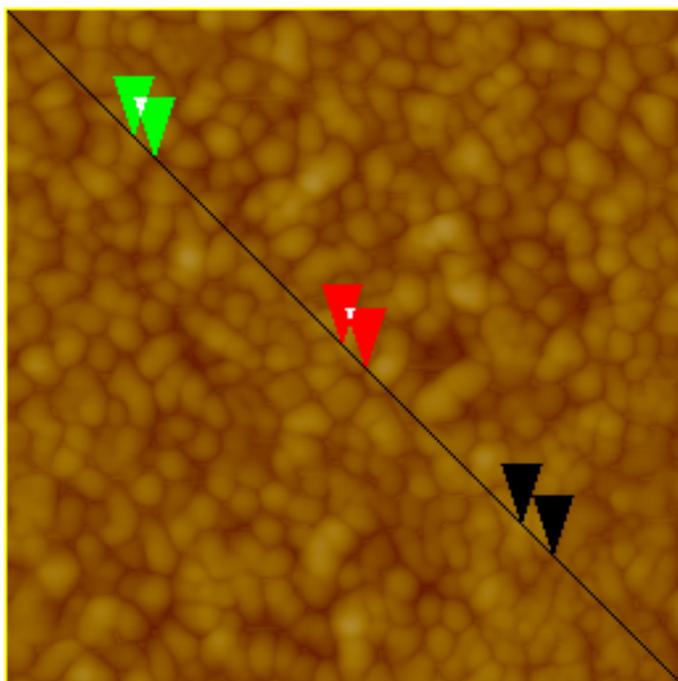


Fig. 17 Imagen AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p / Au presentado en modo 2D (arriba) y 3D (abajo).



Surface distance	47.911 nm
Horiz distance(L)	46.875 nm
Vert distance	5.643 nm
Angle	6.864 °
Surface distance	47.258 nm
Horiz distance	44.922 nm
Vert distance	8.580 nm
Angle	10.813 °
Surface distance	67.679 nm
Horiz distance	66.406 nm
Vert distance	7.553 nm
Angle	6.489 °
Spectral period	DC
Spectral freq	0 /μm
Spectral RMS amp	0.854 nm

Fig. 18 Análisis de una sección transversal sobre la imagen de AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Au.

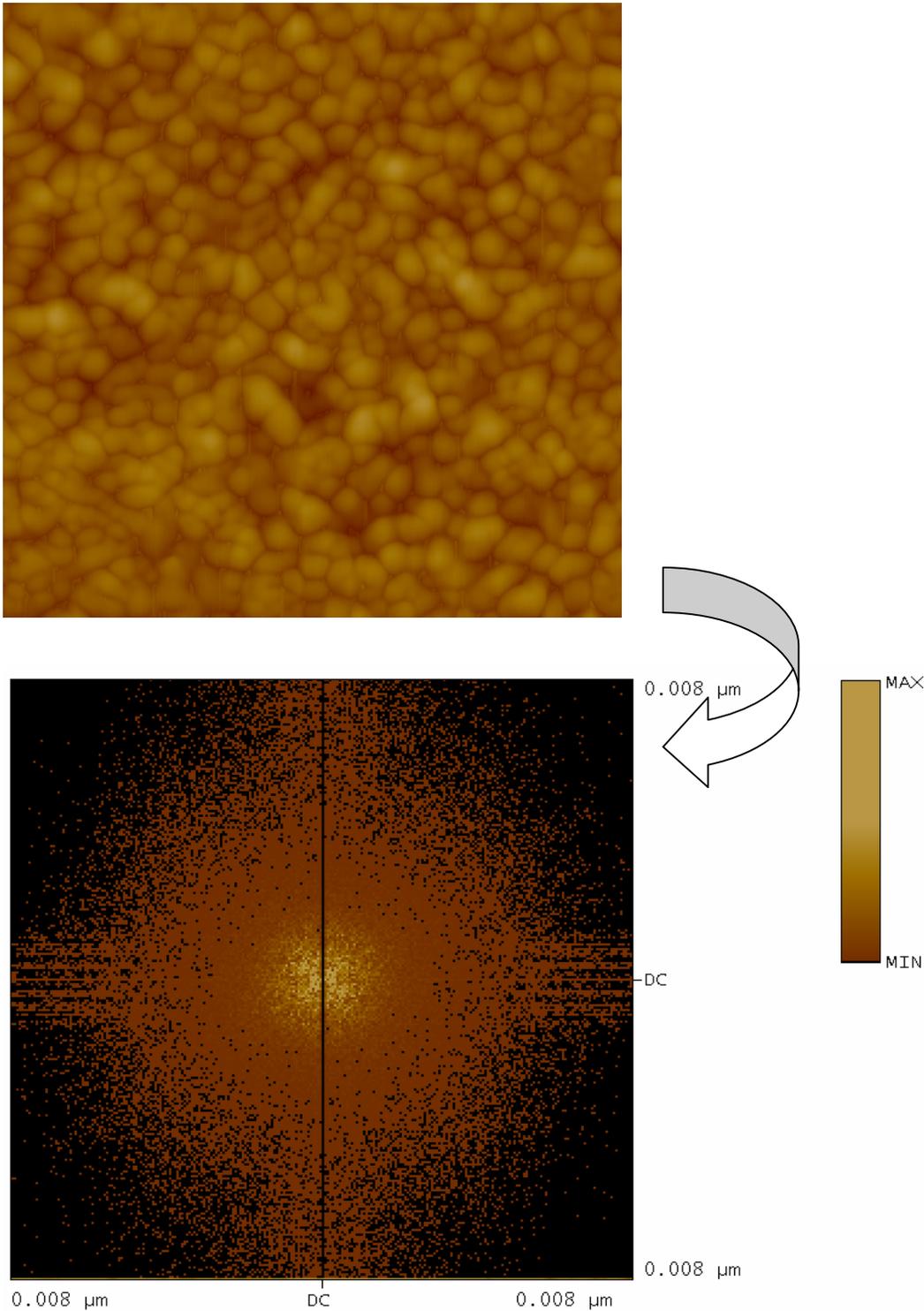


Fig. 19 Aplicación de la transformada rápida de Fourier (FFT) a la imagen de AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Au para el análisis de su posible patrón (o direccionalidad) vía el comando *2D Spectrum* del software NanoScope 5.30r3sr3.

El comando *Spectrum 2D*^(VII) vía el software NanoScope 5.30r3sr3 permite la conversión de las imágenes (dominio espacial) al dominio de frecuencias a través de la transformada rápida de Fourier bidimensional.

Tabla 1. Búsqueda de un sustrato nanoestructurado adecuado que actué como biosensor.

Muestra	Caracterización por AFM	Caracterización por espectroscopía Raman (SDS disuelto en una solución 1:2 v/v cloroformo-etanol) Método: Deposición de una gota de la solución y evaporación.
AuNP 100 p/ Vidrio	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 76.5 ± 34.1 nm Altura promedio: 4.5 ± 2.8 nm Densidad: 180 partículas / µm ² RMS: 2.18 nm	No señal
AgNP 3000 p/ Vidrio	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 38.7 ± 18.3 nm Altura promedio: 1.8 ± 0.92 nm Densidad: 696 partículas / µm ² RMS: 0.27 nm	No señal
Si	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 30.2 ± 11.4 nm Altura promedio: 0.11 ± 0.07 nm Densidad: 1225 partículas / µm ² RMS: 0.06 nm	No señal
AuNP 100 p/ Si	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 21.6 ± 9.3 nm Altura promedio: 0.22 ± 0.14 nm Densidad: 2256 partículas / µm ² RMS: 0.13 nm	No señal
AuNP 250 p/ Si	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 23.7 ± 8.6 nm Altura promedio: 1.2 ± 1.4 nm Densidad: 1973 partículas / µm ² RMS: 0.22 nm	No señal
AuNP 1000 p/ Si	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 23.7 ± 7.8 nm Altura promedio: 0.70 ± 0.48 nm Densidad: 2016 partículas / µm ² RMS: 0.41 nm	No señal
Au	Tamaño de imagen: 1µm x 1 µm Diámetro promedio: 44.3 ± 13.6 nm Altura promedio: 2.0 ± 1.1 nm Densidad: 527 partículas / µm ² RMS: 2.45 nm	Realizado

AuNP 100 p/ Au recocido	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 44.7 \pm 20.3 nm Altura promedio: 5.9 \pm 4.3 nm Densidad: 532 partículas / μ m ² RMS: 1.77 nm	No señal
AuNP 500 p / Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 36.3 \pm 18.7 nm Altura promedio: 4.6 \pm 2.7 nm Densidad: 759 partículas / μ m ² RMS: 2.11 nm	Realizado
AuNP 2000 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 44.0 \pm 16.2 nm Altura promedio: 4.8 \pm 3.0 nm Densidad: 579 partículas / μ m ² RMS: 2.68 nm	Realizado
Au-Ag NP 500 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 39.4 \pm 21.3 nm Altura promedio: 6.0 \pm 3.3 nm Densidad: 621 partículas / μ m ² RMS: 2.20 nm	Realizado
Au-Ag NP 2000 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 42.2 \pm 15.7 nm Altura promedio: 11.4 \pm 8.3 nm Densidad: 627 partículas / μ m ² RMS: 4.98 nm	Realizado
AgNP 500 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 27.5 \pm 15.4 nm Altura promedio: 5.3 \pm 3.9 nm Densidad: 1271 partículas / μ m ² RMS: 2.44 nm	Realizado
AgNP 1500 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 36.2 \pm 15.6 nm Altura promedio: 4.5 \pm 3.0 nm Densidad: 814 partículas / μ m ² RMS: 2.40 nm	Realizado
AgNP 2000 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 38.6 \pm 16.9 nm Altura promedio: 5.8 \pm 3.0 nm Densidad: 713 partículas / μ m ² RMS: 2.52 nm	Realizado
AgNP 2500 p/ Au	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 39.2 \pm 21.9 nm Altura promedio: 4.4 \pm 2.4 nm	Realizado

	Densidad: 631 partículas / μm^2 RMS: 2.14 nm	
AgNP 3000 p/ Au	Tamaño de imagen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ Diámetro promedio: 45.0 ± 16.7 nm Altura promedio: 4.8 ± 2.6 nm Densidad: 538 partículas / μm^2 RMS: 2.32 nm	Realizado

Ag: Plata, Au: Oro, Si: Silicio, NP: Nanopartículas, p: Pulsos de ablación láser. Para la obtención del diámetro, altura y densidad se utilizó el software SPIP 3D Image Processing 6.2.4 con el método de detección: *Watershed Packed Segments* variando los pixeles desde 7-10 logrando una cobertura de la imagen de ~100 %. El error de la raíz cuadrática media (RMS) de las imágenes de AFM se obtuvieron con el software Nanoscope 5.30r3sr3.

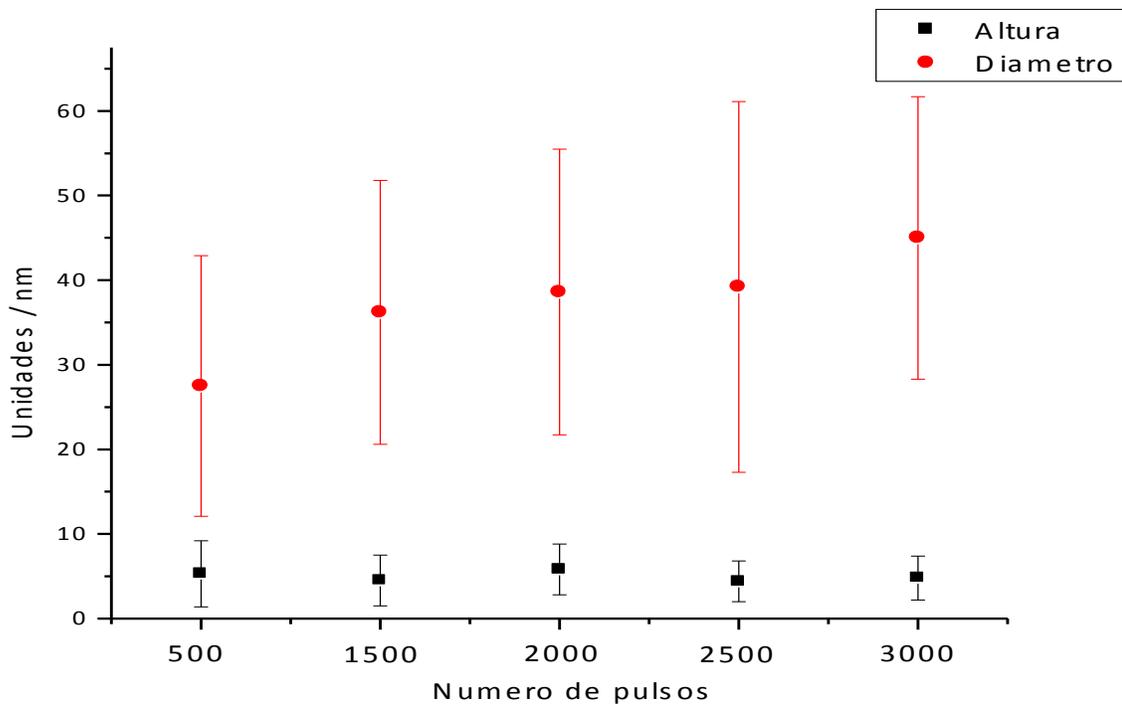


Fig. 20 Tendencia del diámetro y altura de las nanopartículas de plata sobre el sustrato de oro (AgNPs / Au) producidas por ablación láser a diferentes números de pulsos por ablación láser.

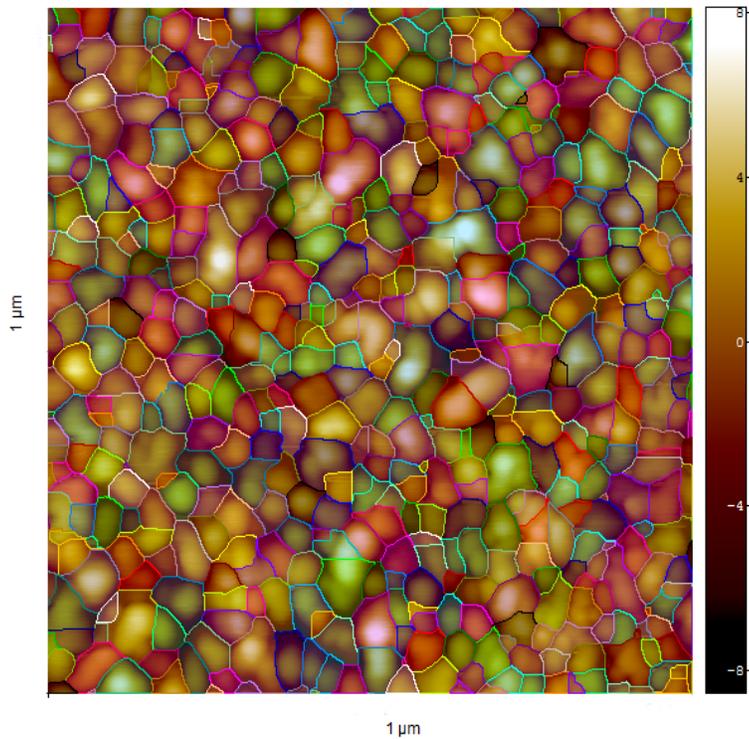


Fig. 21 Análisis de la imagen de AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Au mediante el software SPIP 3D Image Processing 6.2.4

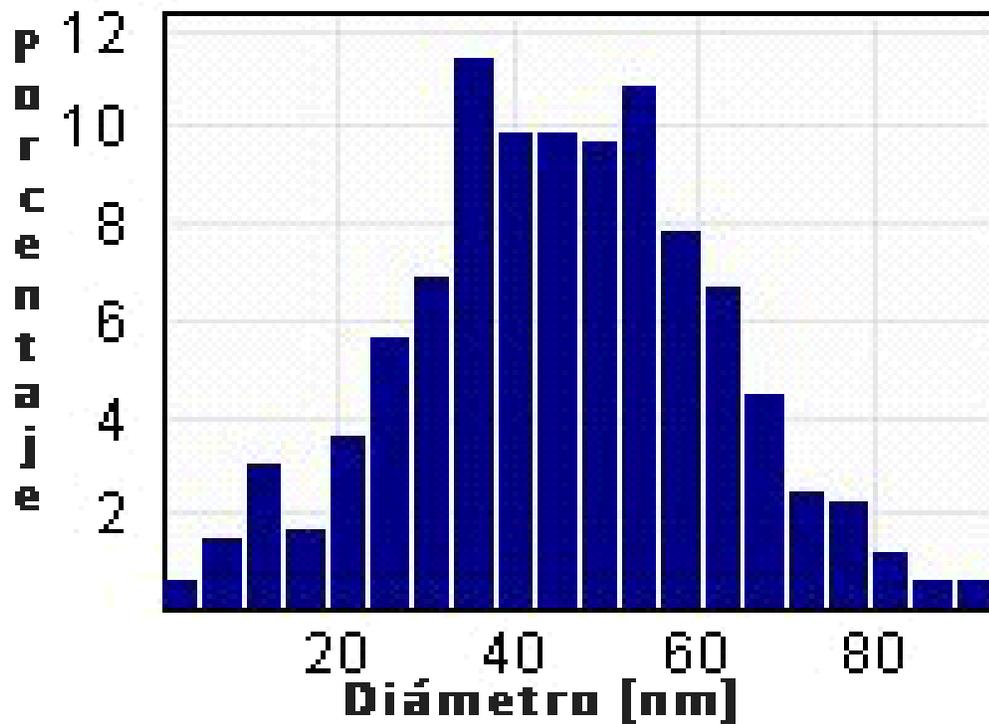


Fig. 22 Análisis mediante SPIP 3D Image Processing 6.2.4 de los diámetros de las nanopartículas de plata de la imagen de AFM del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Au.

3.3 Caracterización de los sustratos nanoestructurados con una molécula orgánica (dodecil sulfato de sodio-SDS) de prueba a través de espectroscopia Raman

Cabe mencionar que en este momento sólo se pretende conocer cuál sustrato es el ideal (motivo por el cual usamos SDS como nuestra molécula prueba) para posteriormente comenzar la funcionalización del mismo con la molécula ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA) que actuará como molécula bifuncional (espaciador) y a su vez nos permitirá el anclaje del anticuerpo trastuzumab a través del carboxilo libre de ésta, vía la química de unión EDC/NHS. Ya que el ácido 4-mercapto benzoico es relativamente costoso se procedió de la siguiente manera:

Las condiciones para la obtención de los espectros Raman son:

Modelo: 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 cada una

El 20 mM de SDS fue disuelto en una solución 1:2 v/v cloroformo-etanol y se depositó una gota (20 μ L) de la solución sobre cada sustrato y se dejó evaporar durante la noche.

Posteriormente se tomaron sus respectivos espectros Raman.

Tabla 2. Asignación tentativa de bandas Raman del dodecil sulfato de sodio (SDS).

Número de onda de la intensidad Raman / cm^{-1}	Asignación de bandas Raman
1294	$\delta(\text{CH}_2)$ dentro del plano
1434	$\omega(\text{CH}_2)$
1453	$\delta(\text{CH}_2)$
2844	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2877	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
2932	$\nu(\text{CH}_3)$

ω : wagging, δ : bending, ν : stretching, as: asimétrico, s: simétrico.

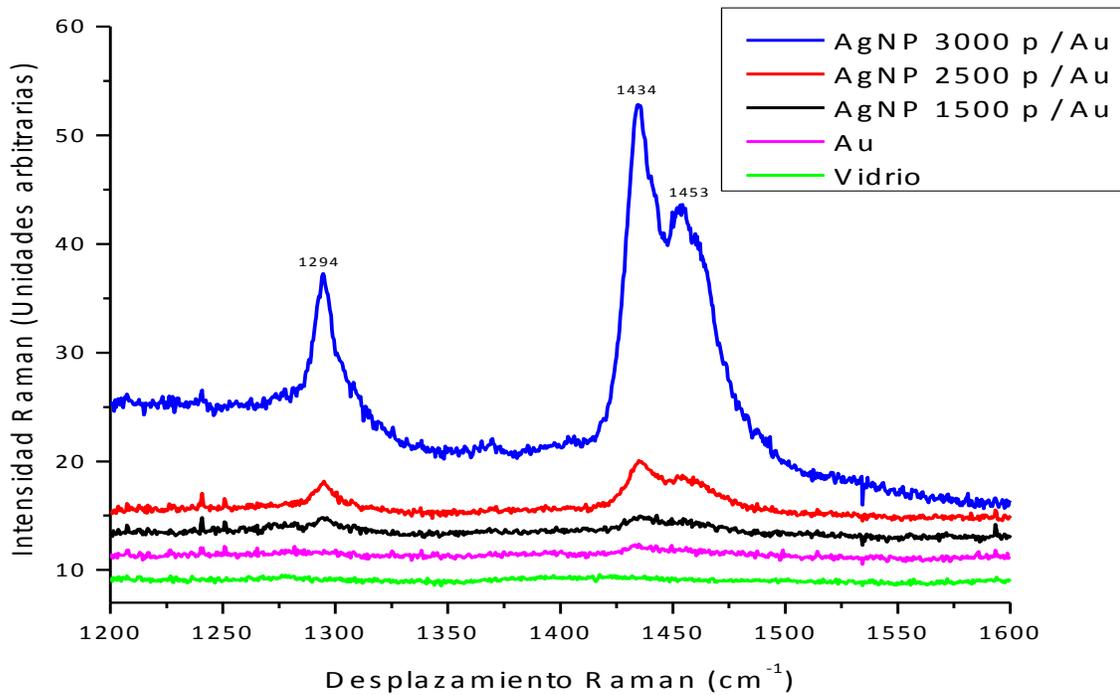


Fig. 23 Espectro Raman del SDS adsorbido sobre diferentes sustratos sólidos.

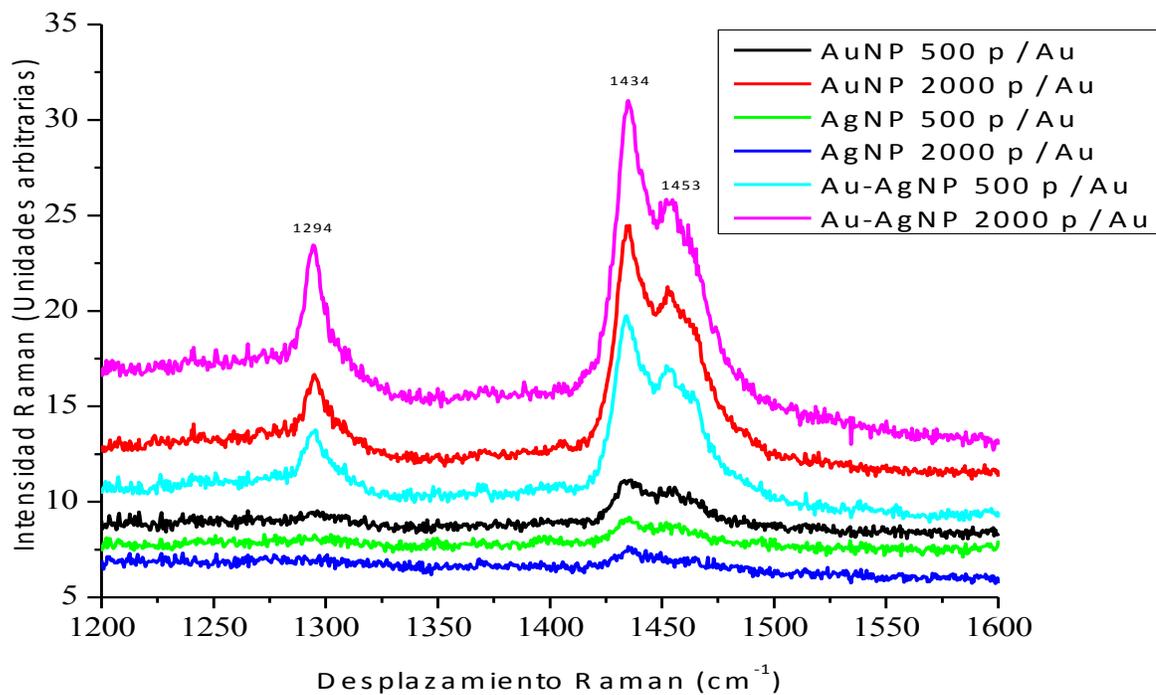


Fig. 24 Espectro Raman del SDS adsorbido sobre diferentes sustratos sólidos.

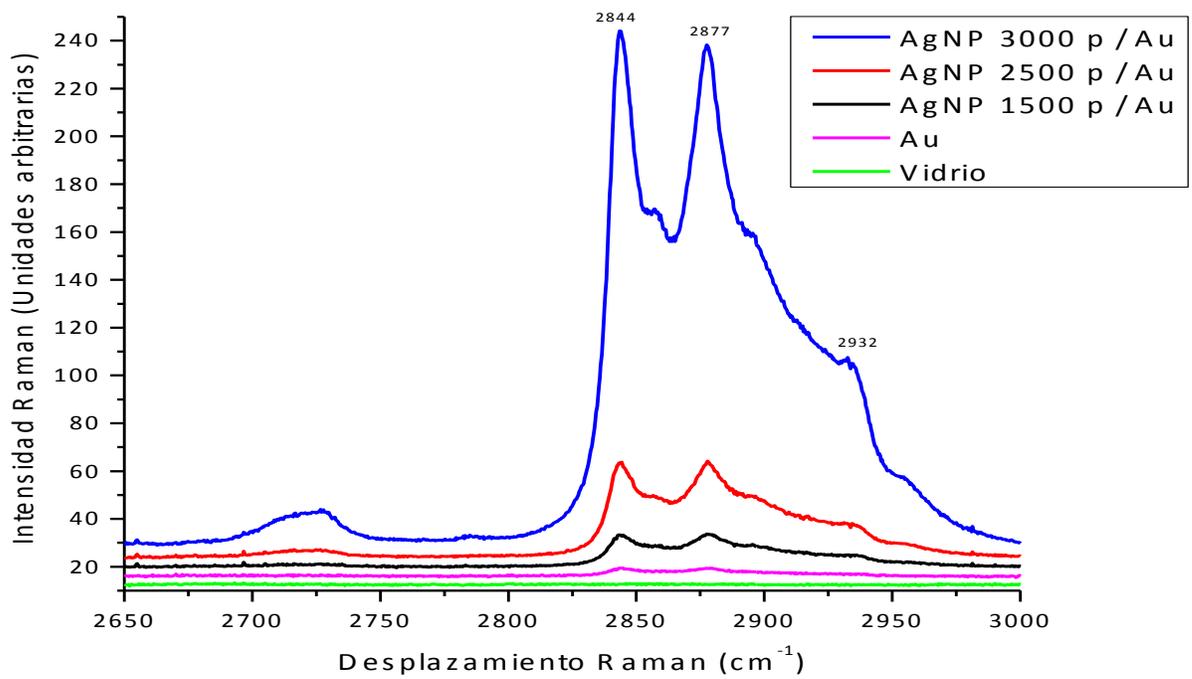


Fig. 25 Espectro Raman del SDS adsorbido sobre diferentes sustratos sólidos.

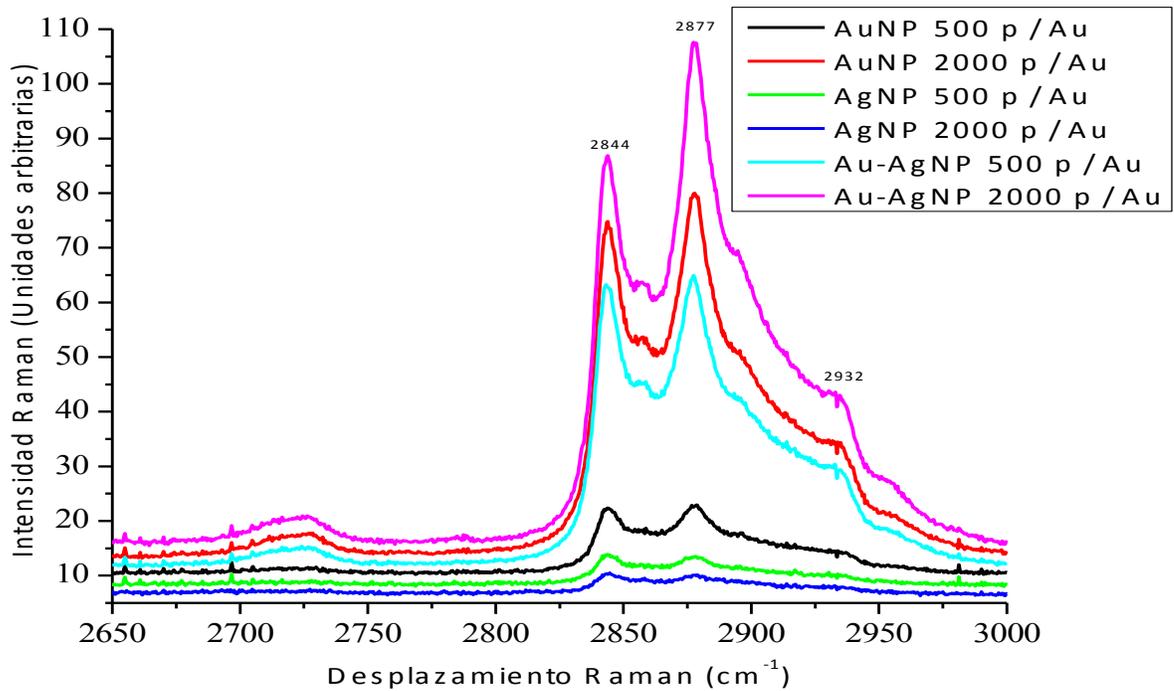


Fig. 26 Espectro Raman del SDS adsorbido sobre diferentes sustratos sólidos.

3.4 Discusión y conclusiones sobre la preparación y caracterización de los sustratos nanoestructurados (NS)

Haciendo uso de una superficie mejorada (en nuestro caso superficie nanoestructurada con nanopartículas de Au o Ag depositadas por PLA sobre una placa de oro arrandee) se logran mejorar los modos vibracionales de la molécula analito y así obtener una relación señal/ruido alta. Este efecto también puede ocurrir en líquidos usando nanopartículas en presencia de la molécula analito. Esto último se llama espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS).

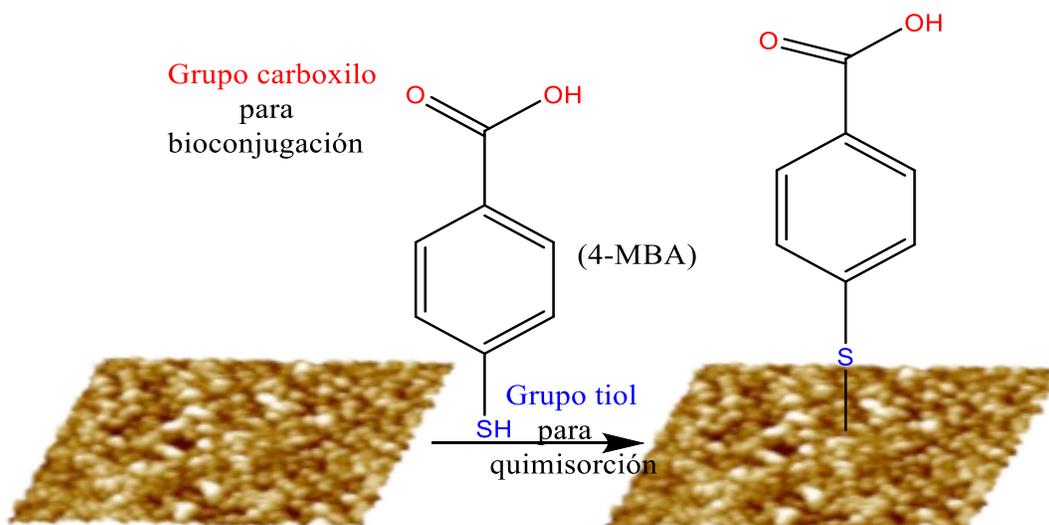
Como puede observarse, a pesar de que hay moléculas de SDS adsorbidas sobre los diferentes sustratos analizados, no es posible obtener señal SERS del vidrio ni de la placa de oro debido a que no es una superficie nanoestructurada.

Es sorprendente observar que sólo la muestra AgNP 3000 p/ Au presenta SERS, mientras que todas las demás de este mismo tipo (AgNP 500, 1500, 2000 y 2500 p / Au) no presentan SERS, a pesar de que las nanopartículas de plata (AgNP) pueden ser excitadas por el tipo de láser utilizado, esto se puede justificar por el hecho de que las nanopartículas (NP) no tienen el diámetro adecuado. A mayor diámetro, las nanopartículas presentan mayor dispersión de la luz, teniendo como umbral de corte un diámetro aproximado de 45 nm. Es decir, las nanoestructuras depositadas por ablación láser deben tener un diámetro mayor o igual a 45 nm para presentar señal SERS. Esto es de vital importancia ya que nos interesa obtener un cociente señal/ruido alto para su posible aplicación como un biosensor basado en SERS.

Las muestras Au-Ag NP 500 y 2000 p / Au presentan señal SERS aun cuando solamente las nanopartículas de plata (AgNP) están en la parte más alta de la superficie. Esto se deduce porque el equipo usado para la ablación láser de pulsos depositó primero AuNP y posteriormente AgNP ya que este modelo de equipo no permite depositar dos materiales simultáneamente. Esto hace pensar que existe una sinergia favorable en este último caso.

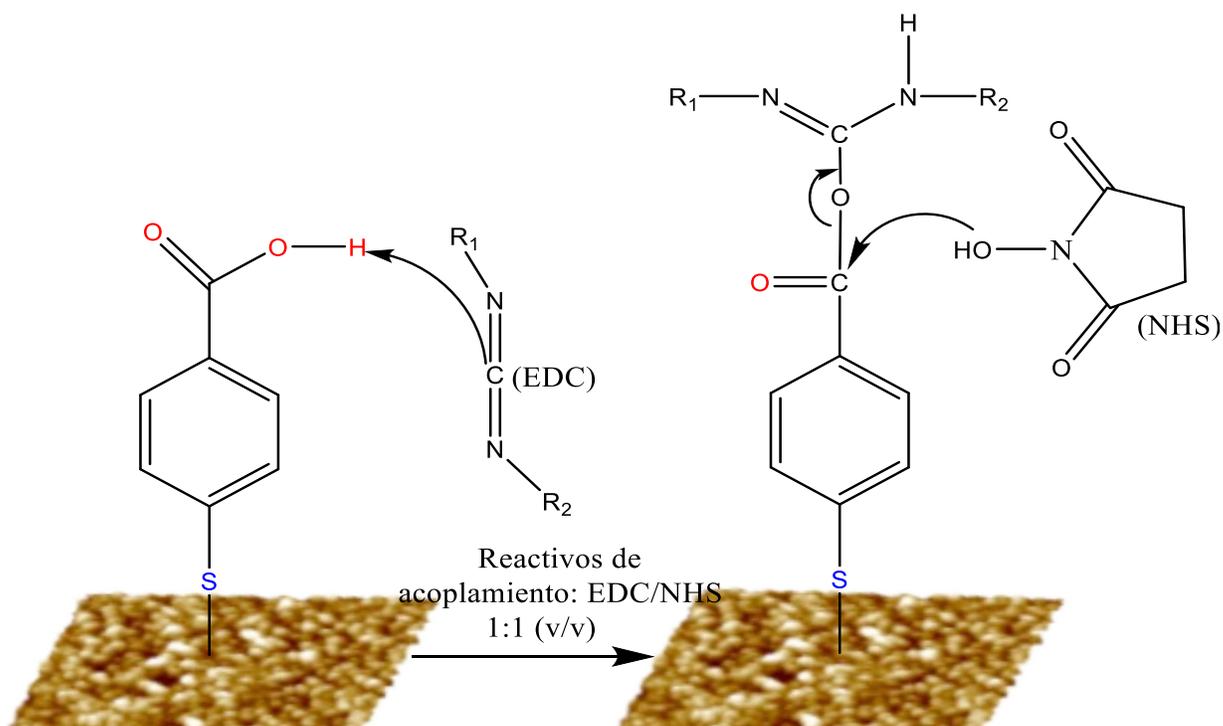
3.5 Funcionalización de la superficie del sustrato nanoestructurado (NS) con ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA)

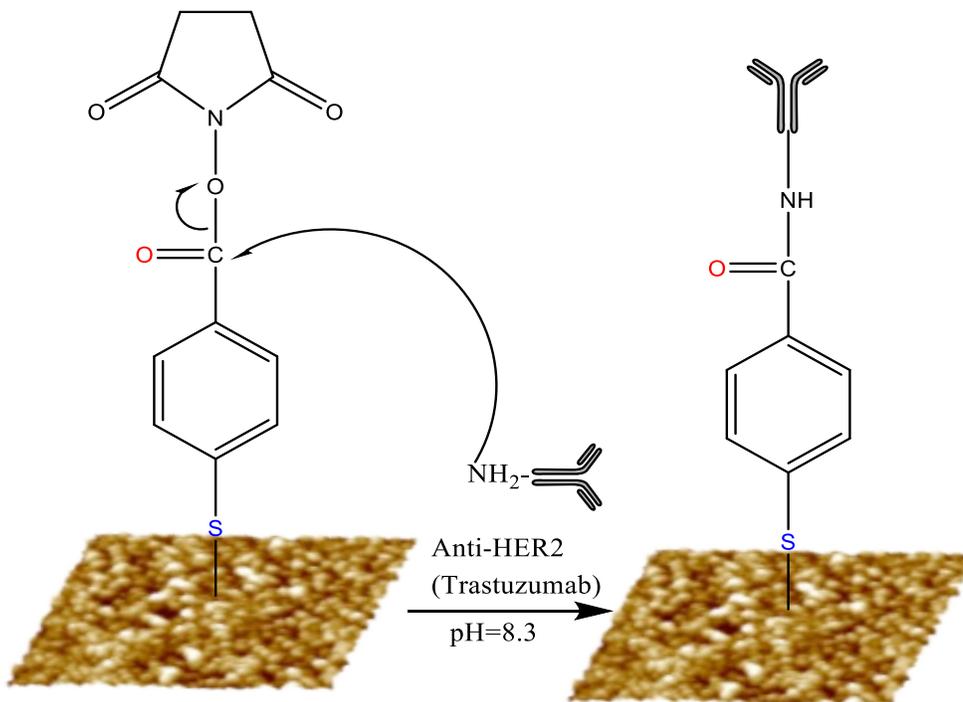
Esquema simplificado del proceso de funcionalización propuesto



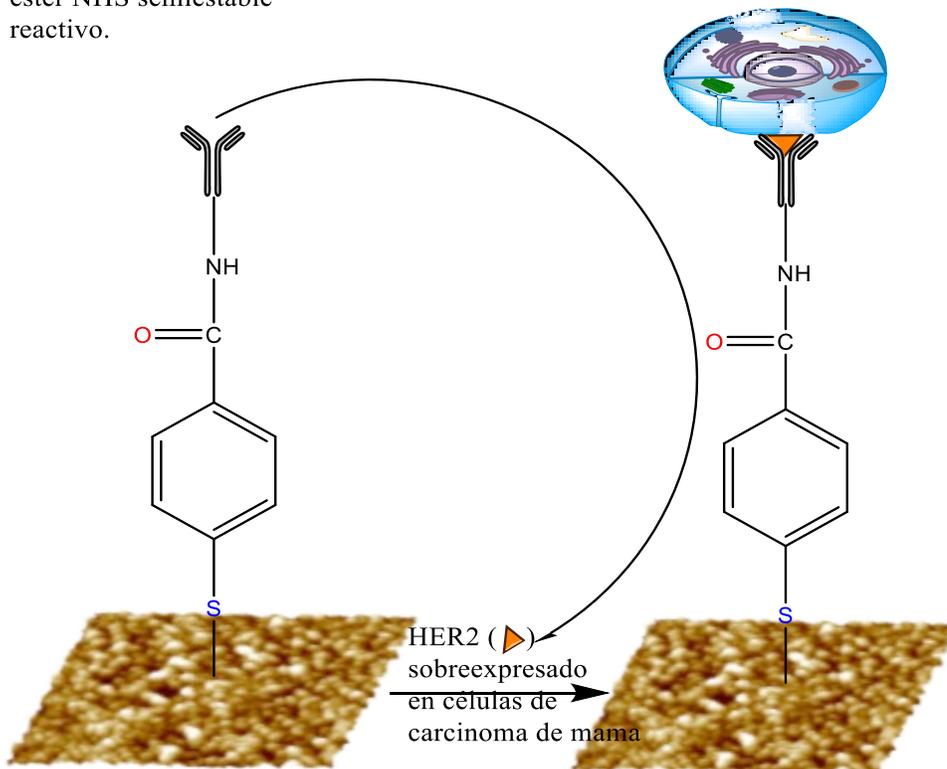
Fase I: Sustrato nanoestructurado con nanopartículas de plata depositadas a través de ablación laser de pulsos (PLA).

Fase II: Quimisorción de la molécula bifuncional ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) sobre el sustrato nanoestructurado. Esto permite la formación de un enlace semicovalente: Ag-S.





Fase III: Formación de un éster NHS semiestable reactivo.



Fase IV: Anclaje del anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Trastuzumab) vía éster NHS reactivo.

Fase V: Los receptores transmembrana (HER2) sobreexpresados en células de carcinoma de mama reconocerán e interaccionarán con las moléculas anti-HER2 ancladas al sustrato nanoestructurado.

Los biosensores basados en SERS ya sea intrínseco o extrínseco se pueden emplear para detectar e identificar moléculas pequeñas, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.

La diferencia entre SERS intrínseco y extrínseco radica en que en el primero la “huella dactilar” del analito de interés se adquiere directamente y en el segundo caso el analito o interacción de interés se asocia con una etiqueta (colorante fluorescente o molécula reportera) que presenta una señal intensa y distinguible.

Existen una amplia gama de moléculas que pueden actuar como reporteras tales como: ácido tioglicólico, ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA), ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), compuestos carboxi-PEG-tiol, etc. Las dos últimas moléculas presentan una cadena hidrocarbonada muy larga, por lo que se requiere mucho tiempo de adsorción para lograr el equilibrio termodinámico, mientras que las primeras dos moléculas son relativamente cortas, pero sólo el 4-MBA presenta modos vibracionales fuertes en la región de la “huella dactilar” que comprende desde 600-1800 cm^{-1} .

Datos de la literatura:

pK_a COOH= 4.79 [37]

pK_a SH= 6.80 [38]

Masa molar: 154.49 g mol^{-1}

Solubilidad: Etanol, éter, DMF, DMSO, agua (muy baja)

Estabilidad: La solución es estable a 25 °C por corto tiempo y a -20 °C durante largo tiempo

Procedimiento experimental

La funcionalización del sustrato nanoestructurado escogido (AgNP 3000 p/ Au) se llevó a cabo con la molécula reportera (4-MBA) de la siguiente manera:

Parte I (Solución acuosa)

1. Se prepararon tres soluciones:
100 mM buffer de fosfatos, pH=1.0
15 mM buffer de fosfatos, pH=2.50
100 mM buffer de acetatos, pH=3.5
2. Se desgasificaron las soluciones previamente con nitrógeno.
3. Se preparó un stock de 4-MBA disuelto en etanol y se tomaron las alícuotas para preparar las concentraciones deseadas: 10 mM, 1 μ M y 50 μ M y se disolvieron en el buffer correspondiente.
4. Se utilizaron dos posibles formas de funcionalizar la superficie nanoestructurada.
 - ✓ Inmersión
 - ✓ Deposición de la solución por medio de una gota
5. Los sustratos nanoestructurados se enjuagaron inmediatamente con buffer y se secó con un chorro de nitrógeno y papel óptico.

La ecuación de Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{(1-\theta)}{\theta}$ se utilizó para calcular el grado de protonación (θ) de los grupos funcionales de la molécula de 4-MBA.

Las condiciones escogidas se basan en:

1. A estos dos diferentes pH se tiene tanto el grupo tiol (SH) y el carboxilo (COOH) casi protonados al 100 %. El grupo COOH se requiere para poder acoplar un grupo amino (NH_2) de una proteína mediante la química de unión EDC/NHS y el grupo tiol (SH) tiene alta afinidad para formar enlaces semi covalentes con los metales nobles.
2. El etanol permite solubilizar el 4-MBA y al mismo tiempo solvatar al grupo tiol.
3. Se utilizó una atmósfera libre de oxígeno sobre la solución durante la inmersión. Esto limita la oxidación del grupo tiol a sulfonatos y otras especies oxigenadas.

Parte II (Solución etanólica)

1. Se preparó una solución de 10 mM de 4-MBA en etanol absoluto.
2. Se desgasificó la solución con un chorro nitrógeno.
3. El sustrato nanoestructurado fue sumergido durante 15 y 30 s en la solución.
4. Al retirar el sustrato nanoestructurado se secó mediante un chorro de nitrógeno y con papel óptico.
5. Se mantuvo durante varios días en un desecador.
6. Posteriormente se enjuagó el sustrato nanoestructurado durante unos segundos en una solución de ácido acético (pH=1.8). Esto permite que la superficie sea acidificada y el grupo carboxilo terminal esté protonado.
7. Posteriormente se volvió a guardar durante varios días en el desecador hasta ser utilizado.

Es necesario que el sustrato esté seco previo a utilizarse con los reactivos de acoplamiento (EDC/NHS).

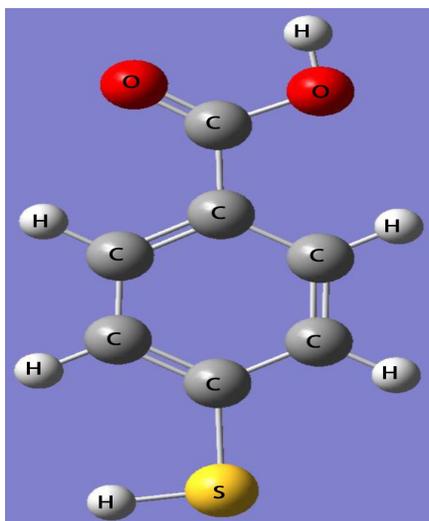


Fig. 27 Confórmero de mínima energía en fase gas del 4-MBA obtenido con el funcional B3LYP y la función base 6-311G (d,p) mediante el software Gaussian[®] 09 [39].

No se encontraron números de onda (frecuencias) imaginarias durante el análisis del cálculo de frecuencias, por lo tanto la estructura de la Fig. 27 expresa un mínimo de energía. La distancia desde el hidrógeno (H) del grupo carboxilo al azufre (S) del grupo tiol o sulfhidrilo es de 0.765 nm. Por otro lado la distancia reportada Ag-S está en 0.237 nm^(VIII).

3.6 Caracterización por AFM del sustrato nanoestructurado con ácido 4-mercapto benzoico (NS-4-MBA)

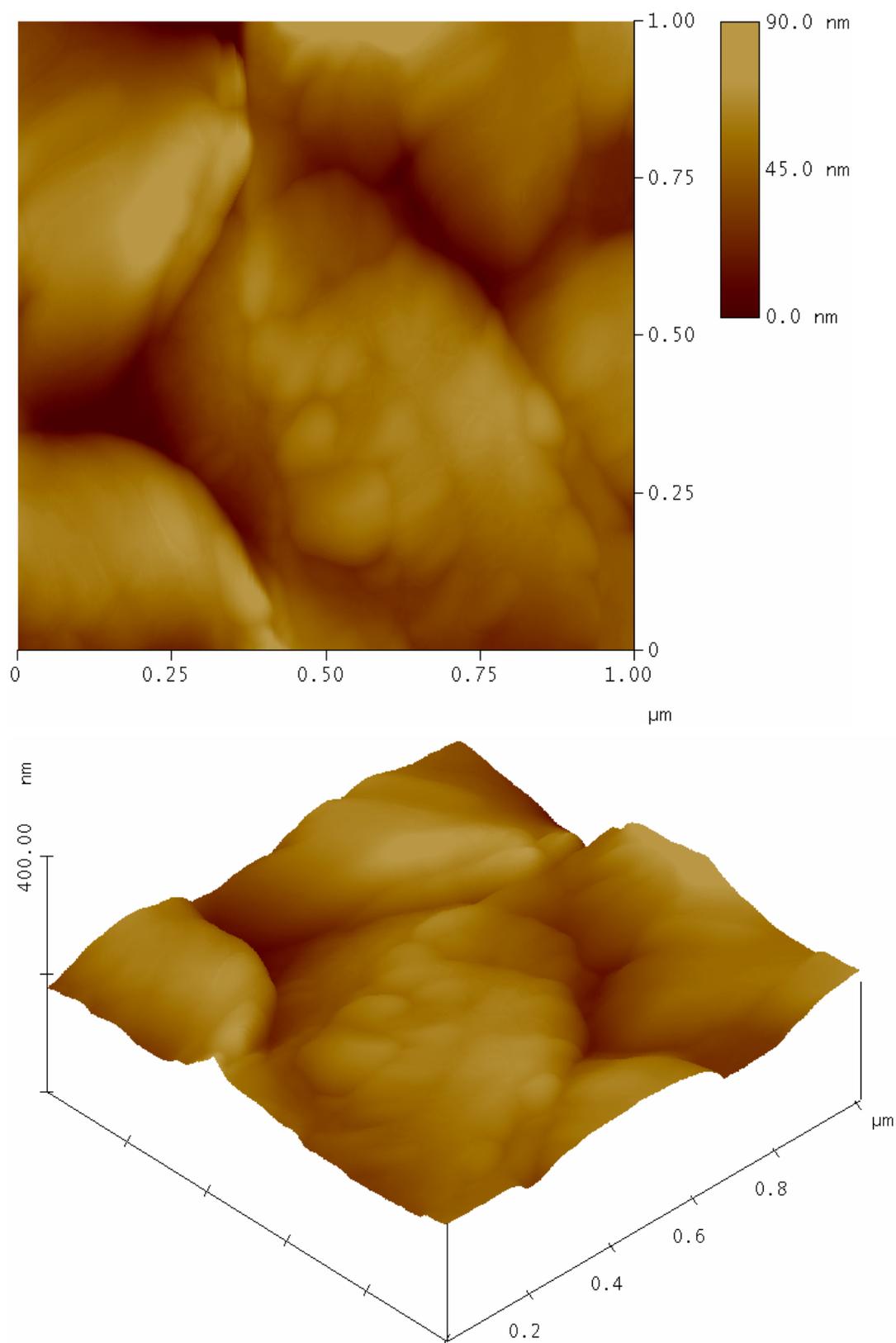


Fig. 28 Sustrato AgNP 3000 p/ Au funcionalizado con 4-MBA (pH=1.0, t=24 h, [4-MBA]=10 mM)

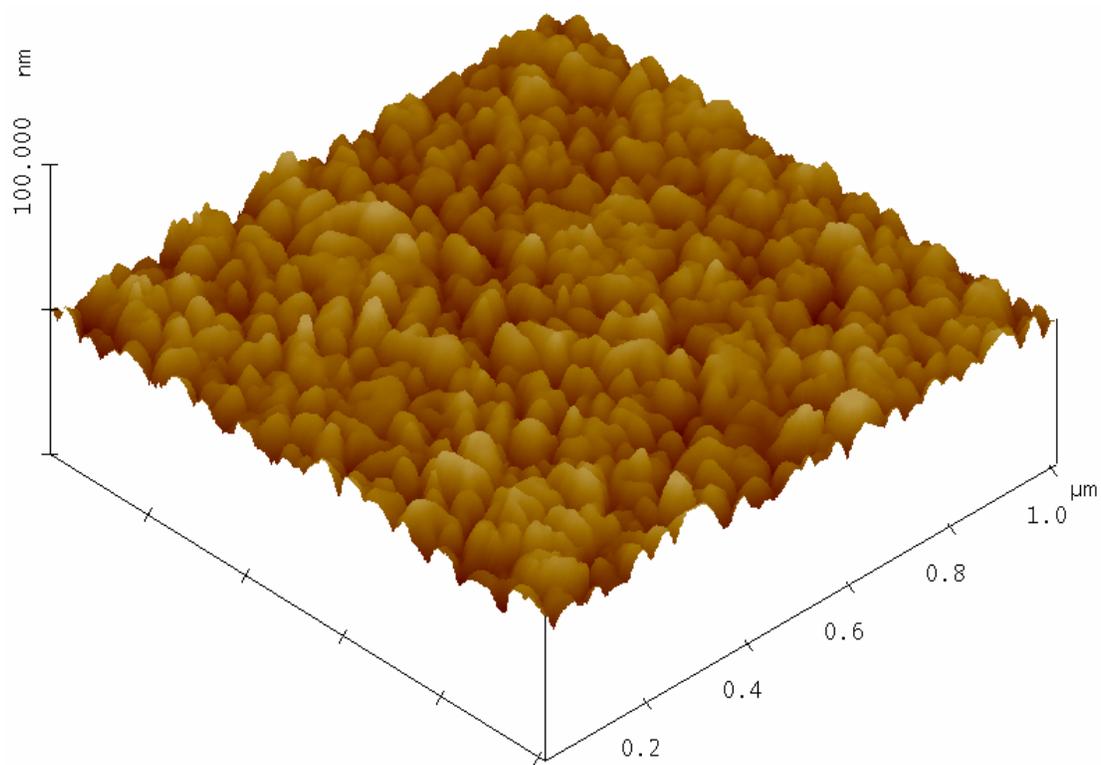
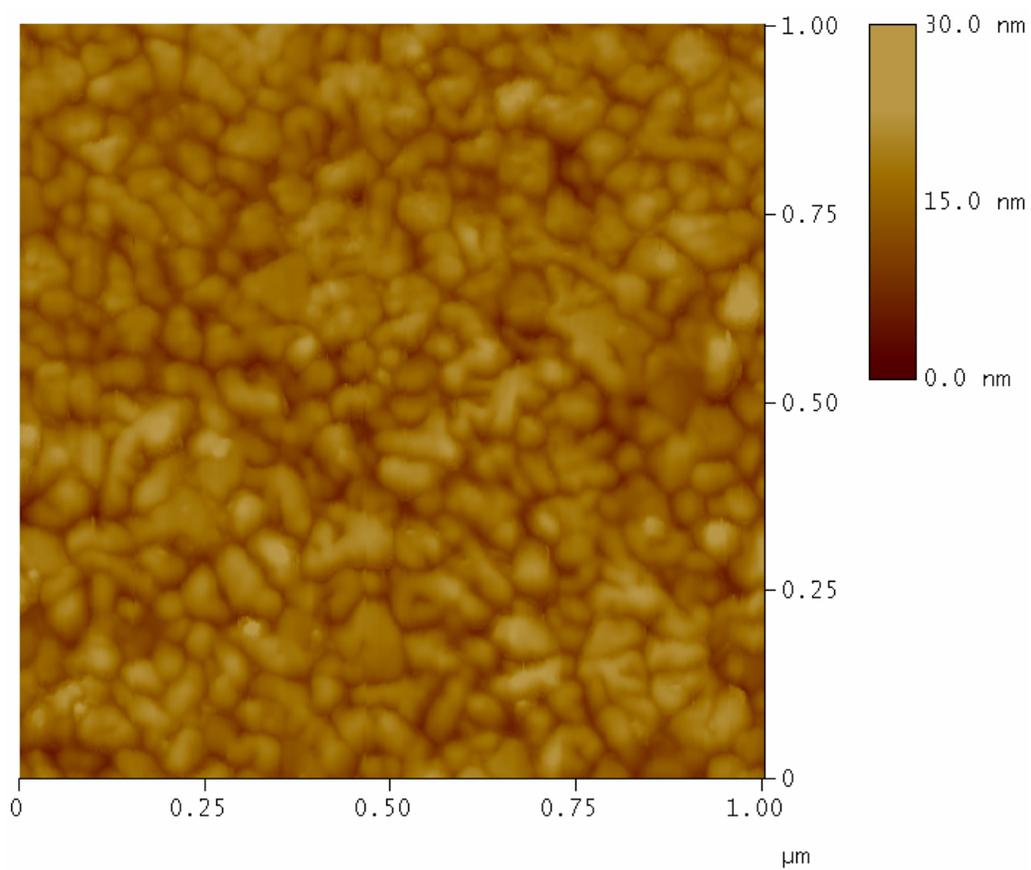


Fig. 29 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA ($\text{pH}=2.5$, $t=1$ min, $[4\text{-MBA}]=50 \mu\text{M}$)

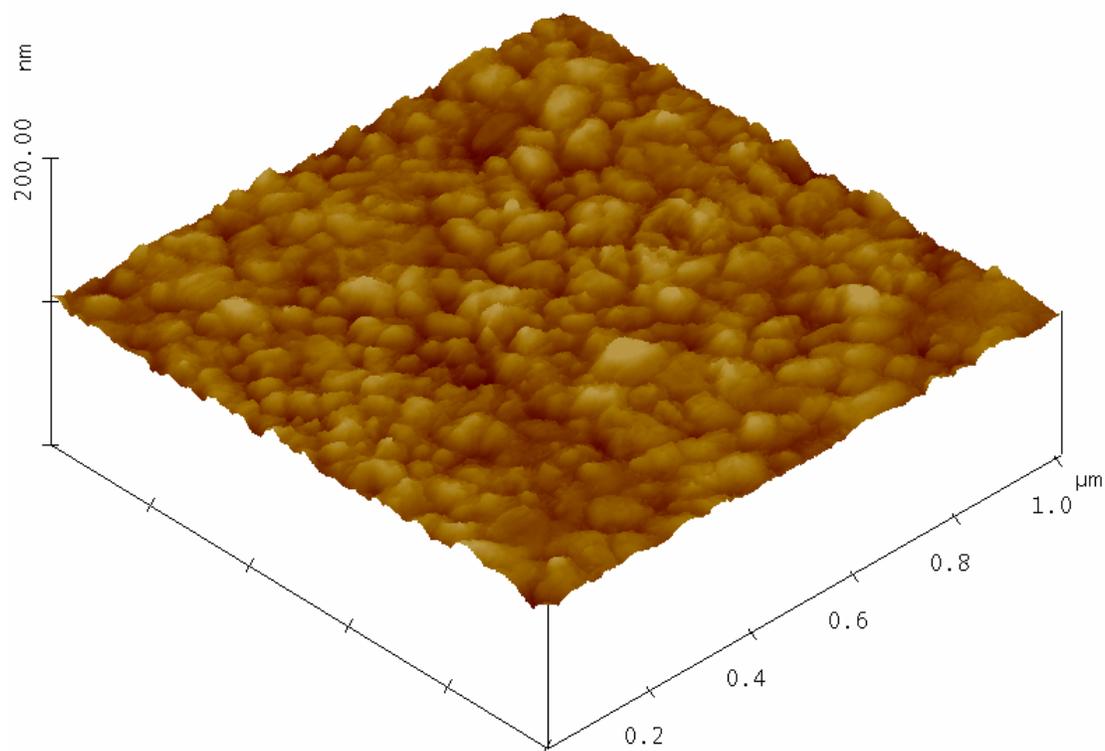
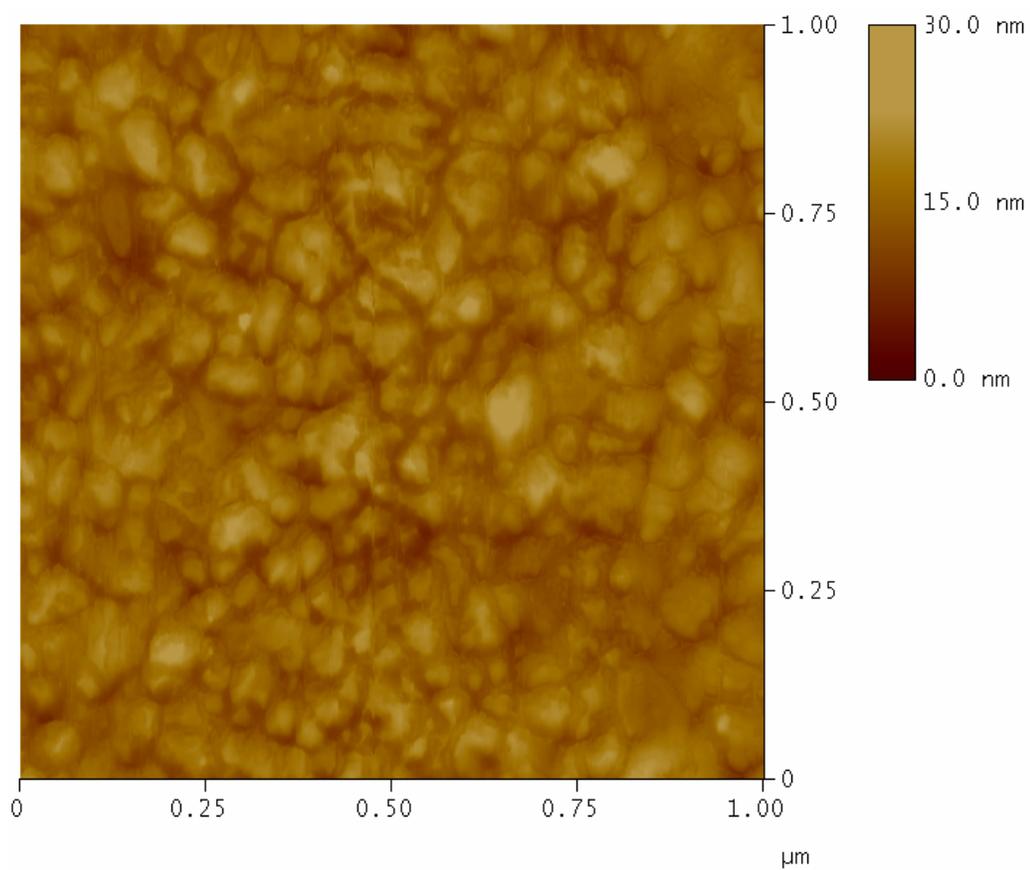


Fig. 30 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA ($\text{pH}=2.5$, $t=3$ min, $[4\text{-MBA}]=1 \mu\text{M}$)

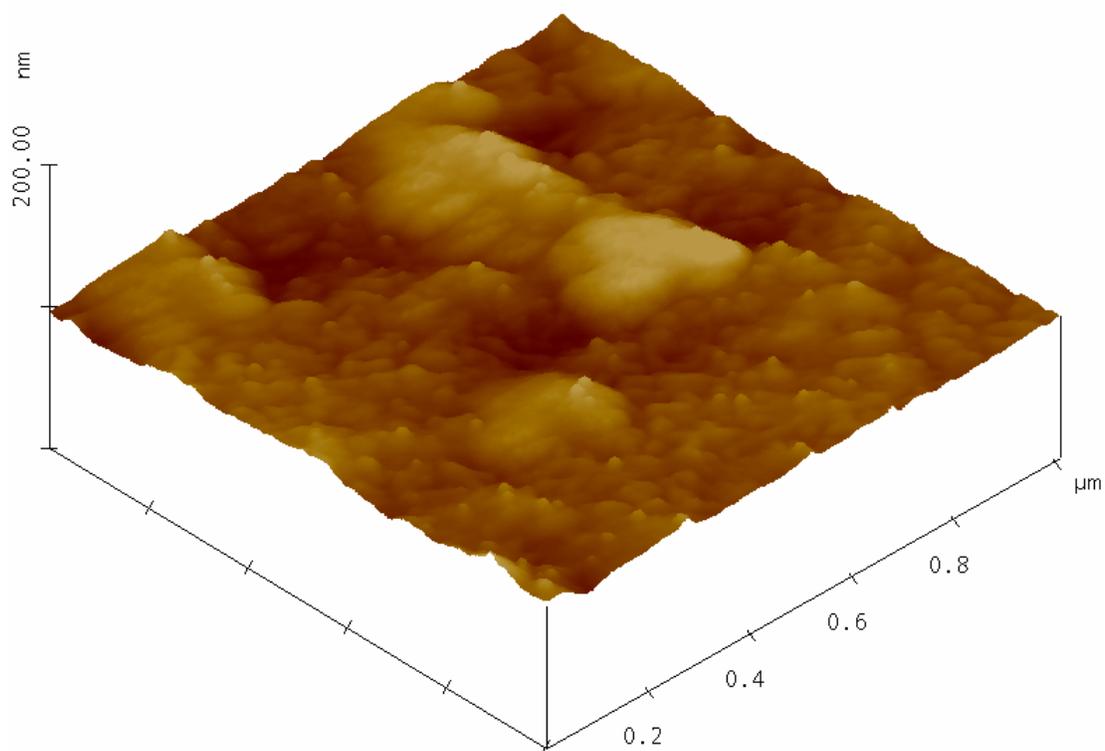
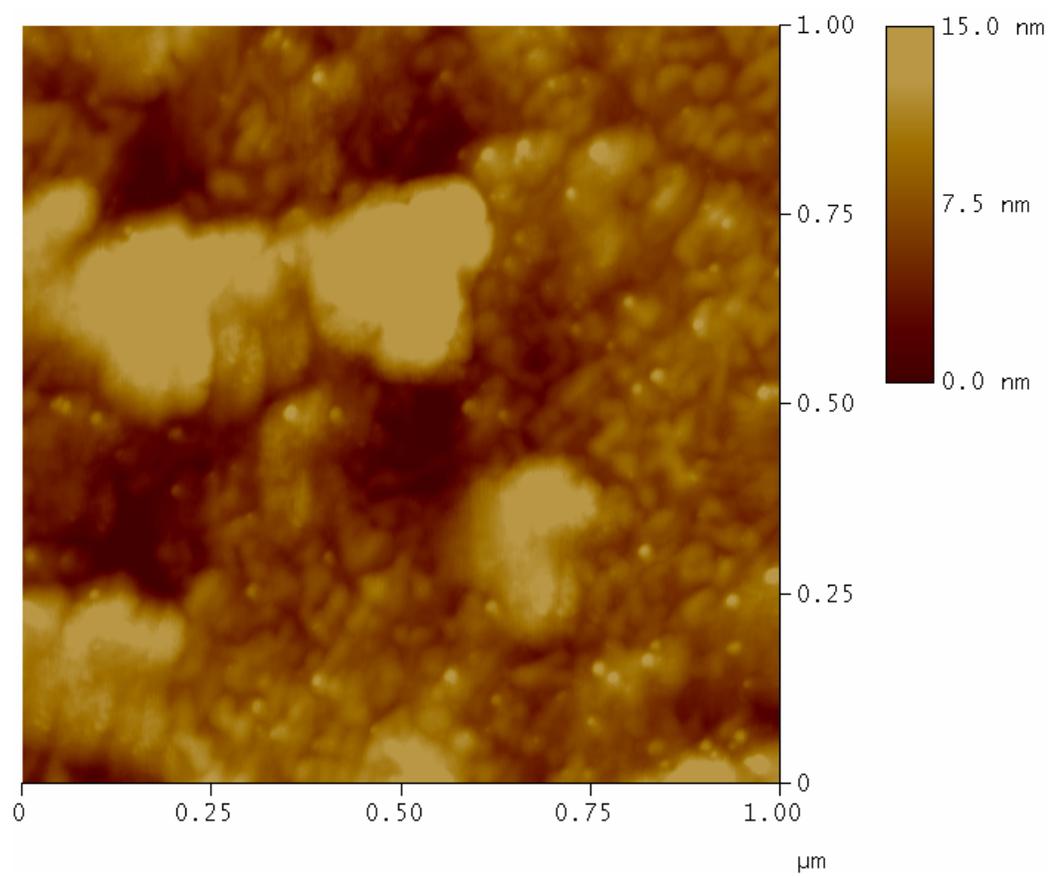


Fig. 31 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA (pH=2.5, t=2 h, [4-MBA]=50 μM)

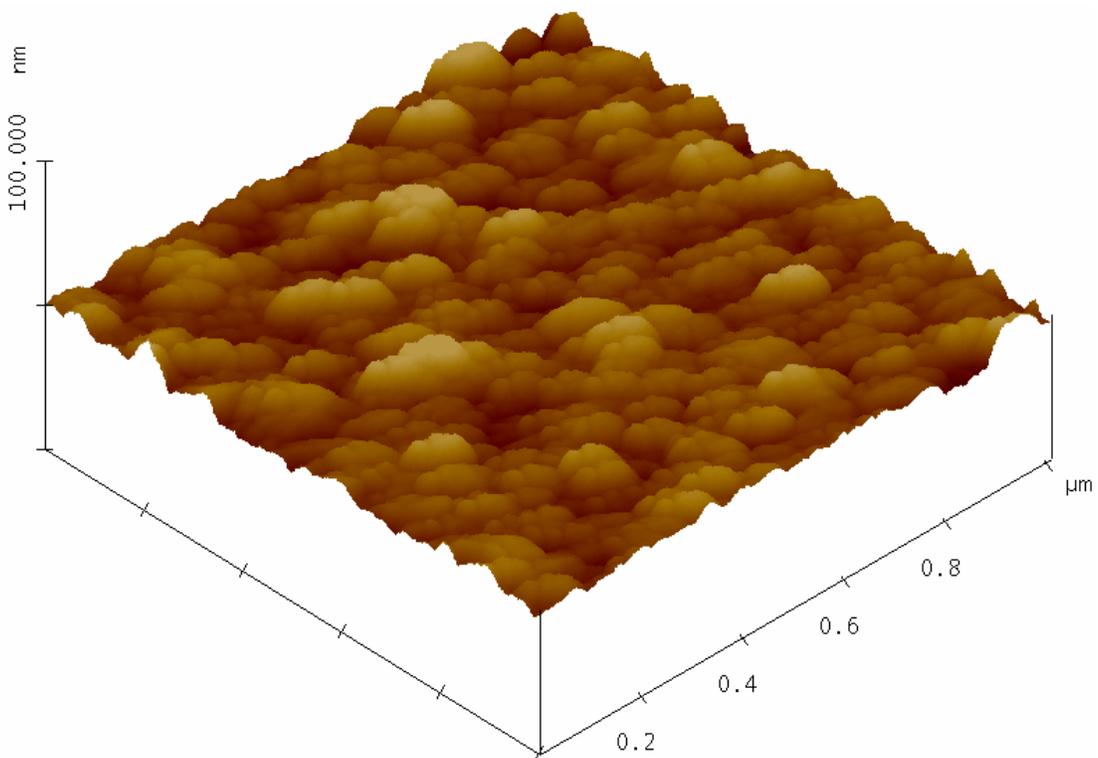
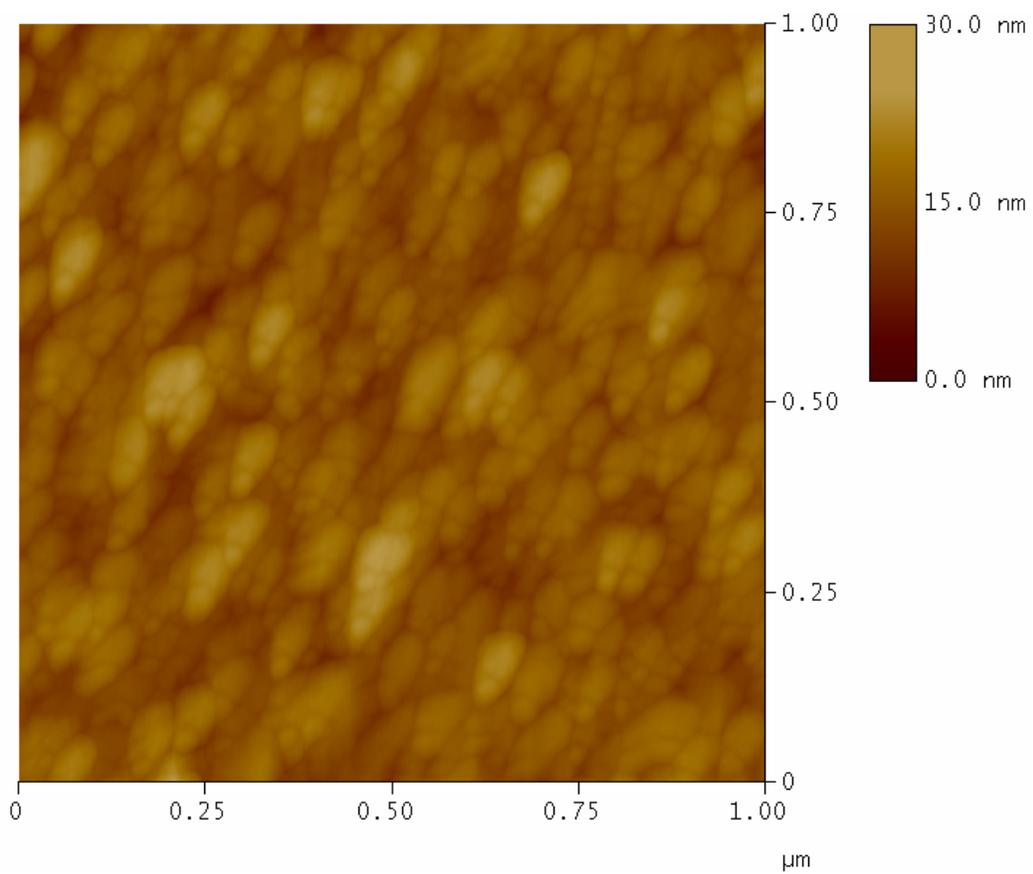


Fig. 32 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA ($\text{pH}=2.5$, $t=100$ min, $[4\text{-MBA}]=1 \mu\text{M}$)

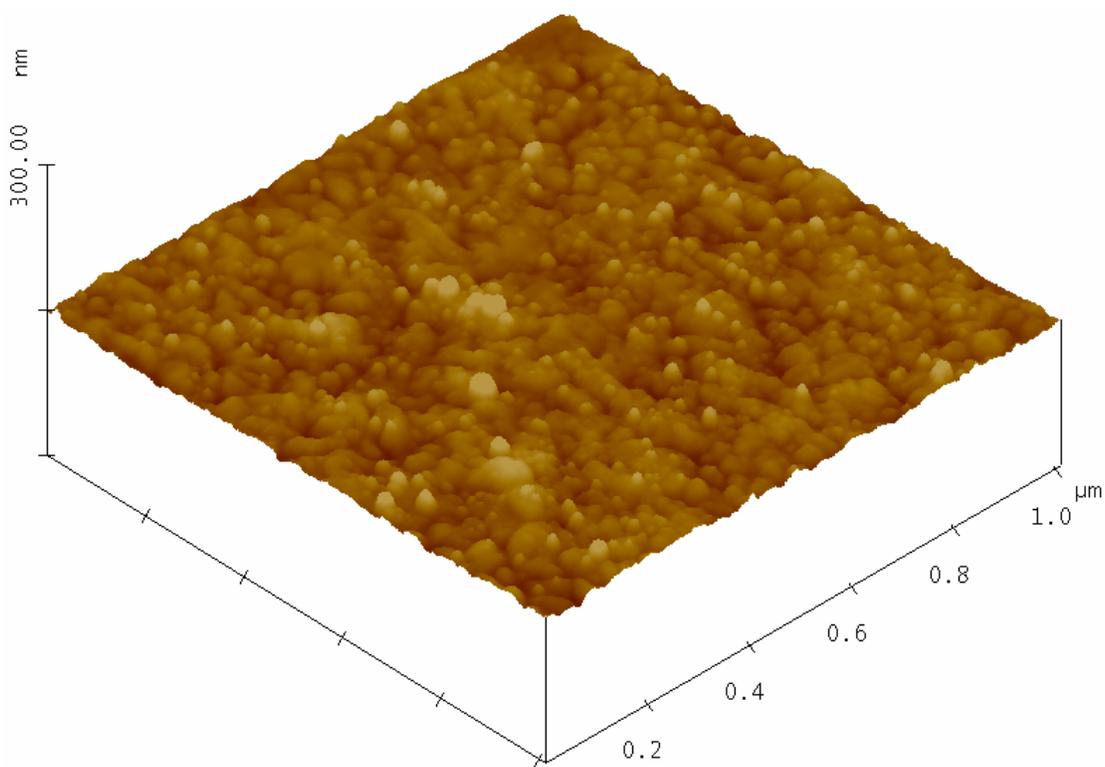
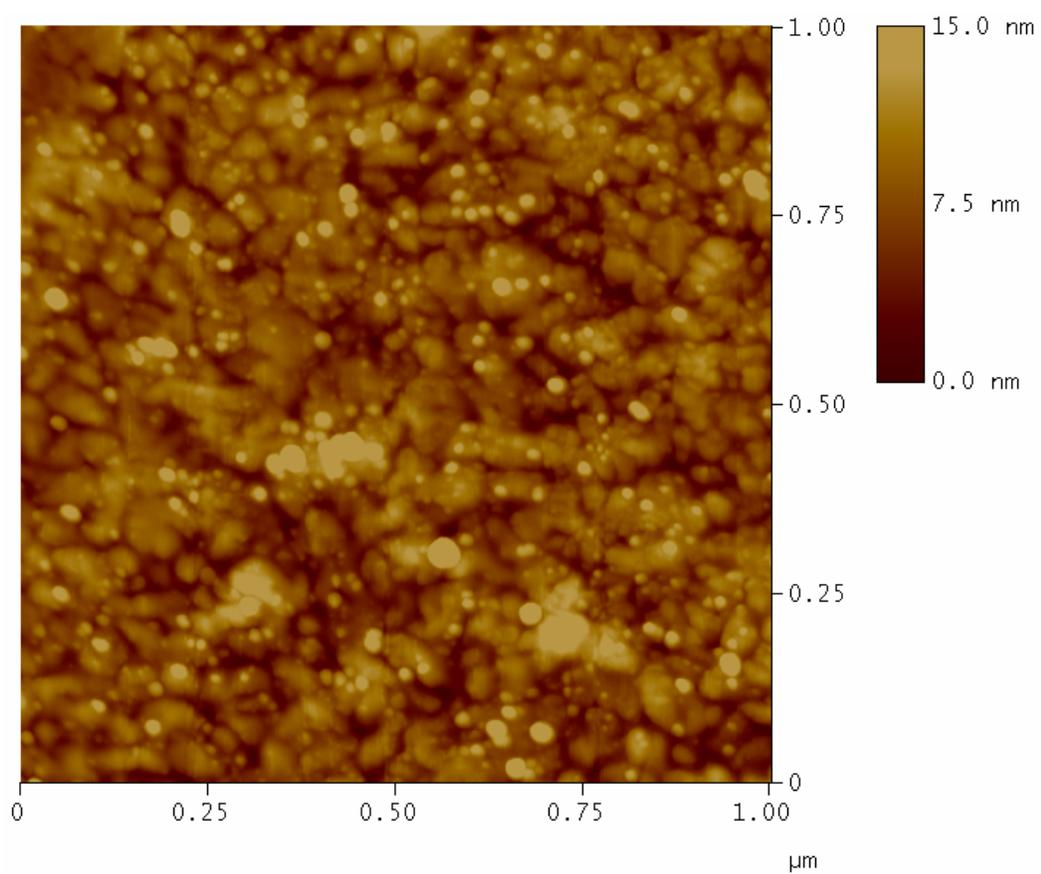


Fig. 33 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA ($\text{pH}=3.5$, $t=100$ min, $[4\text{-MBA}]=1 \mu\text{M}$)

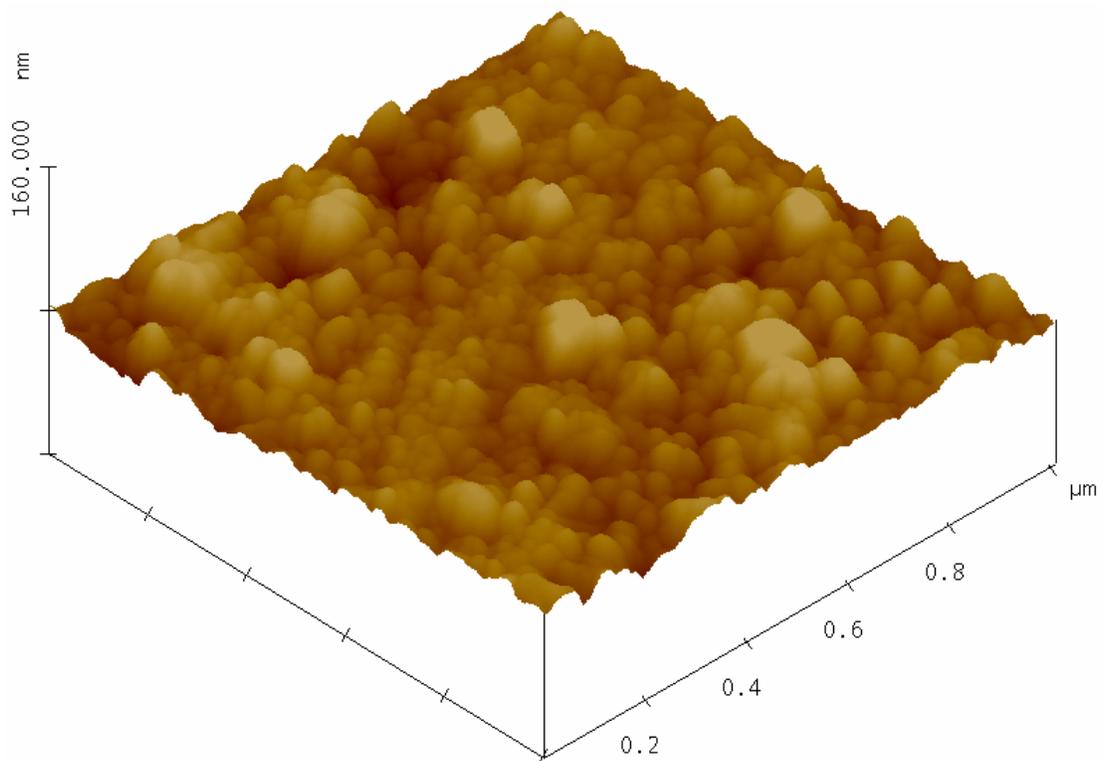
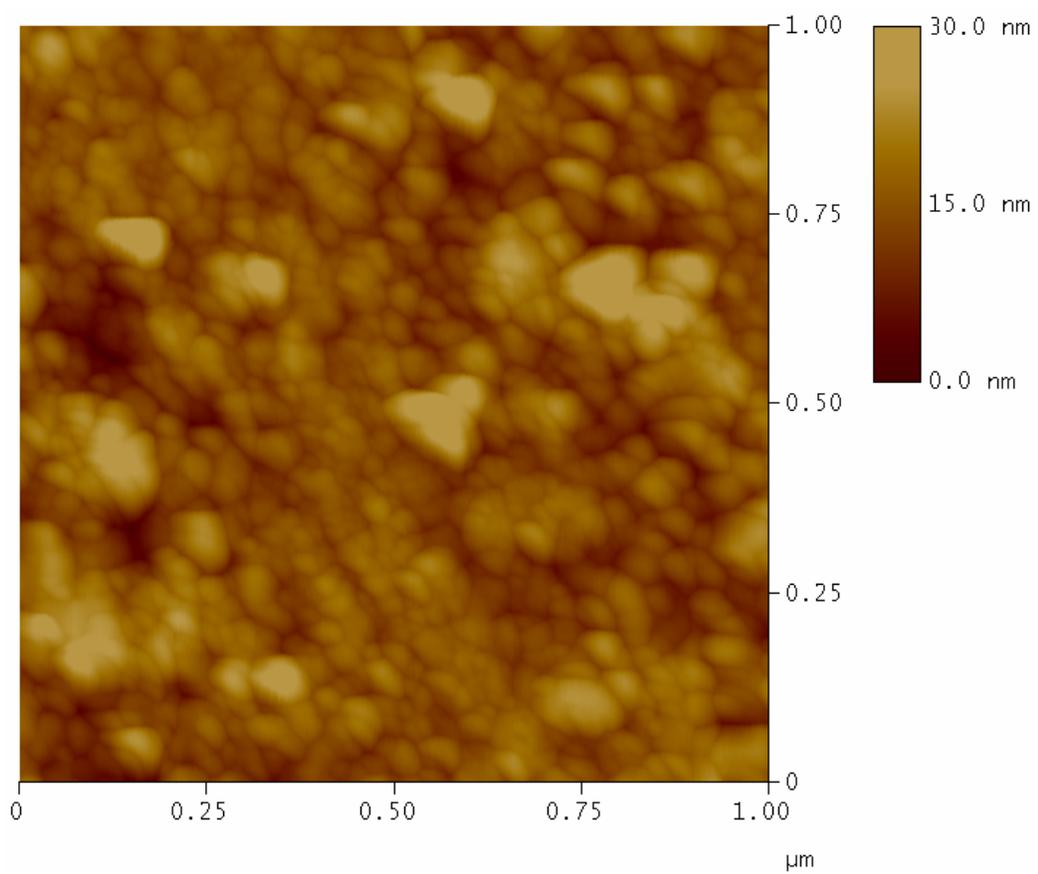


Fig. 34 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA (Solución etanólica, $t=15$ s, $[4\text{-MBA}]=10$ mM)

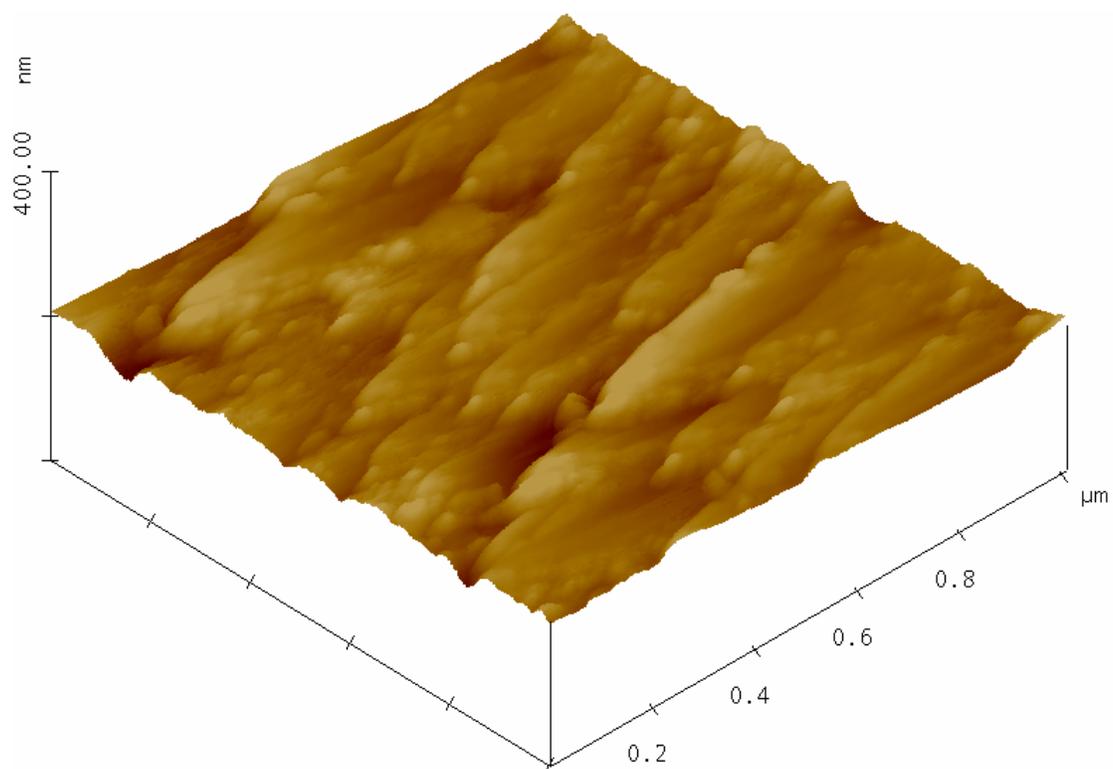
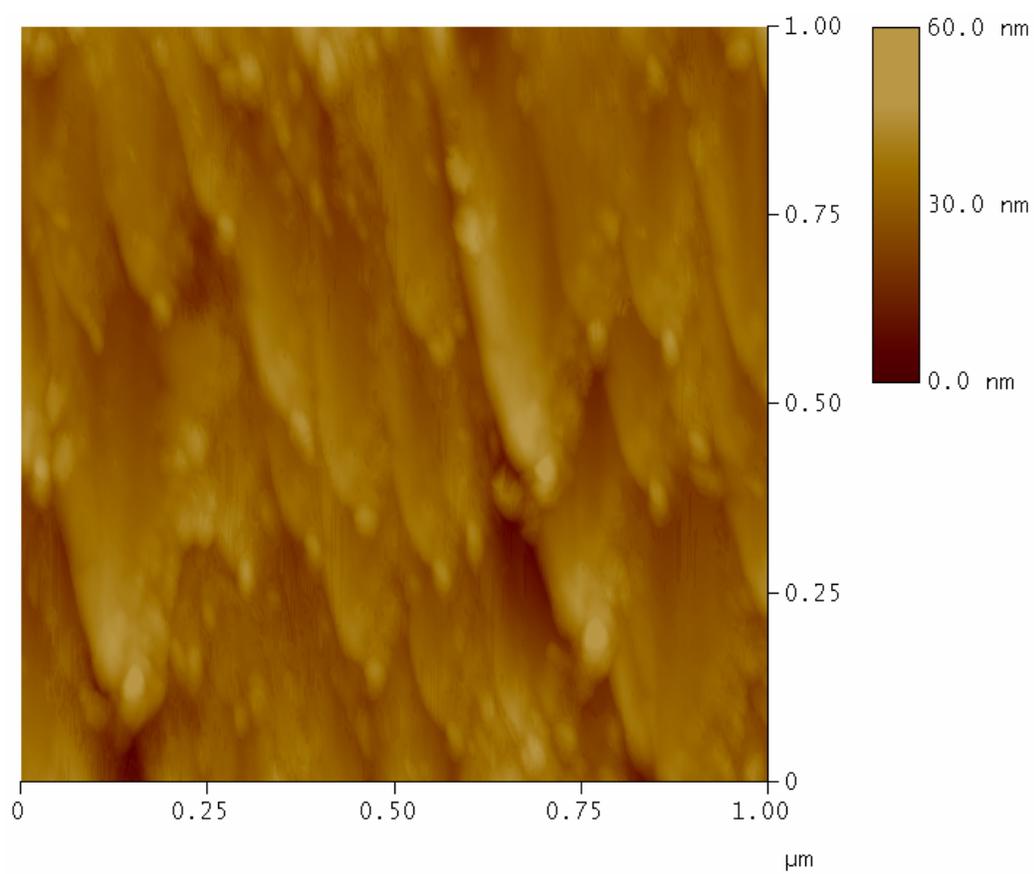


Fig. 35 Sustrato AgNP 3000 p / Au funcionalizado con 4-MBA (Solución etanólica, $t=30$ s, $[4\text{-MBA}]=10$ mM)

3.7 Caracterización por espectroscopia Raman del sustrato nanoestructurado con ácido 4-mercapto benzoico (NS-4-MBA)

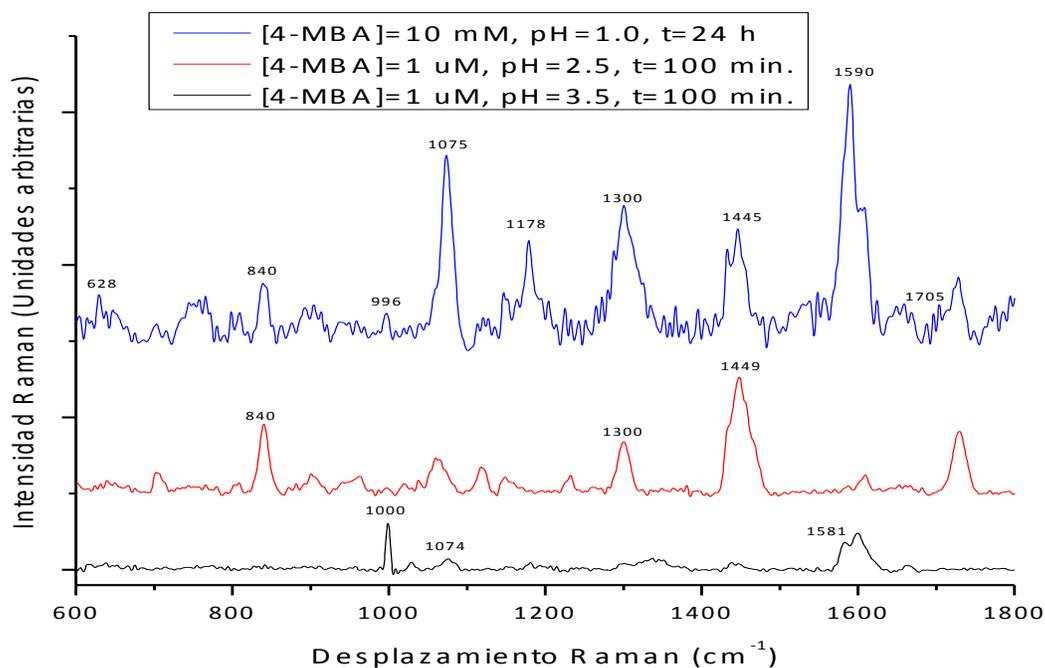


Fig. 36 Espectros Raman de monocapas de 4-MBA adsorbidas sobre el sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p / Au a diferentes condiciones (concentración, pH y tiempo de adsorción).

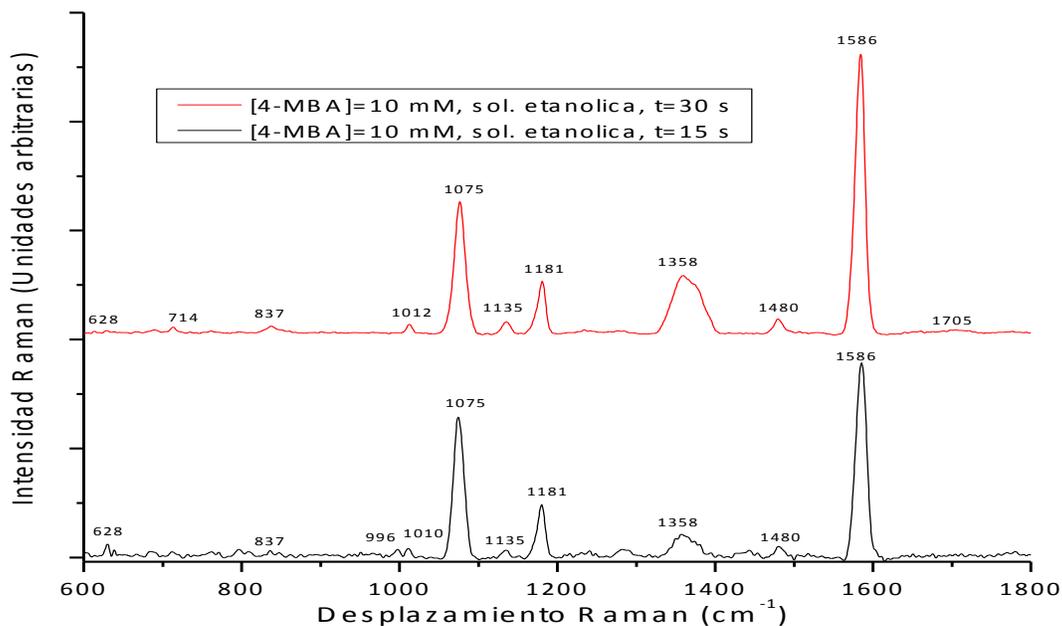


Fig. 37 Espectros Raman de monocapas de 4-MBA adsorbidas sobre el sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p / Au a diferentes tiempos de adsorción.

Tabla 3. Asignación tentativa de bandas del espectro SERS del ácido 4-mercapto benzoico adsorbido sobre el sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p/ Au.

Número de onda de la intensidad Raman / cm^{-1}	Asignación de bandas Raman
1705	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1586	$\nu(\text{CC})$ respiración del anillo
1480	$\delta(\text{CC})$ respiración del anillo
1358	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1181	$\delta(\text{CH})$ del anillo
1135	$\delta(\text{CH})$ del anillo
1075	$\nu(\text{CC})$ respiración del anillo
1010	tiofenol (4-MBA descarboxilado)
1000	tiofenol (4-MBA descarboxilado)
837	$\delta(\text{COO}^-)$
804	$\nu(\text{C}-\text{COOH})$
714	$\gamma(\text{CCC})$
628	$\nu(\text{C}-\text{S})$

ν : stretching, δ : deformación, ω : wagging, γ : deformación (fuera del plano), s: simétrico, as: asimétrico. La asignación de bandas Raman se basa en [40-43].

Tabla 4. Funcionalización del sustrato AgNP 3000 p/ Au con ácido 4-mepto benzoico (4-MBA).

Muestra	Caracterización por AFM	Caracterización por espectroscopia Raman
pH=1.0 t=24 h [4-MBA]=10 mM Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ Diámetro promedio: 290.0 ± 173.5 nm Altura: 12.3 ± 9.9 nm RMS: 16.46 nm	Realizado
pH=2.5 t=1 min [4-MBA]=50 μM Deposición de solución sobre el sustrato	Tamaño de imagen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ Diámetro promedio: 52.0 ± 28.7 nm Altura: 3.6 ± 2.7 nm RMS: 2.88 nm	Realizado
pH=2.5 t=3 min [4-MBA]=1 μM Deposición de solución sobre el sustrato	Tamaño de imagen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ Diámetro promedio: 50.6 ± 12.77 nm Altura: 1.4 ± 1.0 nm RMS: 2.66 nm	No señal
pH=2.5 t=100 min [4-MBA]=1 μM Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ Diámetro promedio: 46.9 ± 14.0 nm Altura: 1.8 ± 1.4 nm RMS: 2.49 nm	Realizado

pH=2.5 t=2 h [4-MBA]=50 μ M Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 61.0 \pm 29.0 nm Altura: 1.1 \pm 0.6 RMS: 3.65 nm	No señal
pH=3.5 t=100 min [4-MBA]=1 μ M Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 41.1 \pm 5.9 nm Altura: 2.1 \pm 1.8 nm RMS: 2.88 nm	Realizado
Solución etanólica t=15 s [4-MBA]= 10 mM Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 43.7 \pm 12.2 nm Altura: 3.0 \pm 2.7 nm RMS: 2.88 nm	Realizado
Solución etanólica t=30 s [4-MBA]= 10 mM Inmersión del sustrato en la solución	Tamaño de imagen: 1 μ m x 1 μ m Diámetro promedio: 111.9 \pm 30.3 nm Altura: 3.1 \pm 2.5 nm RMS: 2.88 nm	Realizado

3.8 Discusión y conclusiones sobre la funcionalización del sustrato nanoestructurado.

La funcionalización del sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p / Au se llevó a cabo a diferentes condiciones de concentración de ácido 4-mercapto benzoico (4-MBA), solvente, pH y tiempo de adsorción.

Las imágenes de AFM así como sus respectivos espectros Raman muestran que la mejor condición de funcionalización fue:

- ✓ [4-MBA]= 10 mM disuelto en alcohol absoluto
- ✓ 15 segundos de adsorción del sustrato en la solución anterior

Estas condiciones preservan la nanoestructura al no formar demasiados aglomerados de nanopartículas. Al inicio el sustrato AgNP 3000 p / Au presenta un diámetro promedio de 45.0 \pm 16.7 nm y después de la funcionalización su diámetro es 43.7 \pm 12.2 nm.

3.9 Anclaje del anticuerpo monoclonal trastuzumab al NS-4-MBA mediante la química de unión EDC/NHS

El N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC·HCl) es una carbodiimida soluble en agua que se usa como un reactivo de acoplamiento versátil para formar enlaces amida. Presenta gran estabilidad de almacenaje, no higroscopicidad y es ligeramente sensitivo a hidrólisis.

Permite la activación de un grupo carboxilo (-COOH) formando el intermediario *O*-acilisourea. Ésta es una especie altamente reactiva que fácilmente reacciona con aminas.

Debido a que la *O*-acilisourea puede rearrreglarse irreversiblemente a *N*-acilurea y racemizar, se necesita un aditivo tal como el *N*-hidroxisuccinimida (NHS), el cual se usa para suprimir la racemización [44].

La adición de este último reactivo forma un éster NHS semiestable. Los ésteres NHS crean enlaces amida (principalmente) e imida estables con aminas primarias y secundarias, tales como el *N*-terminal libre y los grupos ϵ -aminos presentes en las lisinas de las cadenas laterales de las proteínas.

Los ésteres NHS tienen un vida media de 4-5 horas a pH 7.0-7.5 y minutos a pH 9.0 [45]. La hidrólisis de los ésteres NHS compite con la reacción de acoplamiento con la amina primaria, por lo que el intervalo de pH óptimo para el acoplamiento amino al éster NHS es de 8.0-9.0 siendo muy eficiente a pH 8.3. La adición de etanolamina a pH 8.5 al final de la reacción promueve la desactivación de los ésteres NHS activados.

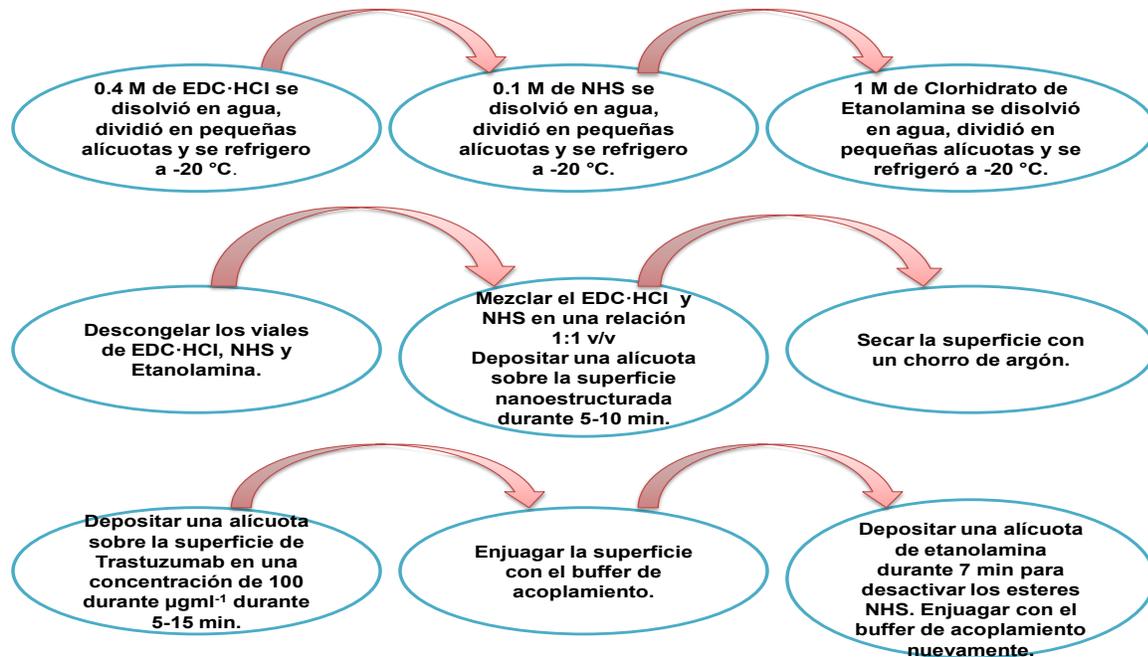


Fig. 38 Protocolo adaptado de N.J. de Mol *et al.* [46].

Los receptores de la superficie celular, tales como las proteínas de la familia HER, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta, el receptor del factor de crecimiento de fibroblasto y el receptor del factor 1 de crecimiento similar a insulina (IGFR) se ha demostrado que están sobreexpresados en cánceres humanos [47].

Las proteínas de la familia *ErbB* (HER) está compuesta de cuatro miembros comúnmente referidos como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4. Cada uno de estos receptores HER son culpables en alguna forma del desarrollo de tumores malignos, aunque algunos están más involucrados que otros^(IX).

El proto-oncogen *ErbB2* (HER2) codifica una glicoproteína similar a receptor transmembranal de 185 kDa con actividad tirosina quinasa intrínseca [48]. HER2 se encuentra sobreexpresado del 25-30 % de los cánceres de mama primarios [49], por lo que es un blanco terapéutico clave en el tratamiento de cáncer de mama y otros carcinomas.

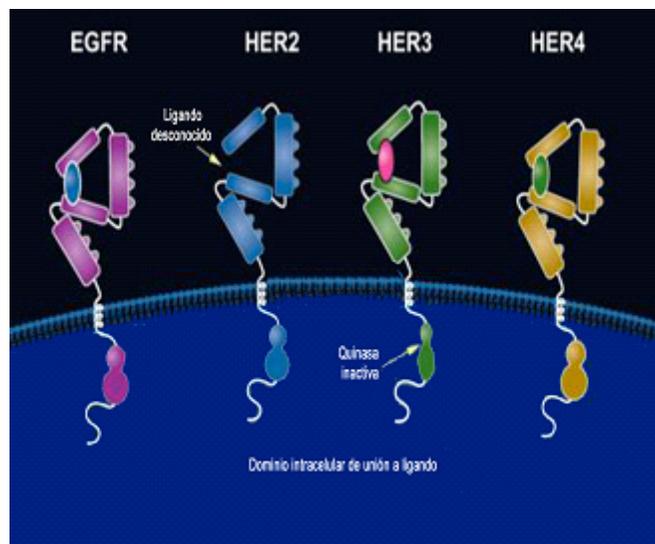
Los receptores HER2 se encuentran casi en su totalidad sobre la superficie de las células de mama (aunque también están presentes en otros tipos de células tales como: ovario, estómago). Cuando las células empiezan a sobreexpresar receptores HER2 extras, estos estimulan a que las células se dividan y crezcan fuera de control, lo cual es llamado cáncer de mama HER2 positivo.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante para humanos dirigido contra el dominio extracelular (ectodominio) del receptor HER2 (p105). Éste se une selectivamente con alta afinidad y especificidad a los receptores HER2 sobreexpresados en las células de mama inhibiendo la proliferación de estas^(X). Fue aprobado en 1998 por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos^(XI) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (HER2 positivo) cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

Hasta el momento el cáncer de mama HER2 positivo típicamente tiene pobre pronóstico.

Los métodos más usados para diagnosticar HER2 son:

- ❖ Inmunohistoquímica (IHC)
- ❖ Hibridación *in-situ* de fluorescencia (FISH)
- ❖ Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)



^(XII) **Esquema 4.** Representación esquemática de los receptores transmembrana HER sobre una célula de mama.

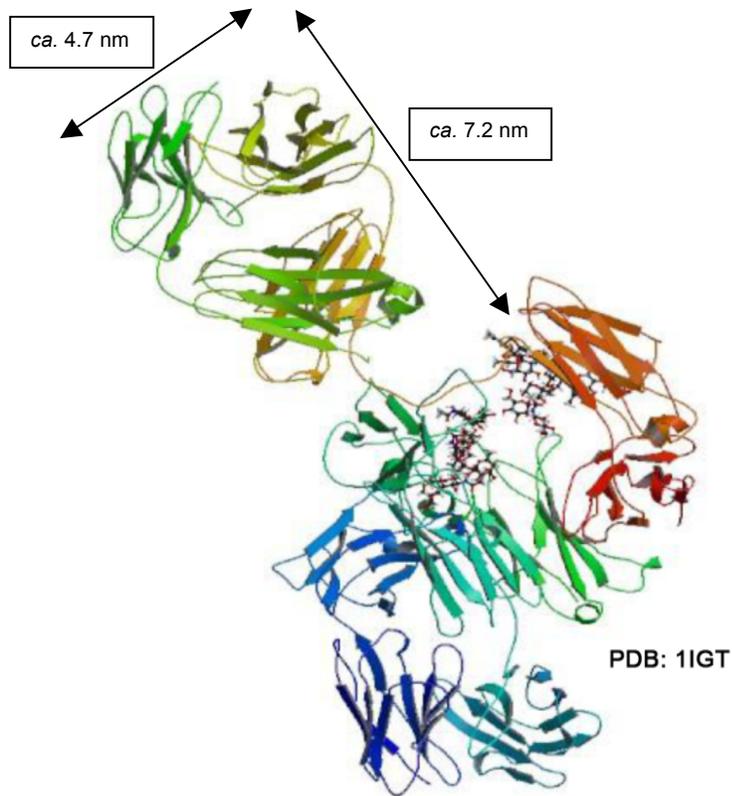


Fig. 39 Estructura cristalográfica de una inmunoglobulina.

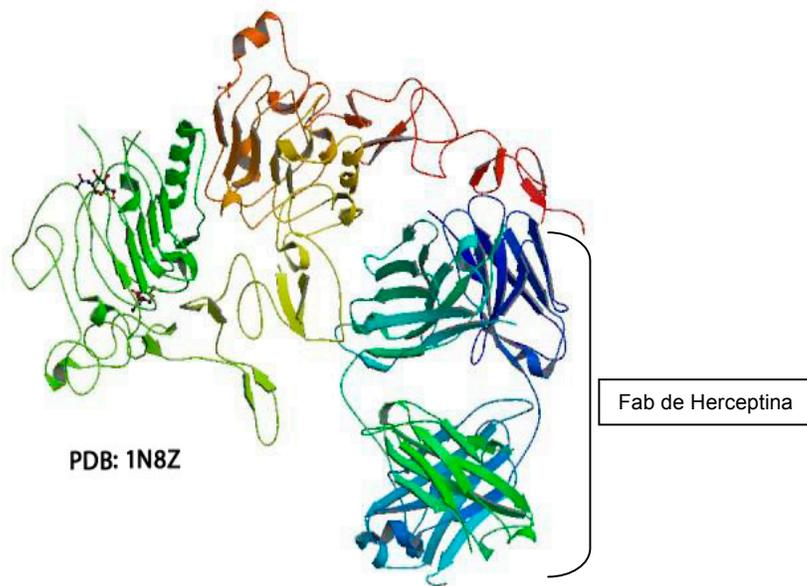


Fig. 40 Estructura cristalográfica del complejo dominio extracelular de HER2 con el fragmento de unión al antígeno (Fab) de Herceptina.

NOTA: Los datos numéricos fueron obtenidos del programa Jmol del Banco de Datos de Proteínas (PDB).

Procedimiento experimental

Las monocapas de 4-MBA (10 mM, solución etanólica, $t=15$ s) se escogieron para su funcionalización con el anticuerpo monoclonal (trastuzumab) debido a que:

- ❖ presenta buena preservación de la nanoestructura (diámetro= 43.7 ± 12.2 nm) de acuerdo a su imagen de AFM (Fig. 34).
- ❖ presenta un espectro Raman bien definido y con poca acumulación de grupos carboxilatos (COO^-), los cuales están en 1358 cm^{-1} .

Condiciones del anclaje de trastuzumab a las monocapas de 4-MBA son:

1. La superficie de SAM 4-MBA se activó durante 20 y 30 minutos con los reactivos de acoplamiento EDC/NHS.
2. Se depositó $50 \mu\text{L}$ de trastuzumab (0.1 mgml^{-1} , $\text{pH}=8.3$) durante 20 y 30 minutos sobre la superficie previamente activada.
3. Se desactivó la superficie con $50 \mu\text{L}$ de clorhidrato de etanolamina (1.0 M , $\text{pH}=8.5$) durante 7 minutos.
4. Se enjuagó la superficie con buffer 55 mM fosfatos, $\text{pH}=7.4$.

3.10 Caracterización por espectroscopia Raman del NS-4-MBA-trastuzumab

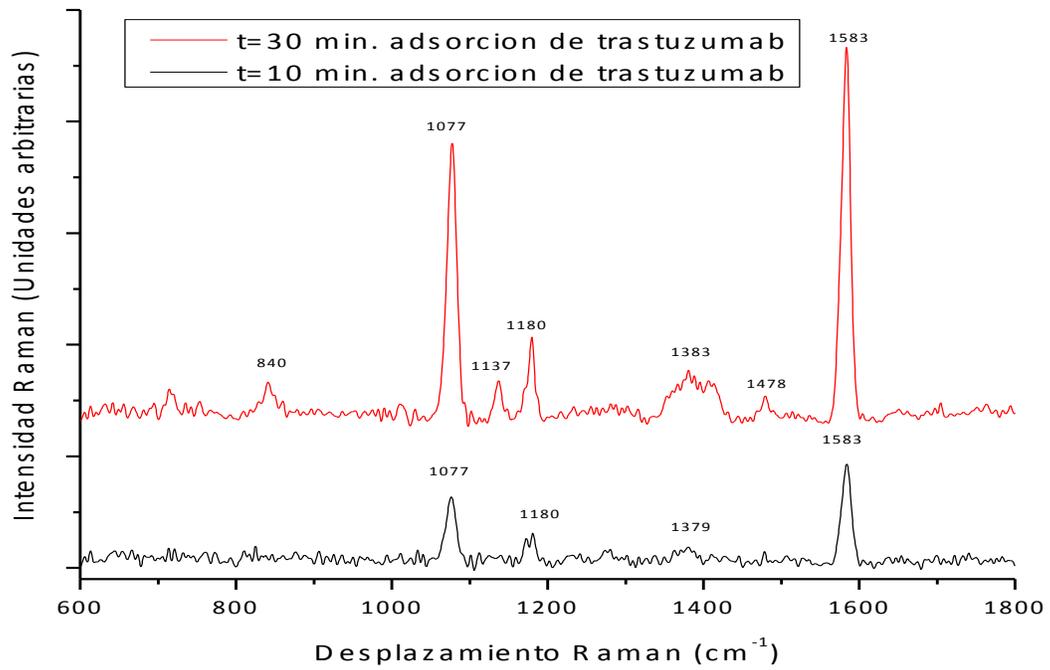


Fig. 41 Espectros Raman de la adsorción de trastuzumab a diferentes tiempos (10 y 30 minutos) sobre las monocapas de 4-MBA (10 mM, t=15 s, solución etanólica). La superficie se activó con los reactivos de acoplamiento EDC/NHS durante 10 minutos y posteriormente se dejó adsorber trastuzumab variando el tiempo.

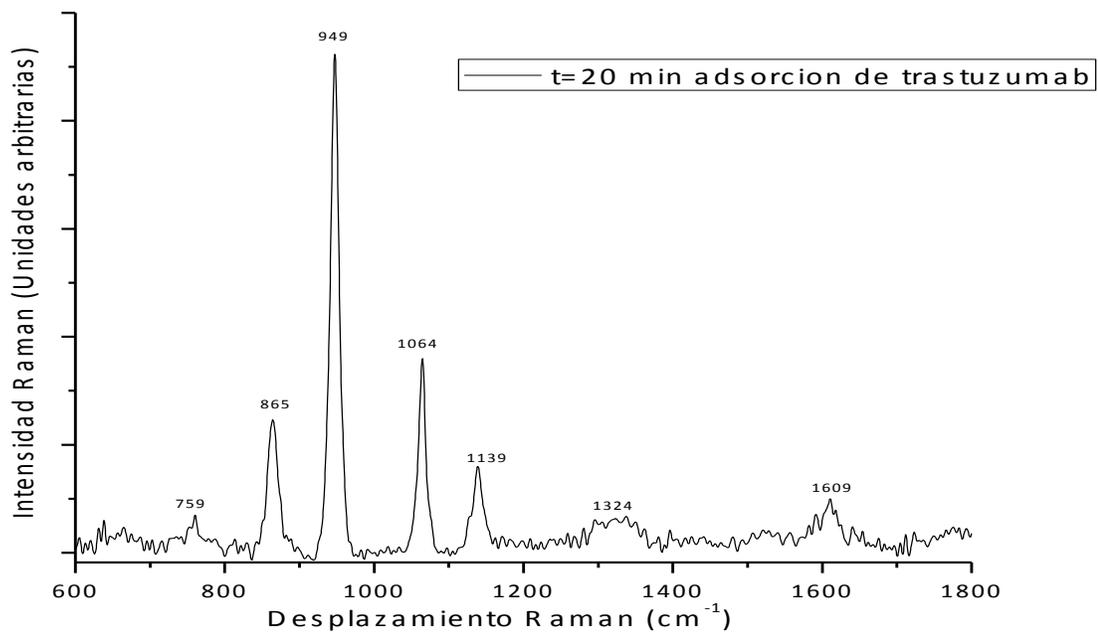


Fig. 42 Espectro Raman de la adsorción de trastuzumab durante 20 minutos sobre las monocapas de 4-MBA (10 mM, solución etanólica, $t=15$ s.). La superficie se activó con los reactivos de acoplamiento EDC/NHS durante 10 minutos y posteriormente se dejó adsorber trastuzumab.

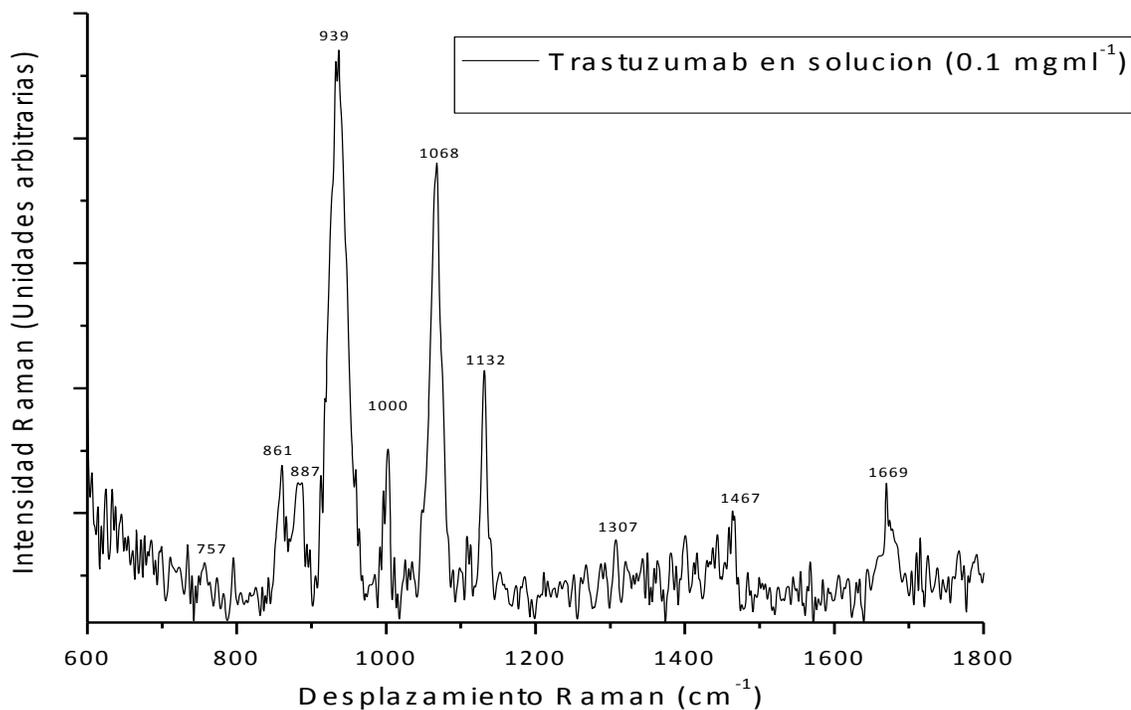


Fig. 43 Trastuzumab en solución (0.1 mg ml^{-1}). Se depositó una gota de ca. $5 \mu\text{l}$ en un capilar y se procedió a obtener su

espectro Raman.

Tabla 5. Asignación tentativa de bandas de los espectros Raman de t=20 min de adsorción de trastuzumab y trastuzumab en solución (0.1 mgml⁻¹).

Número de onda de la intensidad Raman / cm ⁻¹	Asignaciones de bandas Raman
1669	Amida I
1609	ν (C=C) de tirosina, fenilalanina
1467	δ (CH)
1324	δ (CH), amida III
1307	τ (CH ₂)
1132	ν (cadena C-C)
1068	ν (cadena C-C)
1000	Respiración simétrica del anillo de fenilalanina
939	ν_s (esqueleto C-C), hélice- α
887	ν (esqueleto C-C)
856	Respiración del anillo de tirosina
757	Respiración del anillo de triptofano

ν : stretching, δ : bending, τ : twisting, s: simétrico. La asignación de bandas Raman se basa en [50-52].

3.11 Caracterización por AFM del NS-4-MBA-trastuzumab

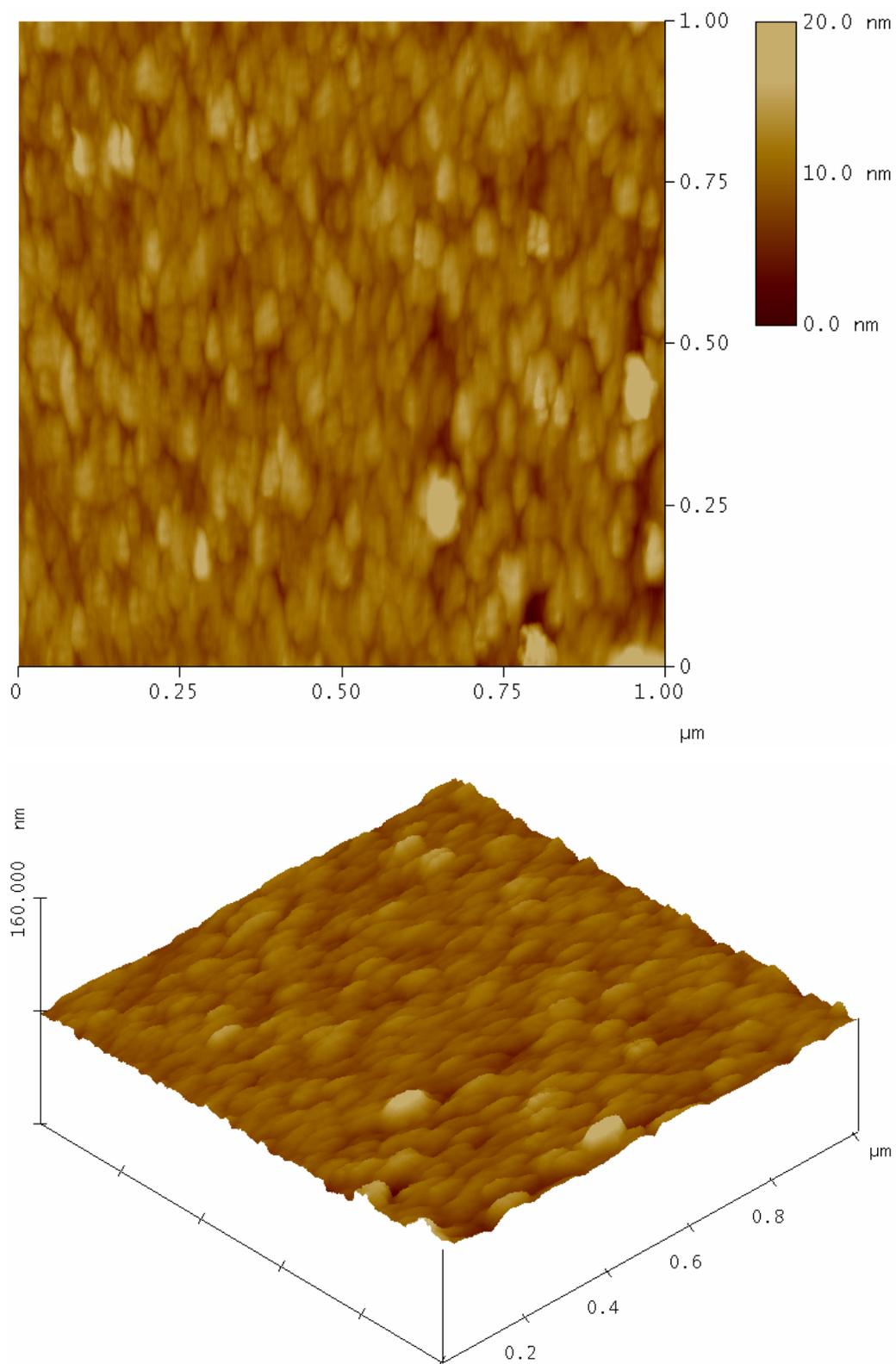


Fig. 44 Anclaje de trastuzumab (tiempo de adsorción= 10 min.) sobre las monocapas autoorganizadas de 4-MBA ([4-MBA]=10 mM, sol. etanólica, t=15 s) vía el intermediario de los reactivos de acoplamiento EDC/NHS.

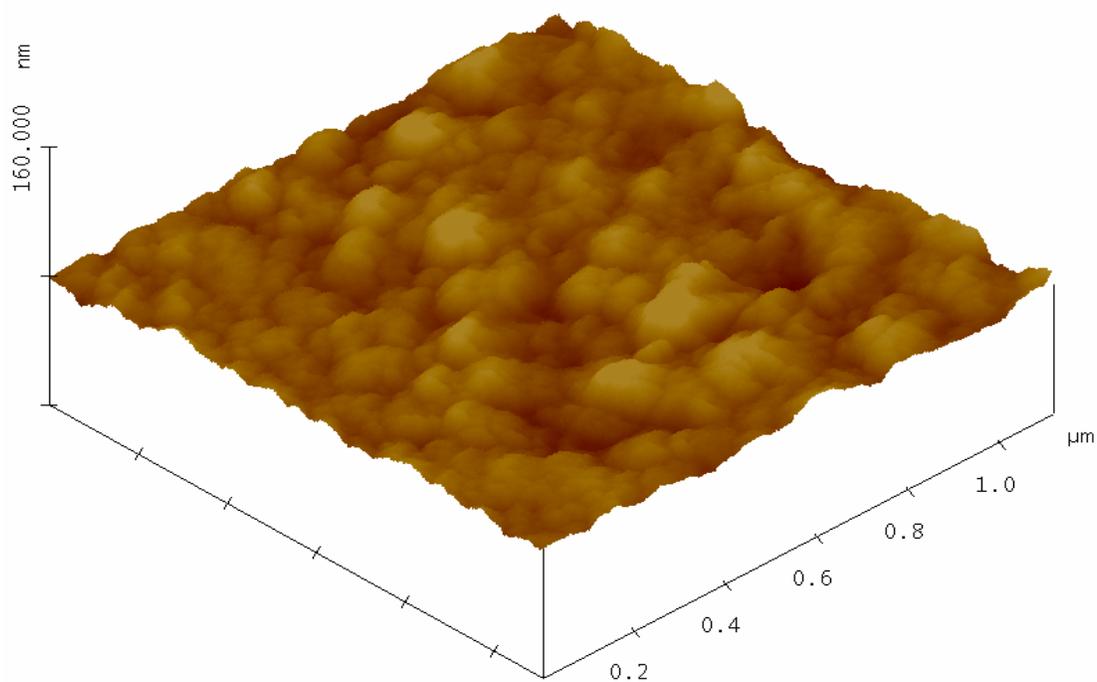
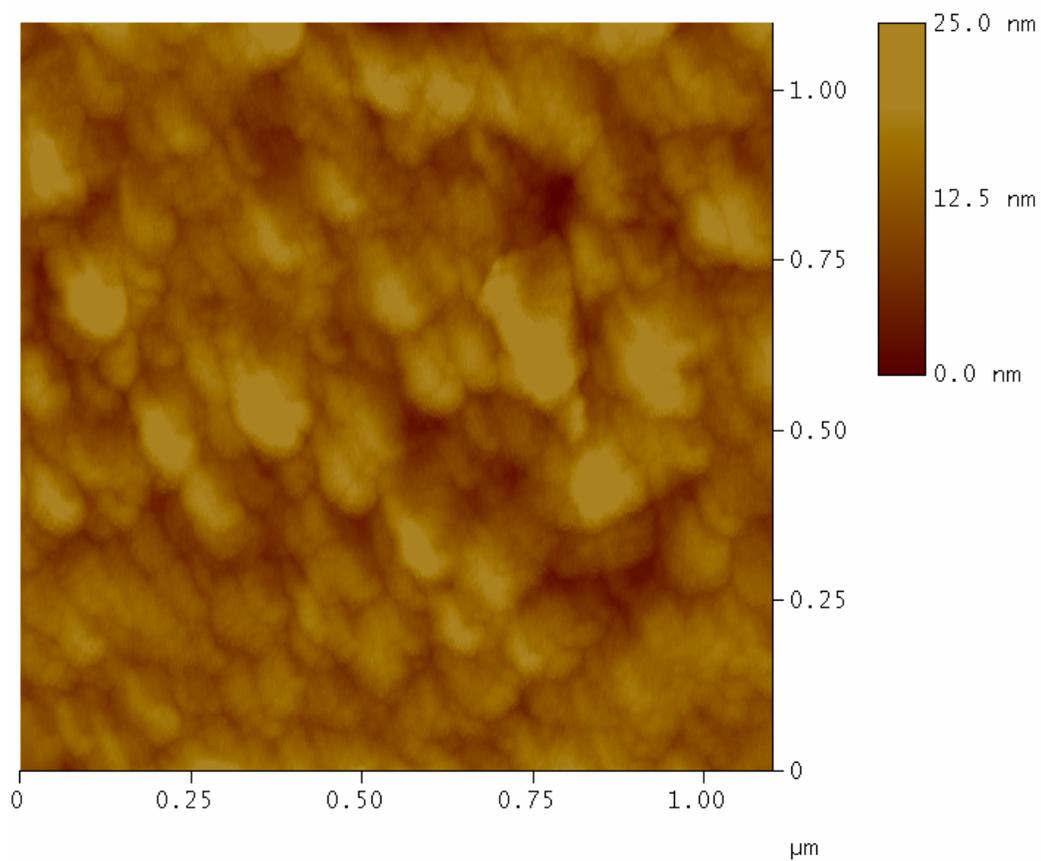


Fig. 45 Anclaje de trastuzumab (tiempo de adsorción= 30 min.) sobre las monocapas autoorganizadas de 4-MBA ([4-MBA]=10 mM, sol. etanólica, t=15 s) vía el intermediario de los reactivos de acoplamiento EDC/NHS

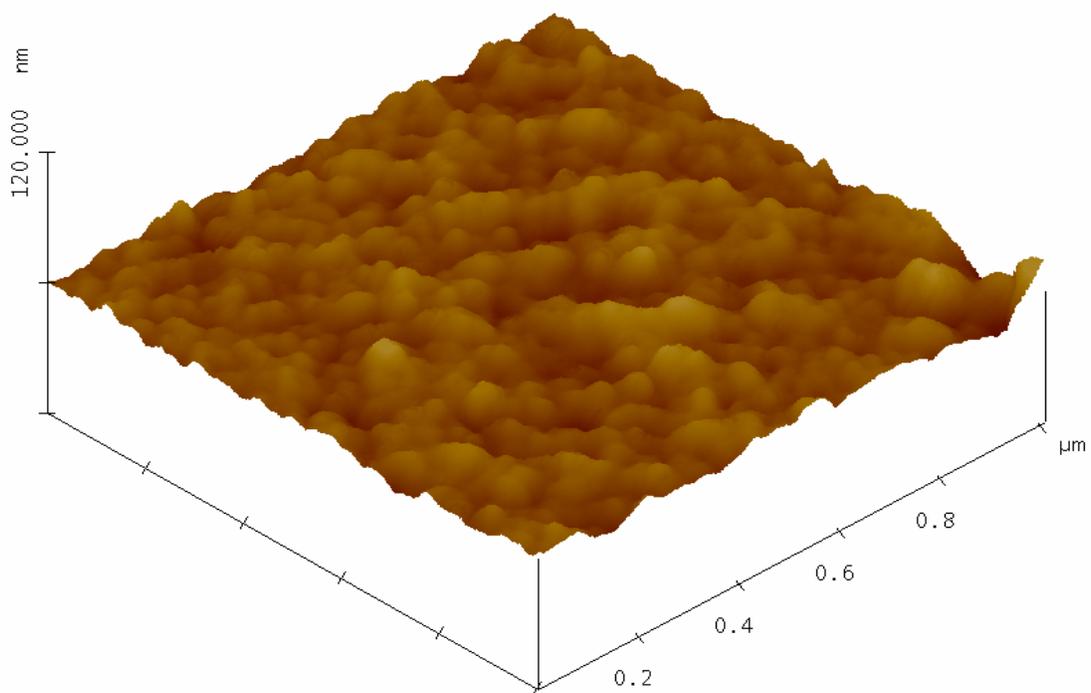
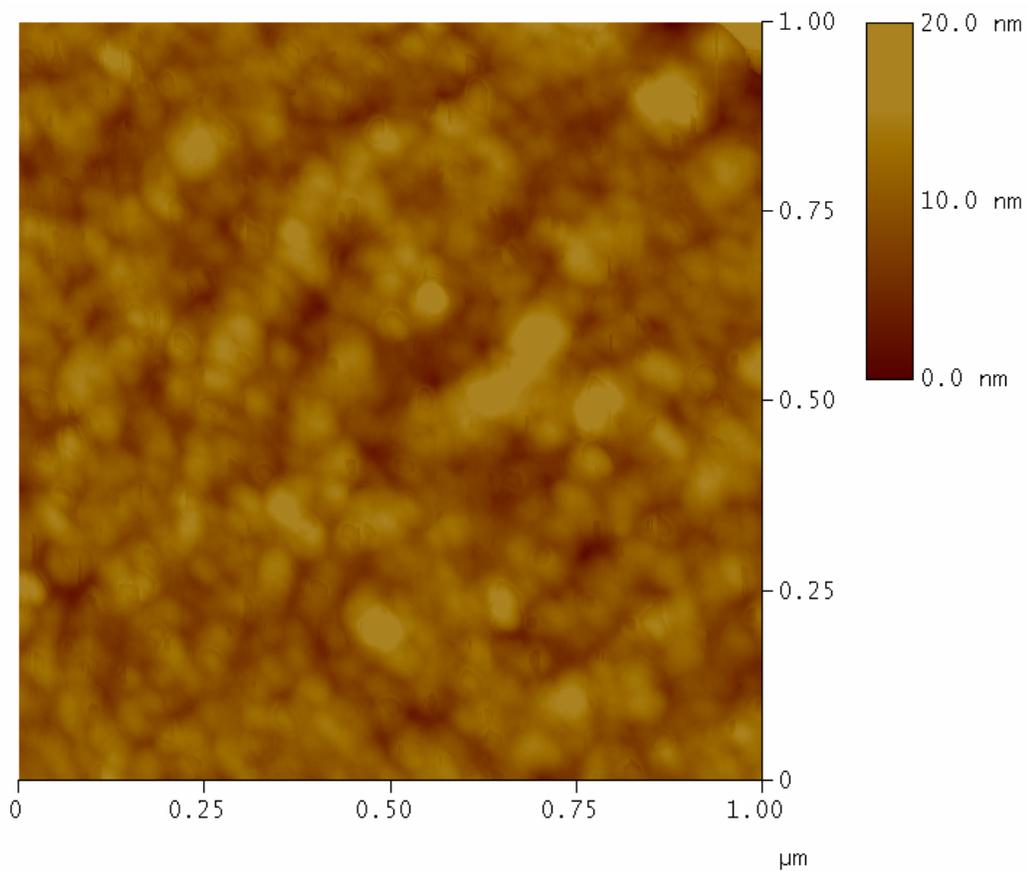
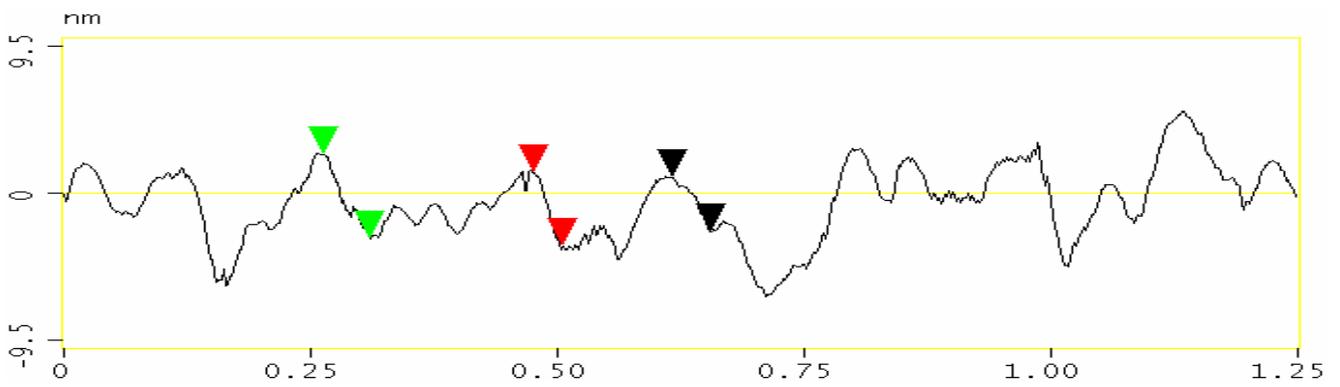
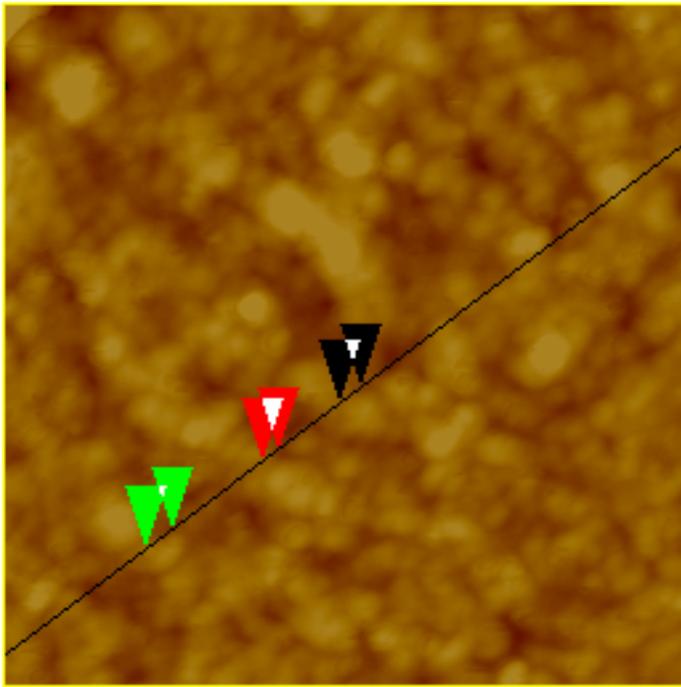


Fig. 46 Anclaje de trastuzumab (tiempo de adsorción= 20 min.) sobre las monocapas autoorganizadas de 4-MBA ([4-MBA]=10 mM, sol. etanólica, t=15 s) vía el intermediario de los reactivos de acoplamiento EDC/NHS.



Surface distance	29.914 nm
Horiz distance(L)	29.297 nm
Vert distance	4.754 nm
Angle	9.217 °
Surface distance	47.836 nm
Horiz distance	46.875 nm
Vert distance	5.448 nm
Angle	6.630 °
Surface distance	39.390 nm
Horiz distance	39.063 nm
Vert distance	3.502 nm
Angle	5.123 °
Spectral period	DC
Spectral freq	0 / μ m
Spectral RMS amp	0.812 nm

Fig. 47 Análisis de una sección transversal sobre la imagen de AFM inmediata anterior.

3.12 Discusión y conclusiones sobre el anclaje del trastuzumab al sustrato nanoestructurado

Los espectros Raman que corresponden a $t=10$ y 30 min de adsorción de trastuzumab (Fig. 41) concuerdan muy bien con los espectros Raman de las monocapas de 4-MBA (Fig. 37).

El espectro Raman que corresponde a $t=20$ min de adsorción de trastuzumab sobre las monocapas de 4-MBA es muy parecido al de trastuzumab en solución (Fig.42 y Fig. 43). Esto demuestra que el anticuerpo monoclonal trastuzumab al inmovilizarse preservó su conformación nativa similar como en solución.

Una vez que el anticuerpo monoclonal trastuzumab interaccione con los receptores HER2 sobreexpresados en células de carcinoma de mama vía deposición de células MCF-7 sobre la superficie ya funcionalizada se espera que la intensidad de señal Raman incremente como producto de la interacción anticuerpo-antígeno.

El rayo láser del espectrómetro Raman, al incidir sobre la muestra, la penetra y diverge al entrar en contacto con la superficie nanoestructurada. La dispersión Raman es el transductor de señal en este biosensor que se propone en el presente trabajo de investigación.

Se escogieron las muestras que corresponden a trastuzumab adsorbido durante 20 y 30 minutos sobre una superficie activada durante 10 minutos con EDC/NHS para su análisis como un posible biosensor.

3.13 Interacción de células de cáncer de mama (MCF-7) con el NS-4-MBA-trastuzumab

En experimentos *in vitro* con células o tejidos siempre es necesario el proceso de fijación celular, ya que este previene la putrefacción (destrucción por la acción bacteriana) y la autólisis (destrucción por enzimas lisosomales). Existe una amplia gama de fijadores celulares tales como: aldehídos (formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído), alcoholes (metanol, etanol), cetonas (acetona) y ácidos (ácido tánico y pícrico), entre otros, cada uno con ventajas sobre otros dependiendo de la aplicación deseada por lo que no existe un fijador celular universal.

Procedimiento experimental

Parte I

Herceptina[®] es el nombre comercial del anticuerpo monoclonal propiedad de Roche[®] y trastuzumab es el nombre genérico de este, el cual se usó en el presente trabajo de tesis. Se disolvió 15 mg Herceptina[®] (trastuzumab) en 1 ml de agua ultrapura Mili-Q, posteriormente se dializó con una membrana de diálisis de corte molecular de 10 kDa contra 1 L de 10 mM de buffer de fosfatos, pH=8.3 durante la noche. Posteriormente se tomó la absorbancia a 280 nm con un espectrómetro UV-Visible obteniéndose una concentración de 10.3 mgml⁻¹. Esta solución purificada se utilizó durante todos los experimentos.

Parte II

1. Se cultivaron células MCF-7 en una caja petri hasta tener una confluencia del 90-100%.

Nota: Este tipo de caja petri tiene capacidad para $6 \cdot 10^6$ células, por tanto tenemos una concentración celular de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células/ml.

2. Se retiró el medio de cultivo, se vertieron 2 ml de tripsina y se incubaron durante 5 minutos.

3. Se inactivó la tripsina con 4 ml de medio completo (DMEM + 5% BSF)

Nota: DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, BSF: Suero bovino fetal.

4. Se retiró la suspensión celular de la caja petri y se depositó en un tubo de centrifugación.

5. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 1000 rev/min.

6. El sobrenadante de la muestra se desechó y el pellet de células se resuspendió con 6 ml de medio completo.

7. Se tomó una alícuota de 200 μl de esta suspensión y se le adicionaron 300 μl de medio completo obteniéndose una concentración celular de aproximadamente $0.2 \cdot 10^6$ células/ml.
 8. En un sustrato previamente funcionalizado con trastuzumab ($t=20$ y 30 minutos adsorción de trastuzumab) se depositaron ~ 4000 células y se incubaron durante 4 horas a 37°C .
- Nota:** El control (prebloqueo de sitios HER2 presentes en células MCF-7) fue incubar ~ 8000 células con una alícuota de 30 μl de una solución de trastuzumab de concentración 0.1 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 horas a 37°C . Las células MCF-7 presentan ca. $0.23 \cdot 10^6$ sitios de unión a HER2 por célula [53] y también se sabe que la interacción HER2-antiHER2 es 1:1.
9. En otro sustrato previamente funcionalizado con trastuzumab se depositaron ~ 4000 células control.
 10. Después de 4 horas, las muestras se enjuagaron con una solución de buffer de fosfato.
 11. Posteriormente, las células se fijaron con un tren de alcohol durante 3 minutos en cada paso. Este procedimiento se realizó en un Multiplacas Nunclon Δ de 4 pozos.
- Nota:** El tren de alcohol consiste en preparar soluciones al 30, 50, 70, 80, 90, 96 y 100 % (v/v) de alcohol absoluto anhidrido y agua. Posteriormente las células se sumergen en esta solución durante 3 minutos en cada solución.

3.14 Caracterización por espectroscopia Raman del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7

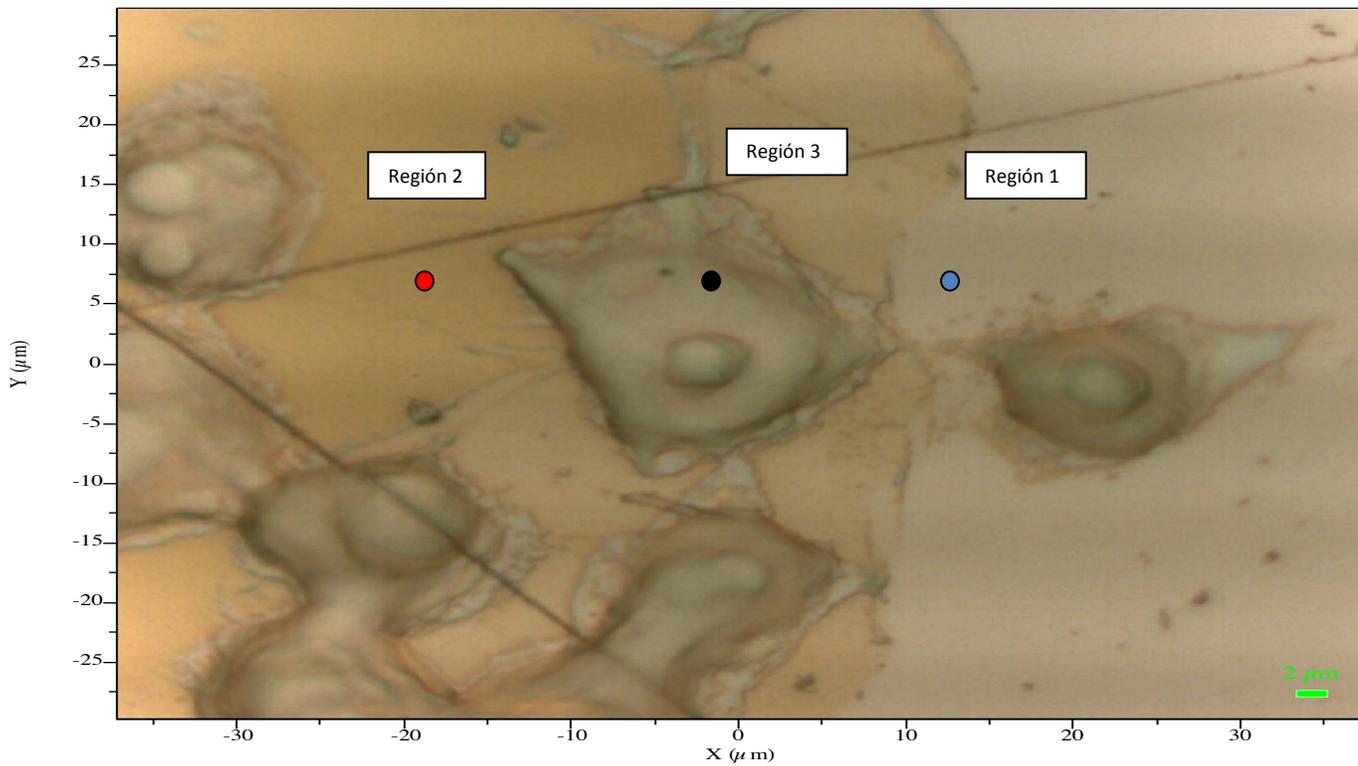


Fig. 48 La presente imagen corresponde a la muestra control y se obtuvo con el microscopio confocal acoplado al microespectrómetro Raman Horiba Jobin Yvon LabRam HR 800. Los puntos de color representan los lugares donde fueron tomados los espectros Raman sobre la muestra control (HER2 prebloqueados).

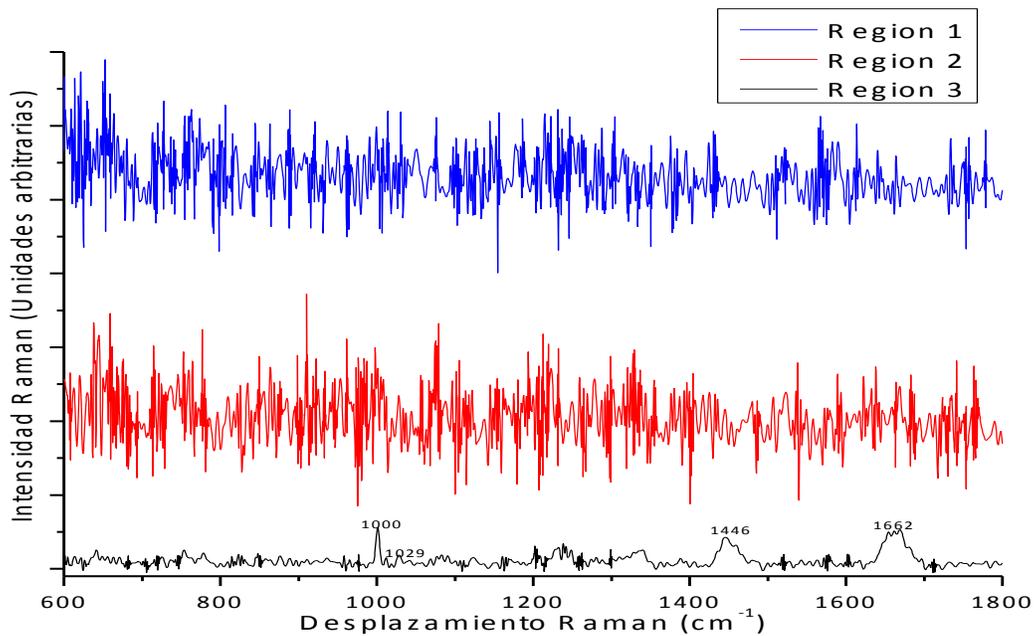


Fig. 49 Espectros Raman sobre la superficie de una célula MCF-7 control (HER2 prebloqueado) y sobre la superficie del biosensor.

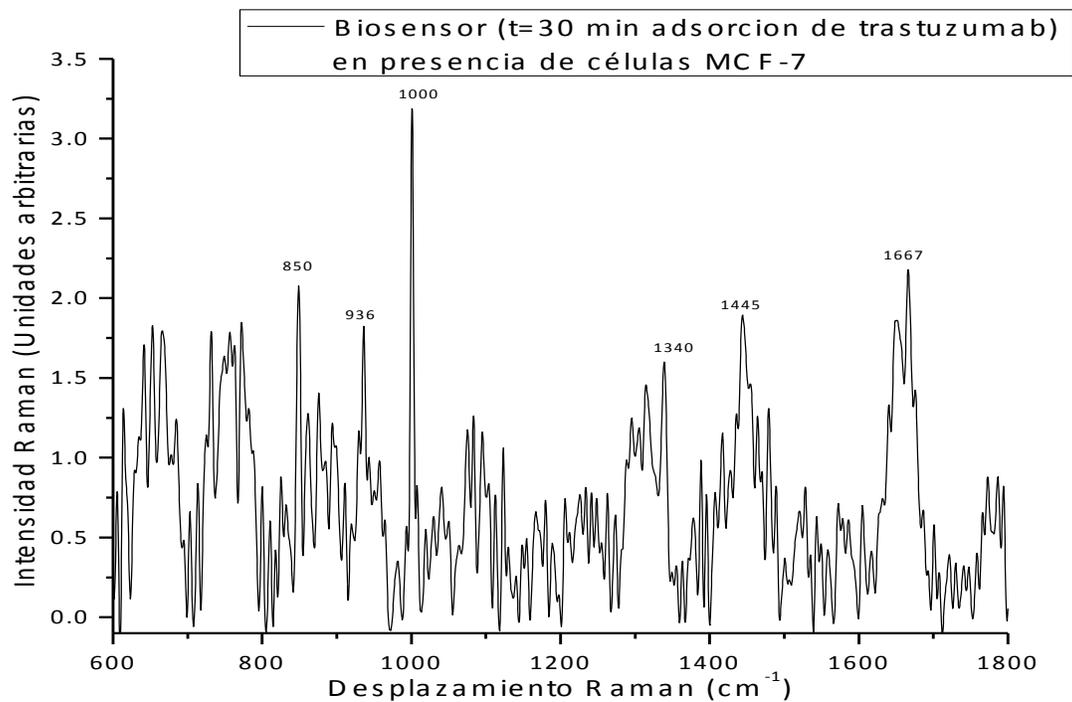


Fig. 50 Espectro Raman del Biosensor (t=30 min adsorción de trastuzumab).

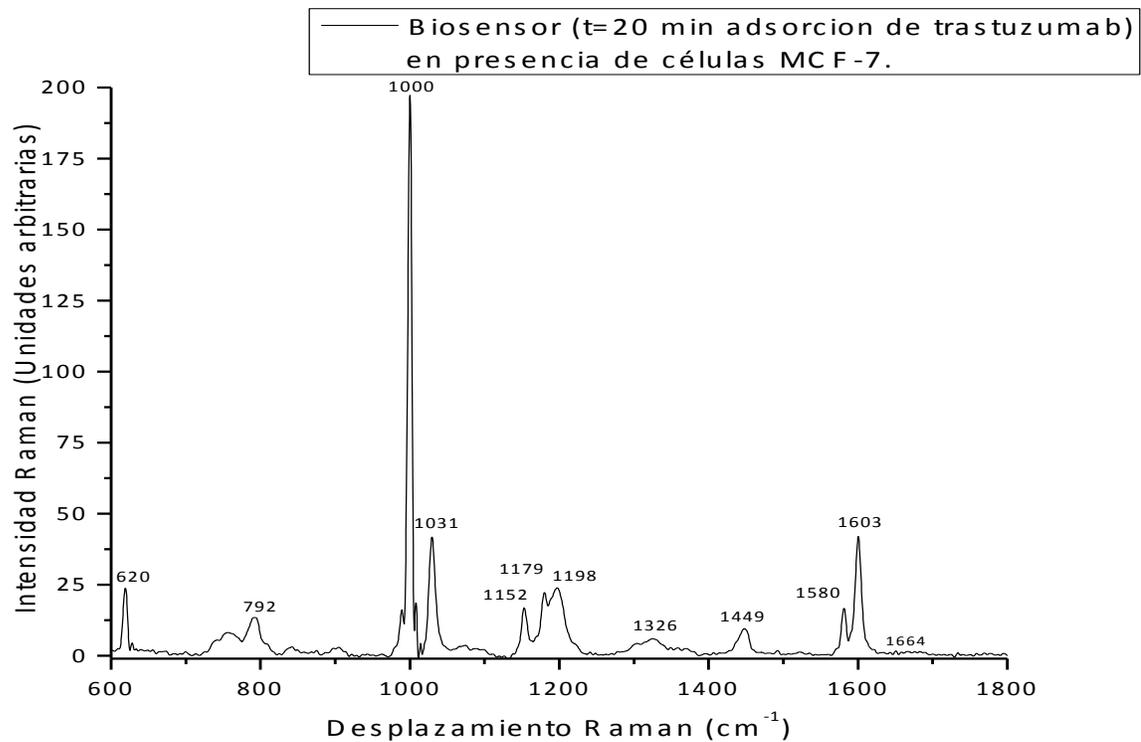


Fig. 51 Espectro Raman del Biosensor (t=20 min adsorción de trastuzumab)

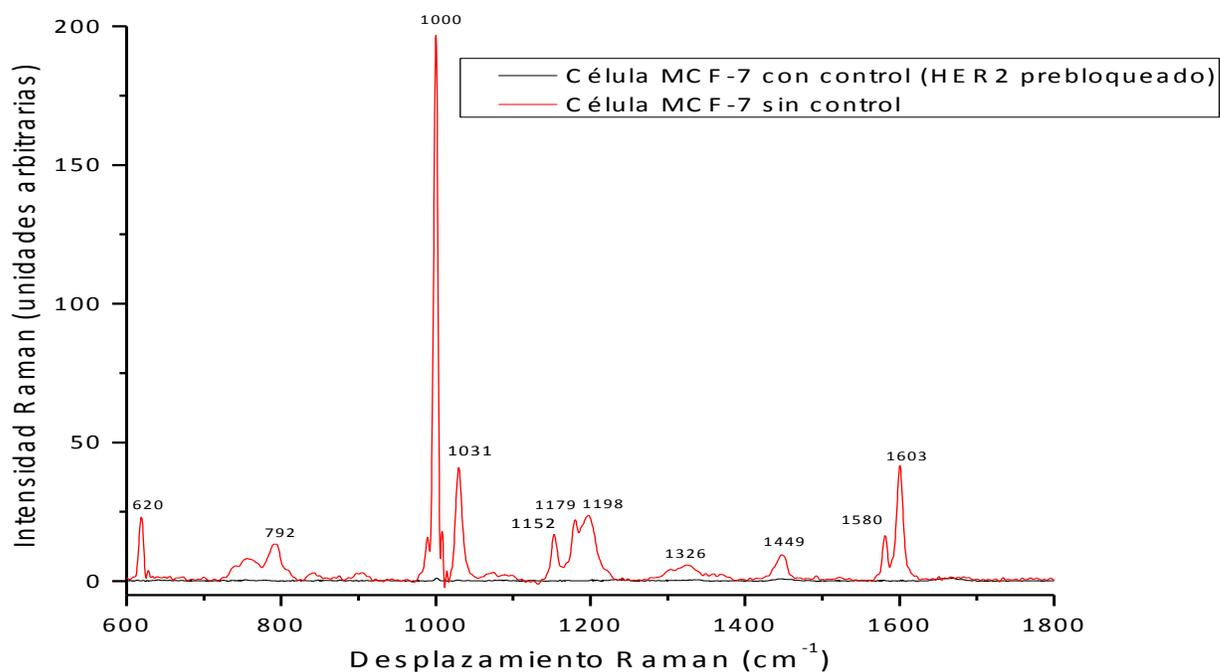


Fig. 52 Espectro Raman de la interacción anticuerpo-antígeno sobre el biosensor propuesto (t=20 min adsorción de trastuzumab).

Tabla 6. Asignación de bandas del espectro Raman de la interacción trastuzumab-receptores superficiales HER2 en células MCF-7 (Fig. 49 y Fig. 52).

Número de onda de la intensidad Raman / cm^{-1}	Asignaciones de bandas Raman
1669/1650	Amida I
1603	Tirosina, Fenilalanina
1580	Triptofano
1449	$\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ de lípidos
1340	$\delta(\text{CH})$
1326	$\delta(\text{CH})$, $\omega(\text{CH}_2)$, $\omega(\text{CH}_3)$, Amida III
1198	$\rho(\text{CH}_3)$ de treonina
1179	$\rho(\text{CH}_3)$ de treonina
1152	$\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-C})$ de lípidos y proteínas
1031	$\delta(\text{CH})$ sobre el plano del anillo de fenilalanina
1000	Respiración simétrica del anillo de fenilalanina
902	ν (esqueleto C-C)
841	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_4^{2-})$, Tirosina
792	DNA/RNA(esqueleto de U, T, C / PO_4^{2-})
755	Timina (T)
620	$\tau(\text{C-C})$ de fenilalanina

δ : bending, ω : wagging, ρ : rocking, ν : stretching, τ : twisting, s: simétrico, as: asimétrico.

La asignación de bandas Raman se basa en [50-52].

3.15 Caracterización por microscopia óptica del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7

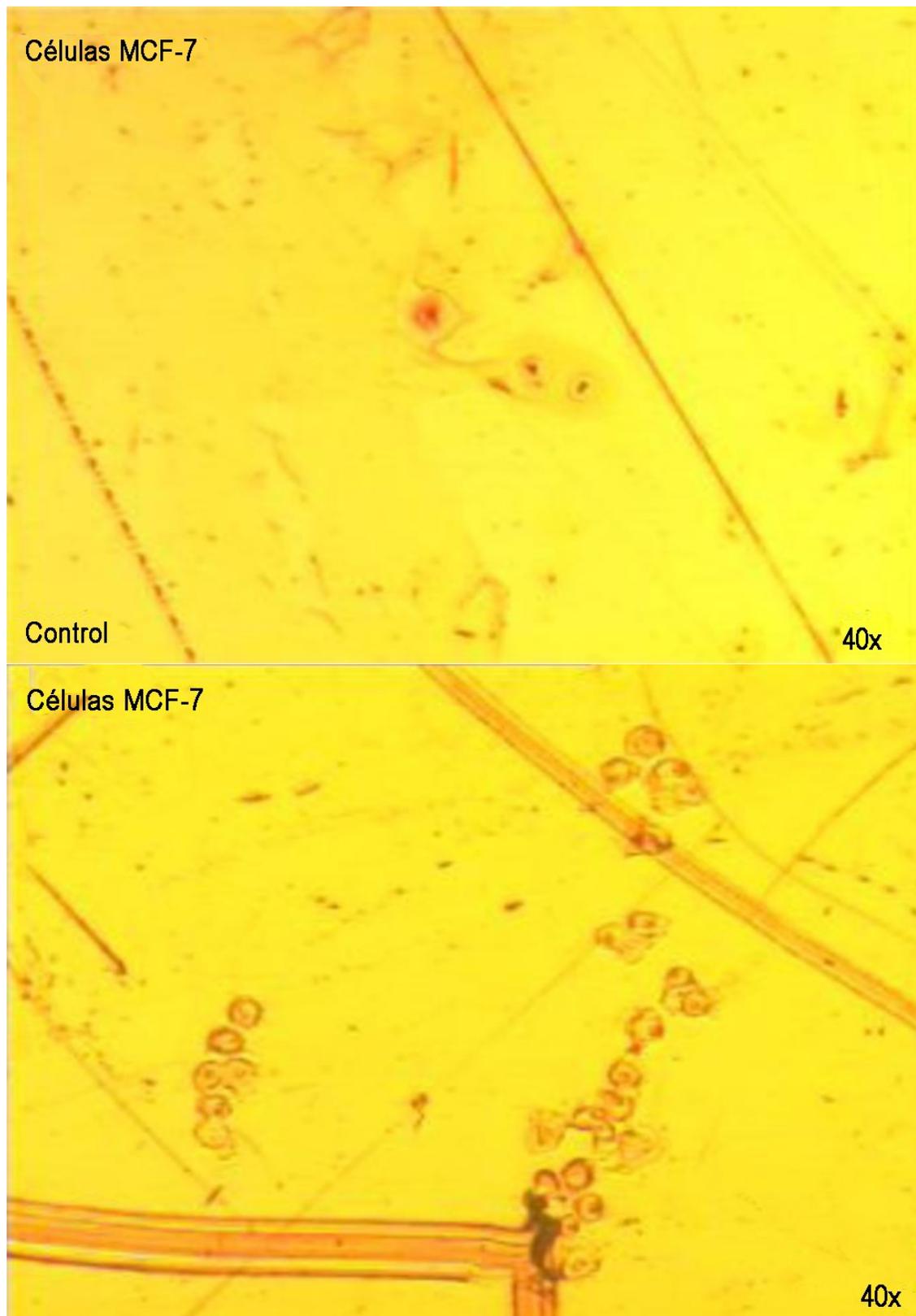


Fig. 53 Imagen de microscopia óptica del biosensor propuesto ($t=20$ min adsorción de trastuzumab) en presencia de células MCF-7 Control (HER2 prebloqueado) y células MCF-7 sin control. El tiempo de adhesión de las células al biosensor fue 4 h y posteriormente se fijaron por medio de un tren de alcohol. La imagen tiene dimensiones $510 \mu\text{m} \times 370 \mu\text{m}$.

3.16 Caracterización por microscopia de fuerza atómica (AFM) del NS-4-MBA-trastuzumab-células MCF-7

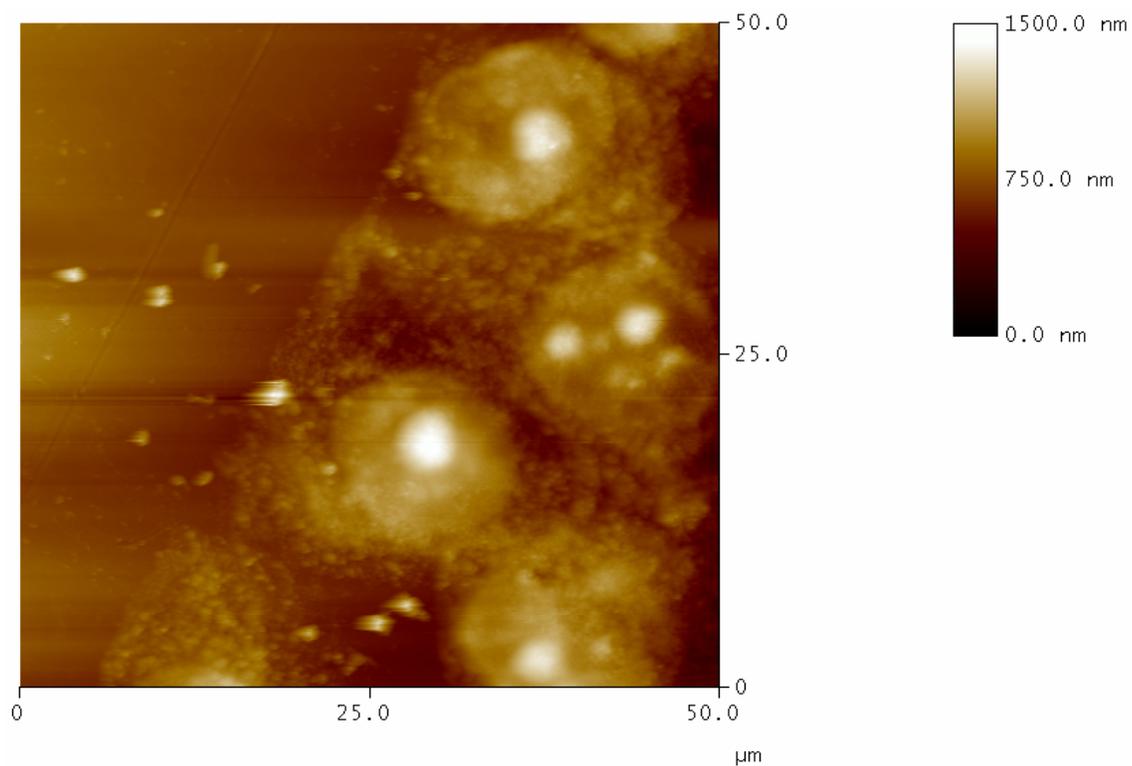


Fig. 54 Cúmulo de células MCF-7 sobre el biosensor propuesto (t=20 min de adsorción de trastuzumab).

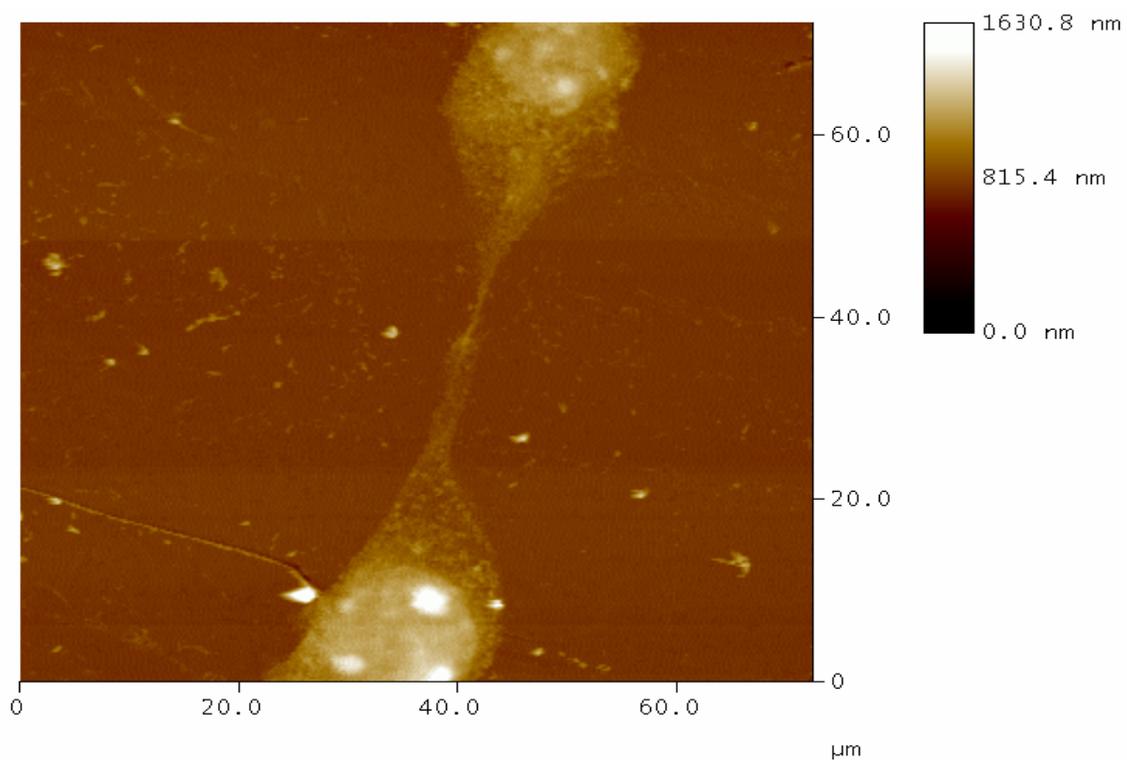


Fig. 55 Células MCF-7 sobre el biosensor propuesto (t=20 min de adsorción de trastuzumab).

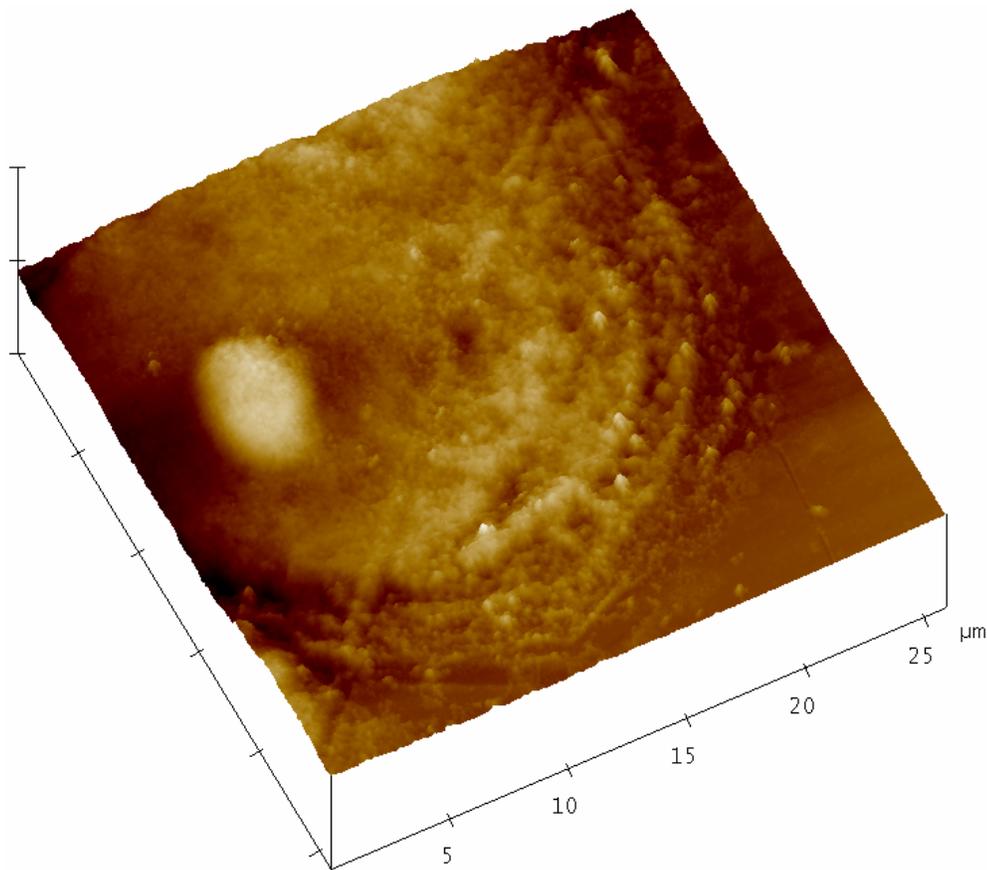
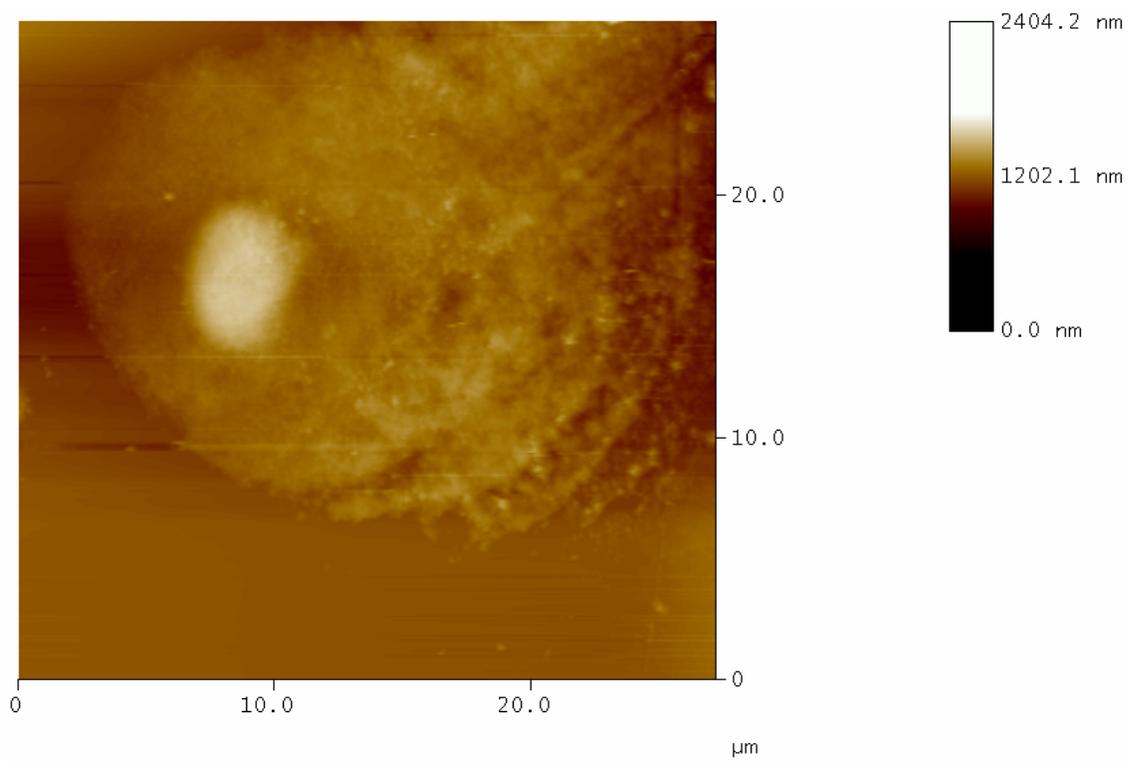


Fig. 56 Célula MCF-7 sobre el biosensor propuesto (t=20 min de adsorción de trastuzumab).

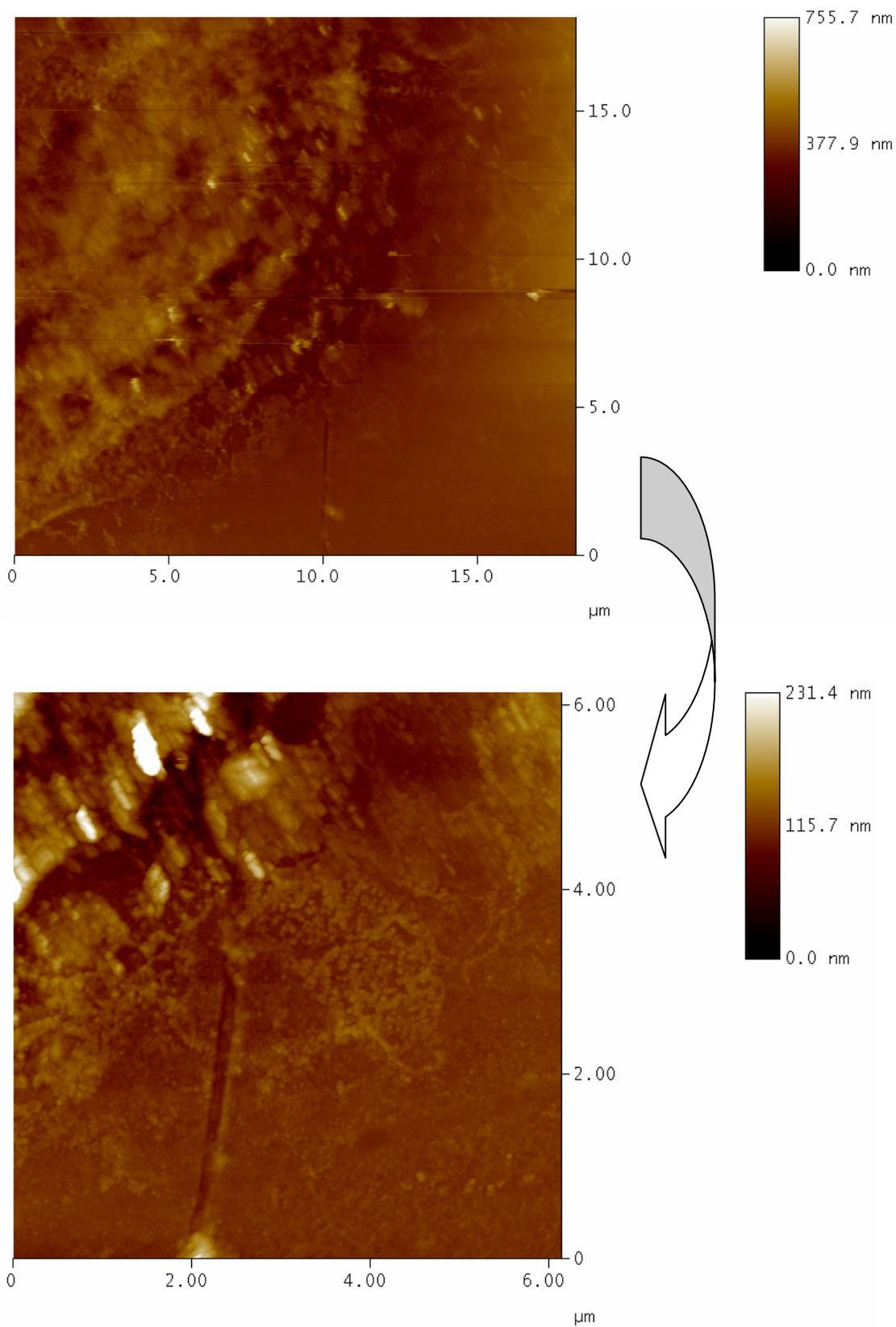


Fig. 57 Una porción de la membrana plasmática de una célula MCF-7 sobre el biosensor propuesto (t=20 min de adsorción de trastuzumab).

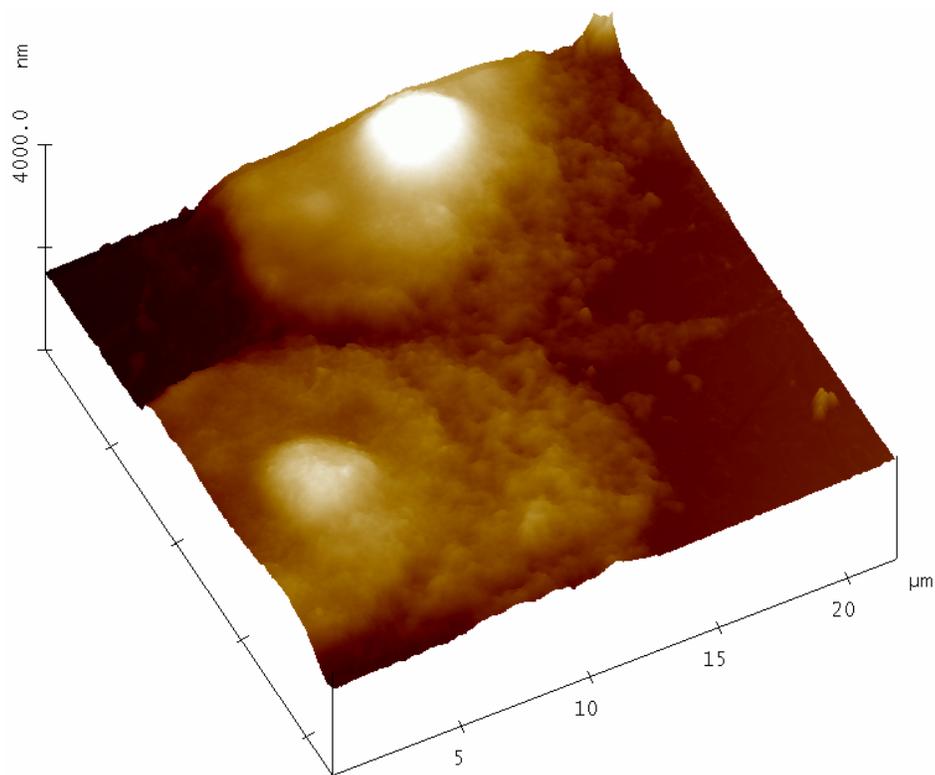
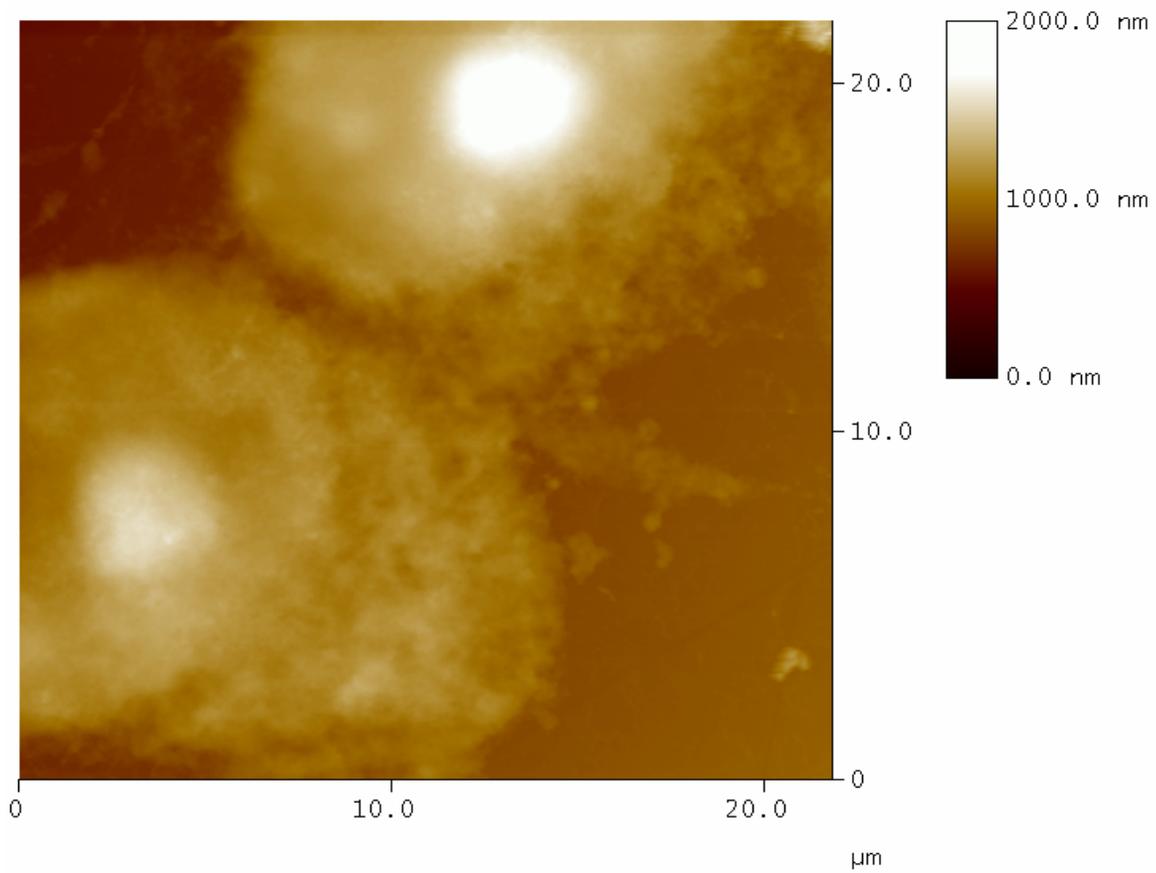
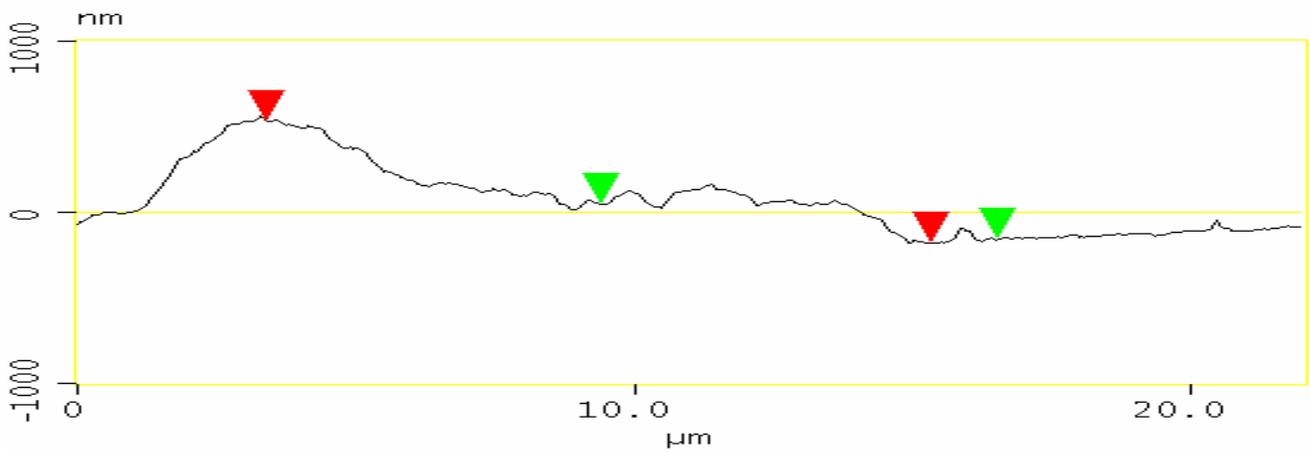
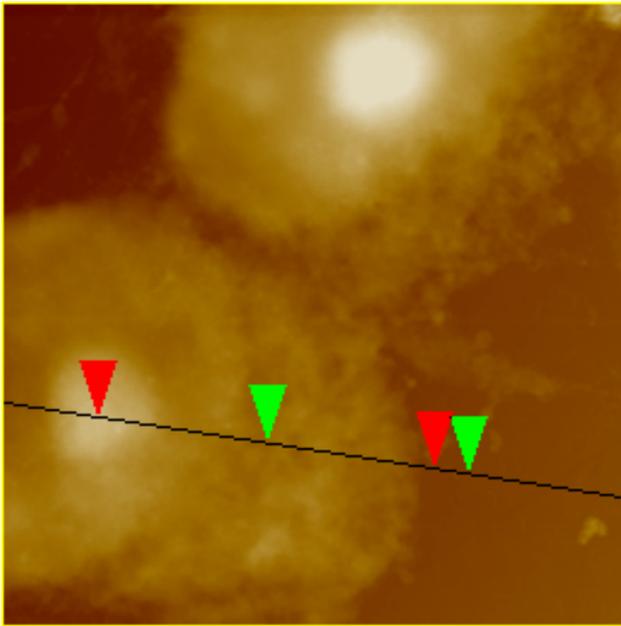


Fig. 58 Células MCF-7 sobre el biosensor propuesto (t=20 min de adsorción de trastuzumab).



Surface distance	12.136 μm
Horiz distance(L)	11.936 μm
Vert distance	709.01 nm
Angle	3.399 $^\circ$
Surface distance	7.259 μm
Horiz distance	7.119 μm
Vert distance	206.76 nm
Angle	1.664 $^\circ$
Surface distance	
Horiz distance	
Vert distance	
Angle	
Spectral period	DC
Spectral freq	0 / μm
Spectral RMS amp	107.12 nm

Fig. 59 Análisis de una sección transversal sobre una célula MCF-7 sobre el biosensor propuesto.

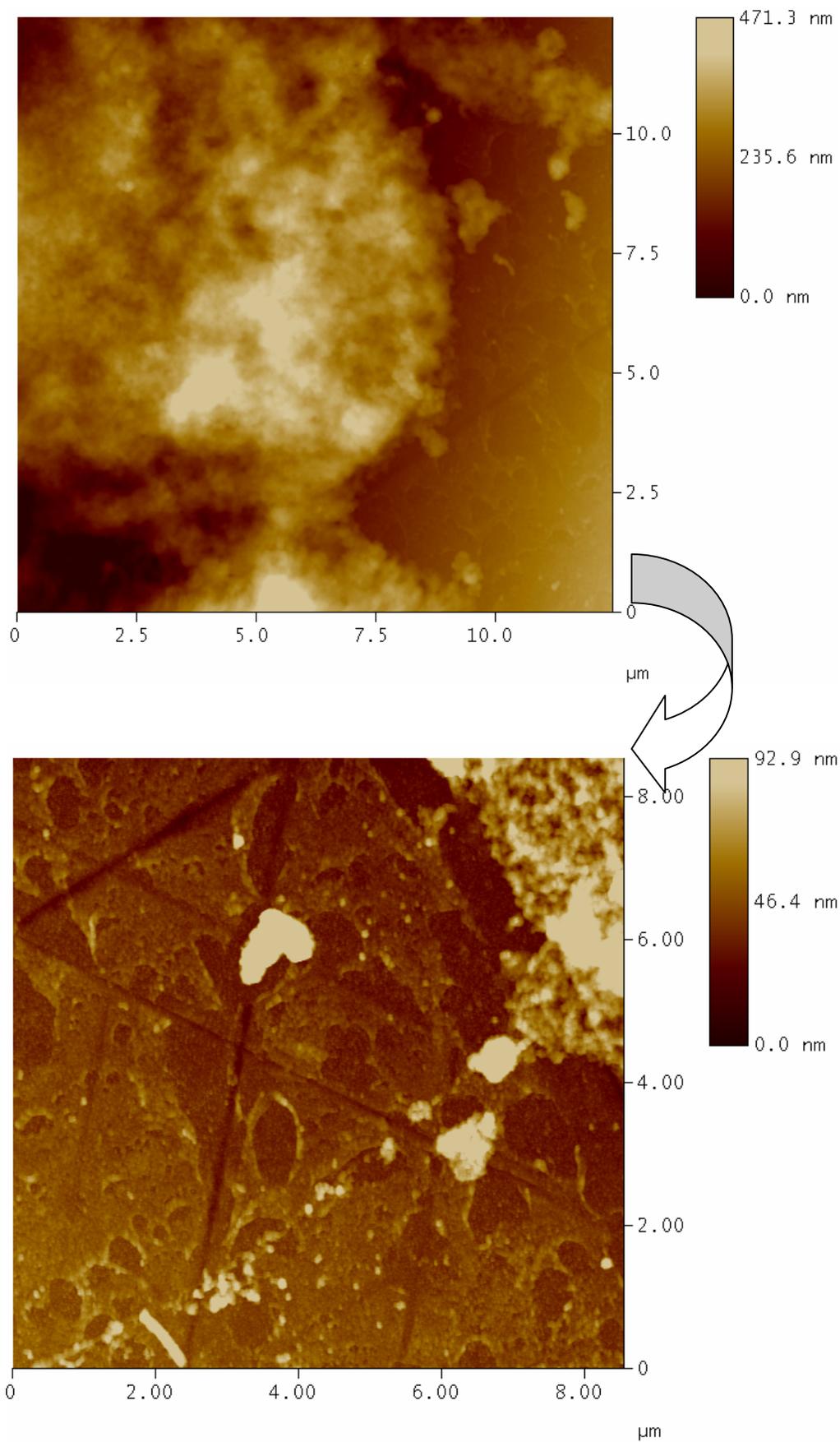


Fig. 60 Una porción de la membrana plasmática de una célula MCF-7 y parte de la superficie del biosensor propuesto.

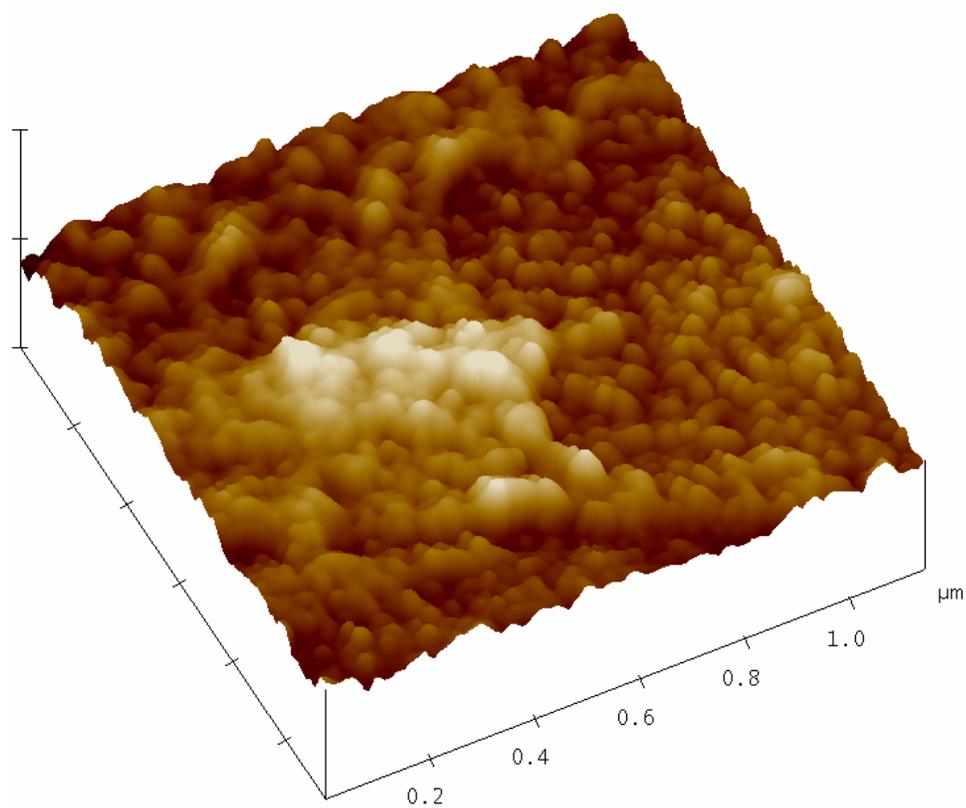
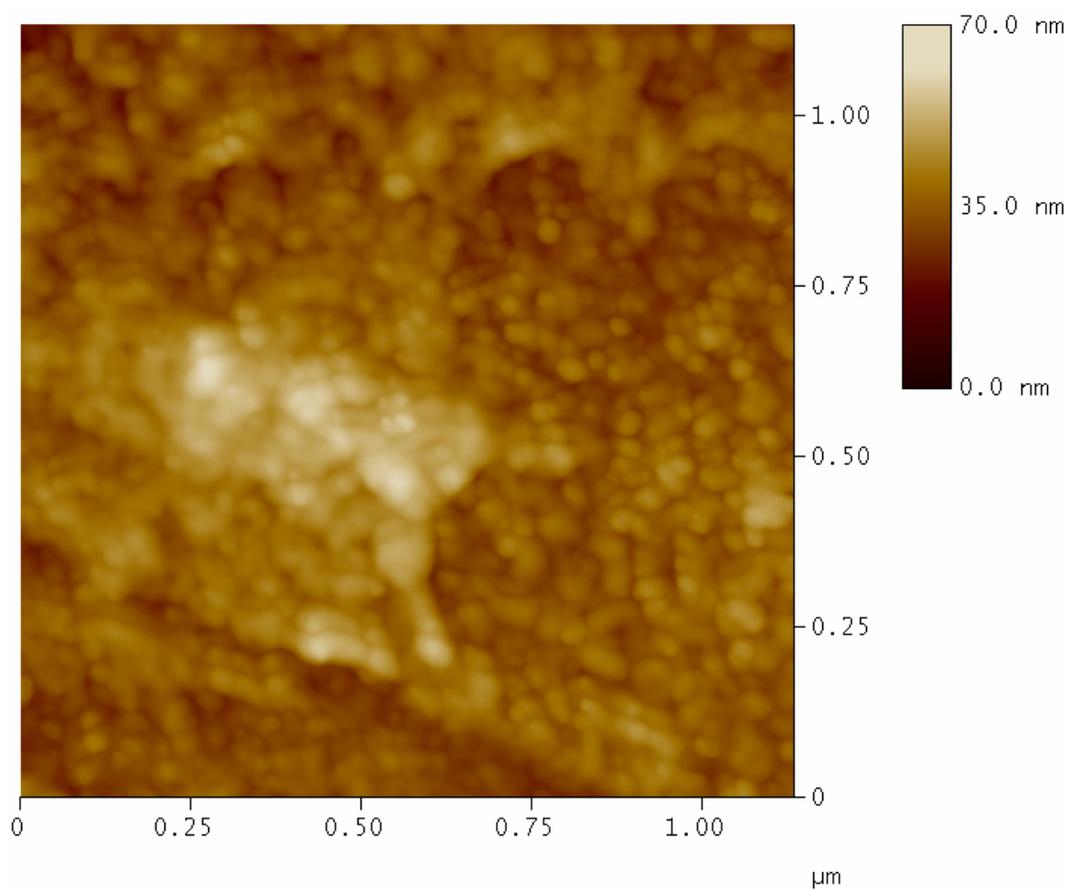
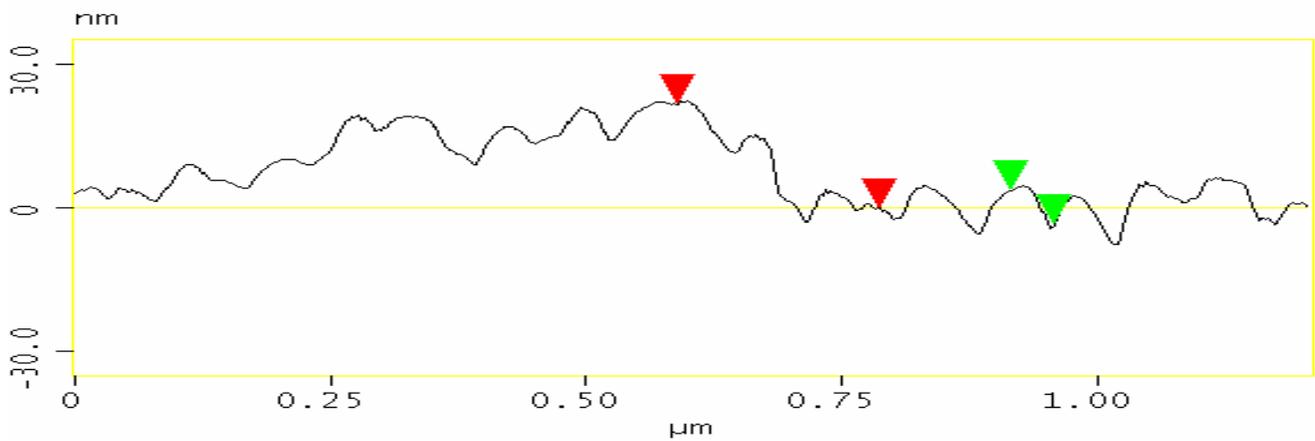
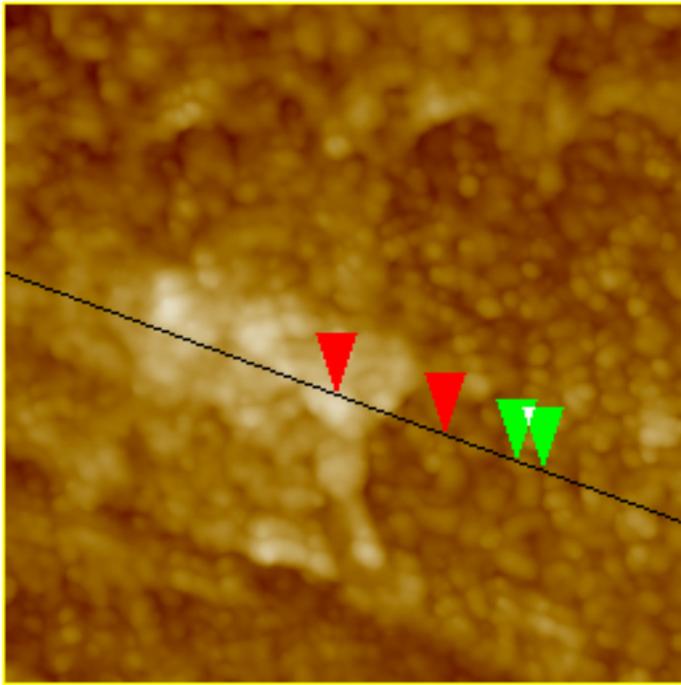


Fig. 61 Superficie funcionalizada del biosensor propuesto al final del proceso de fijación celular.
(Esta imagen es una ampliación sucesiva de la figura inmediata anterior).



Surface distance	209.08 nm
Horiz distance(L)	197.39 nm
Vert distance	21.834 nm
Angle	6.312 °
Surface distance	44.353 nm
Horiz distance	42.140 nm
Vert distance	6.970 nm
Angle	9.392 °
Surface distance	
Horiz distance	
Vert distance	
Angle	
Spectral period	DC
Spectral freq	0 /μm
Spectral RMS amp	10.992 nm

Fig. 62 Análisis de una sección transversal sobre la superficie funcionalizada del biosensor.

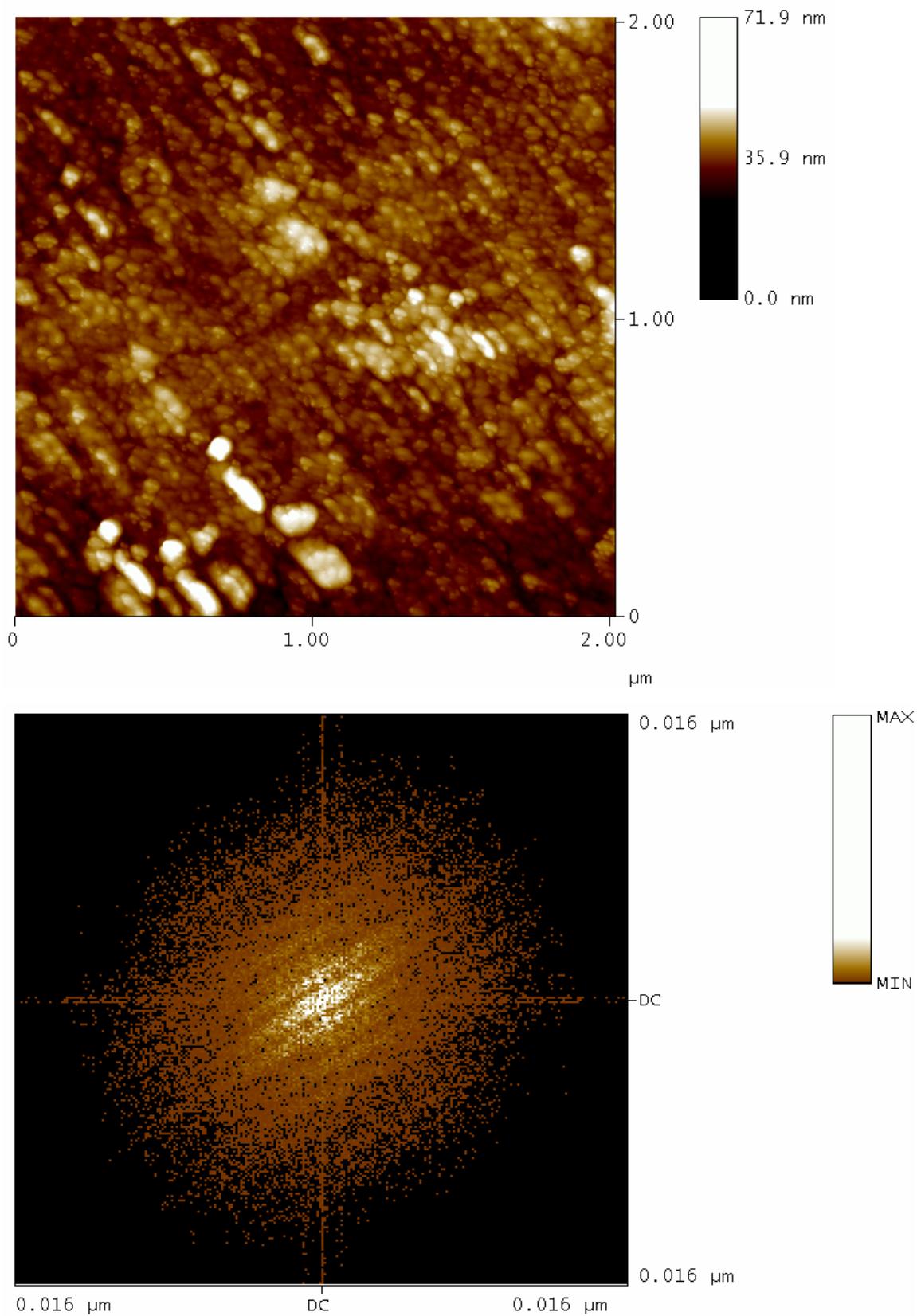


Fig. 63 Aplicación de la transformada rápida de Fourier (FFT) a la imagen de AFM de la superficie funcionalizada para el análisis de su posible patrón (o direccionalidad) vía el comando *2D Spectrum* del software NanoScope 5.30r3sr3.

3.17 Discusión y conclusiones sobre la interacción de células MCF-7 con la superficie del biosensor (Principios de funcionamiento de biosensor para detección de cáncer de mama)

La reacción antígeno-anticuerpo alcanza el equilibrio termodinámico a las 4 horas a fuerza iónica fisiológica (0.16 M) y a temperatura de 37 °C [54]. Al comparar la fijación celular mediante 4% w/v de paraformaldehído *versus* deshidratación por medio de un tren de alcohol, se encontró que este último es la mejor opción debido a que el primero produce una especie de “sabana” que cubre a las células fijadas. Este es un inconveniente, ya que al caracterizar las células fijadas por espectroscopia Raman producirá efectos que no son parte de la célula.

El biosensor (t=30 min adsorción de trastuzumab) muestra varias células adheridas pero no fue capaz de reconocer a los receptores superficiales HER2 sobreexpresados en células MCF7 muy probablemente debido a una excesiva inmovilización y/o orientación no adecuada del anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre la superficie del biosensor. Esto último se deduce debido a que el cociente señal/ruido es muy pequeño (Fig. 50 vs. Fig. 51).

La muestra control (HER2 prebloqueado) se realizó para conocer si las células se adherían exclusivamente a la superficie funcionalizada con trastuzumab a través de la interacción trastuzumab-HER2 sobreexpresado en la membrana plasmática de las células MCF-7.

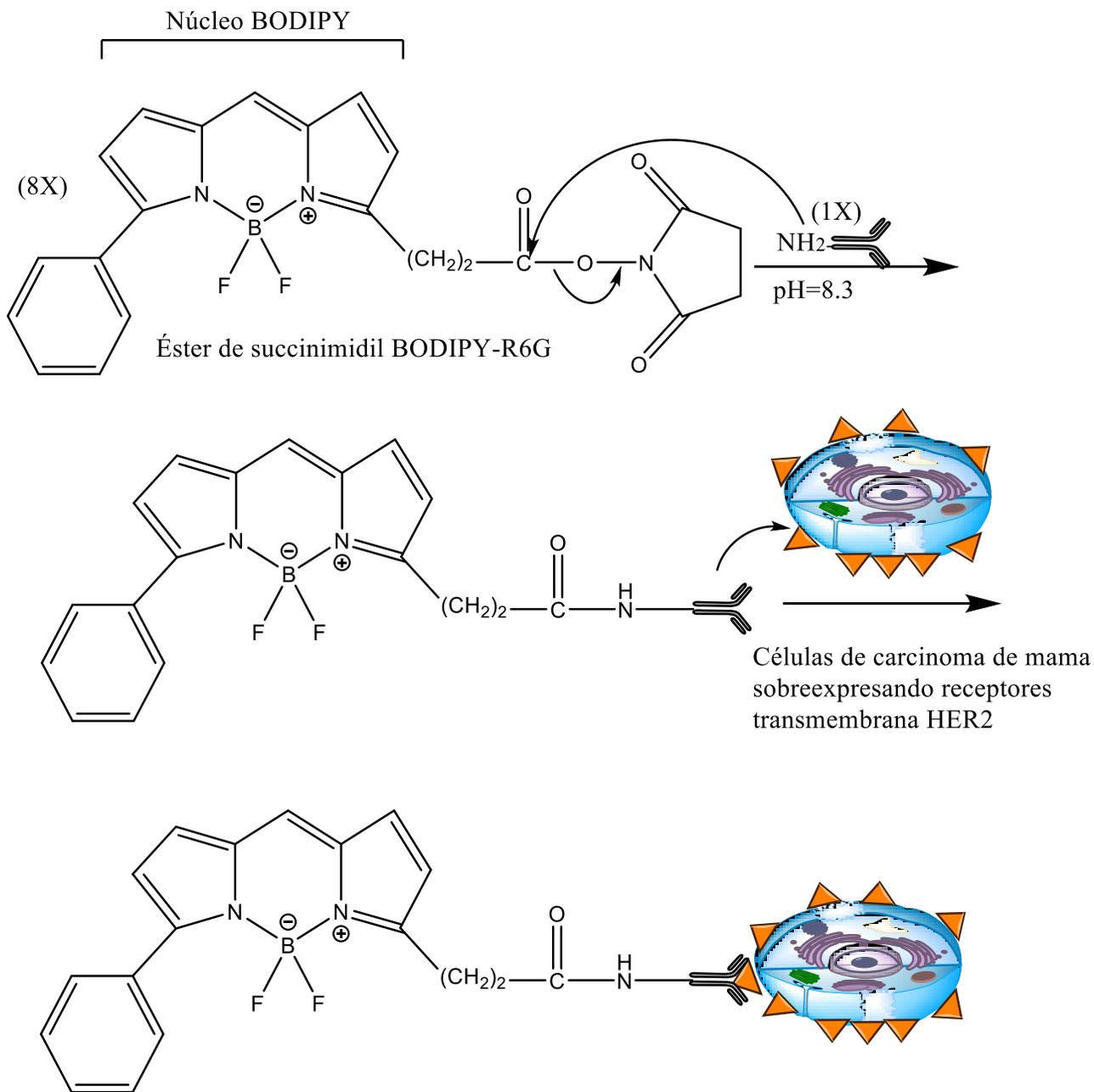
Las bandas Raman en 1000, 1029, 1446, y 1662 cm^{-1} de la Fig. 49 (Región 3) concuerdan muy bien con las bandas Raman en 1000, 1031, 1449, y 1664 cm^{-1} de la Fig. 51 (biosensor popuesto). Esto nos hace pensar que los pocos receptores HER2 que no lograron prebloquearse interaccionaron con la superficie funcionalizada además de la afinidad de las moléculas de adhesión focal de las células MCF-7 por la superficie funcionalizada. Ambos factores logran la adhesión celular al sustrato funcionalizado.

De acuerdo a los espectros Raman anteriores, sólo el biosensor (t=20 min adsorción de trastuzumab) fue capaz de reconocer la interacción anticuerpo-antígeno vía SERS. Las bandas Raman en 620, 1000, y 1603 cm^{-1} son tentativamente asignadas a fenilalanina lo cual nos hace pensar que están asociadas con la detección de las células de cáncer de mama.

Capítulo IV

4.1 Interacción de células MCF-7 y T47D con el sustrato nanoestructurado no funcionalizado (MCF-7 y T47D en presencia del bioconjugado BODIPY R6G-trastuzumab)

Esquema simplificado del proceso de bioconjugación propuesto



Las reacciones anticuerpo-antígeno tienden a ser reversibles bajo condiciones normales. Esto se debe principalmente al establecimiento de diferentes enlaces químicos e interacciones entre los epítomos (fragmentos de unión al antígeno) del anticuerpo y las regiones blanco del antígeno. Las constantes de afinidad para anticuerpos usualmente están en el intervalo de 10^6 - 10^9 M. Los puentes de hidrógeno son las principales interacciones que estabilizan la asociación antígeno-anticuerpo además de otras interacciones débiles tales como las fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas [54].

Los anticuerpos conjugados son reactivos extremadamente útiles para sondear muchas moléculas química y biológicamente importantes tanto *in vivo* como *in vitro* [55]. Aunque los anticuerpos conjugados con un gran número de moléculas de colorante unidas son aceptables para su uso, el sobreetiquetado puede causar la agregación del anticuerpo conjugado, reducir la especificidad del anticuerpo por su antígeno y el apagamiento de la fluorescencia de las moléculas de colorante. Esto último es una limitante si el método de detección fuese por espectroscopia de fluorescencia o microscopía confocal. Existen una amplia gama de colorantes fluorescentes tales como: derivados de Alexa Fluor, derivados de BODIPY, etc.

El nombre IUPAC de BODIPY es 4,4-difluor-4-boro-3a, 4a-diazo-s-indaceno. Los fluoróforos basados en el núcleo BODIPY presentan gran fotoestabilidad, alto rendimiento cuántico de fluorescencia, altos coeficientes de extinción molar, picos de excitación y emisión intensos, desplazamientos de Stokes pequeños (5-20 nm, en la mayoría de los casos), casi insensibles a la polaridad del solvente y a las variaciones en el pH [56]. Este fluoróforo es un sustituto de la Rodamina 6G (R6G), por lo tanto tiene las mismas propiedades además de que permite ser bioconjugado con otras moléculas.

Desplazamiento de Stokes= $h\nu_{\text{Excitación}} - h\nu_{\text{Emisión}}$

Éster de succinimidil de BODIPY R6G (Absorción: $\lambda_{\text{máx}}=528$ nm; Emisión: $\lambda_{\text{máx}}= 547$ nm)

Este parámetro es fundamental para determinar la sensibilidad de las técnicas basadas en fluorescencia. Por lo que a menor desplazamiento de Stokes, menor fluorescencia y por ende mayor probabilidad de dispersión Raman. La dispersión Raman y la emisión de fluorescencia

son fenómenos competitivos, los cuales tienen orígenes similares. La dispersión Raman es instantánea, está en el orden de 10^{-15} - 10^{-12} s y la fluorescencia en el orden de 10^{-9} s.

El grado de etiquetado (DOL) es el número promedio de moléculas de colorante acopladas a una molécula de proteína. Su cálculo da una buena indicación de que tan bien se llevó a cabo la reacción de etiquetado.

Condiciones de la bioconjugación del éster de succinimidil de BODIPY R6G con trastuzumab:

Procedimiento experimental

Se disolvió 15 mg Herceptina[®] (trastuzumab) en 1 ml de agua ultrapura Mili-Q, posteriormente se dializó con una membrana de diálisis de corte molecular de 10 kDa contra 1 L de 10 mM de buffer de fosfatos, pH=8.3 durante la noche. Posteriormente se tomó la absorbancia a 280 nm con un espectrómetro UV-Visible obteniéndose una concentración de 10.3 mgml^{-1} .

Aproximadamente 1 mg de colorante éster de succinimidil de BODIPY R6G se disolvió en 100 μL de DMSO. Posteriormente se realizaron dos diluciones sucesivas en presencia del mismo solvente hasta obtener una concentración final de 12.8 mgml^{-1} . Se mezcló una alícuota que correspondía a 7.2 mg de trastuzumab con 14 μL del colorante éster de succinimidil de BODIPY R6G (relación molar 1:8) en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubó a 4 °C durante 1 h agitándose continuamente y se paró la reacción agregando 100 μL de clorhidrato de etanolamina (1.0 M, pH=8.5) a la solución y se incubó otra vez a las condiciones ya mencionadas. Nuevamente se dializó con una membrana de diálisis de corte molecular de 10 kDa contra 1 L de 55 mM de buffer de fosfatos, pH=8.3 durante la noche. Una vez realizado el procedimiento anterior se tomó su absorbancia a 280 nm.

Procedimiento experimental

$$A_{280 \text{ nm BODIPY-R6G}} = 7.49 \cdot 10^{-2}$$

$$A_{528 \text{ nm BODIPY-R6G}} = 0.355$$

$$\text{Factor de corrección (CF)} = A_{280 \text{ nm BODIPY R6G}} / A_{528 \text{ nm BODIPY R6G}} = 0.211$$

$$A_{280 \text{ nm BODIPY R6G-Trastuzumab}} = 0.380 \text{ (Este dato se convierte en } A_{\text{max}})$$

$$A_{528 \text{ nm BODIPY R6G-Trastuzumab}} = 1.65 \cdot 10^{-2}$$

$$[\text{Proteína conjugada}] = A_{280 \text{ nm BODIPY R6G-Trastuzumab}} \cdot A_{528 \text{ nm BODIPY R6G}} \cdot (\text{CF}) / \epsilon_{\text{trastuzumab}} = 1.69 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$\begin{aligned} \text{Grado de etiquetado (DOL)} &= A_{\text{max}} \text{ de la proteína etiquetada} / \epsilon_{\text{BODIPY-R6G}} \cdot [\text{Proteína conjugada}] \\ &= 3.2 \text{ moles de BODIPY R6G por mol de trastuzumab} \end{aligned}$$

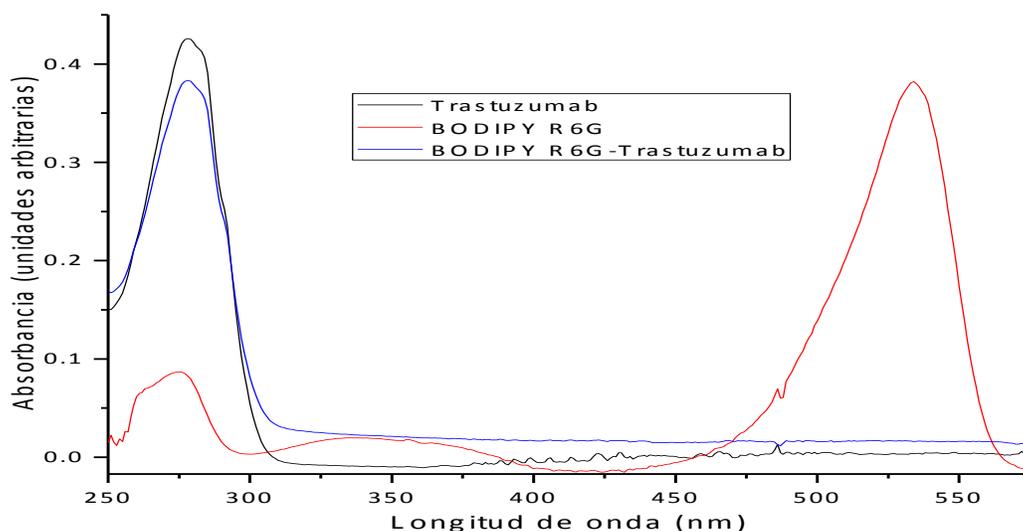


Fig. 64 Espectros UV-Visible del trastuzumab y su bioconjugación con el colorante fluorescente éster de succinimidil de BODIPY R6G.

Trastuzumab: 145.53 kDa^(XIII)

Éster de succinimidil de BODIPY R6G: 437.21 gmol⁻¹

Punto isoeléctrico (pI) de trastuzumab= 8.70^(XIV)

λ_{max} de trastuzumab: 280 nm

λ_{max} de BODIPY R6G: 528 nm

$\epsilon_{\text{Trastuzumab}} = 2.22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [57,58]

$\epsilon_{\text{BODIPY R6G}} = 70\,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ^(XV)

Nota: λ : Longitud de onda, ϵ : Coeficiente de extinción molar, max: máxima.

4.2 Comparación de células con diferentes afinidades (MCF-7 y T47D) por el sustrato nanoestructurado no funcionalizado a través AFM

Procedimiento experimental

1. Se depositaron ~10 000 células sobre el sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p /Au.
2. Se dejaron sembrar las células con suficiente medio de cultivo durante 48 horas a 37 °C.
3. Posteriormente las células se fijaron con 10% buffer de formalina neutra (NBF) durante 10 minutos (2 minutos para prefijación y los 8 minutos restantes con 10% NBF fresco para la fijación completa). Antes de la fijación, las células se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS) para remover el medio de cultivo y después del proceso de fijación se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los desechos de la fijación.
4. Se vertió una alícuota de 1.4 μL de una solución de BODIPY R6G-Trastuzumab de concentración 7.2 mgml^{-1} en 400 μl de buffer fosfatos (62 mM, pH=7.4) obteniéndose una concentración de $10 \mu\text{gml}^{-1}$.
5. Posteriormente el sustrato nanoestructurado con las células ya fijadas se incubaron en esta solución durante 1 hora a 37 °C.
Este procedimiento se realizó en un Multiplacas Nunclon[®] Δ de 4 pozos
6. Después de este tiempo, la muestra se enjuagó con PBS y se guardó en un desecador hasta su análisis posterior.

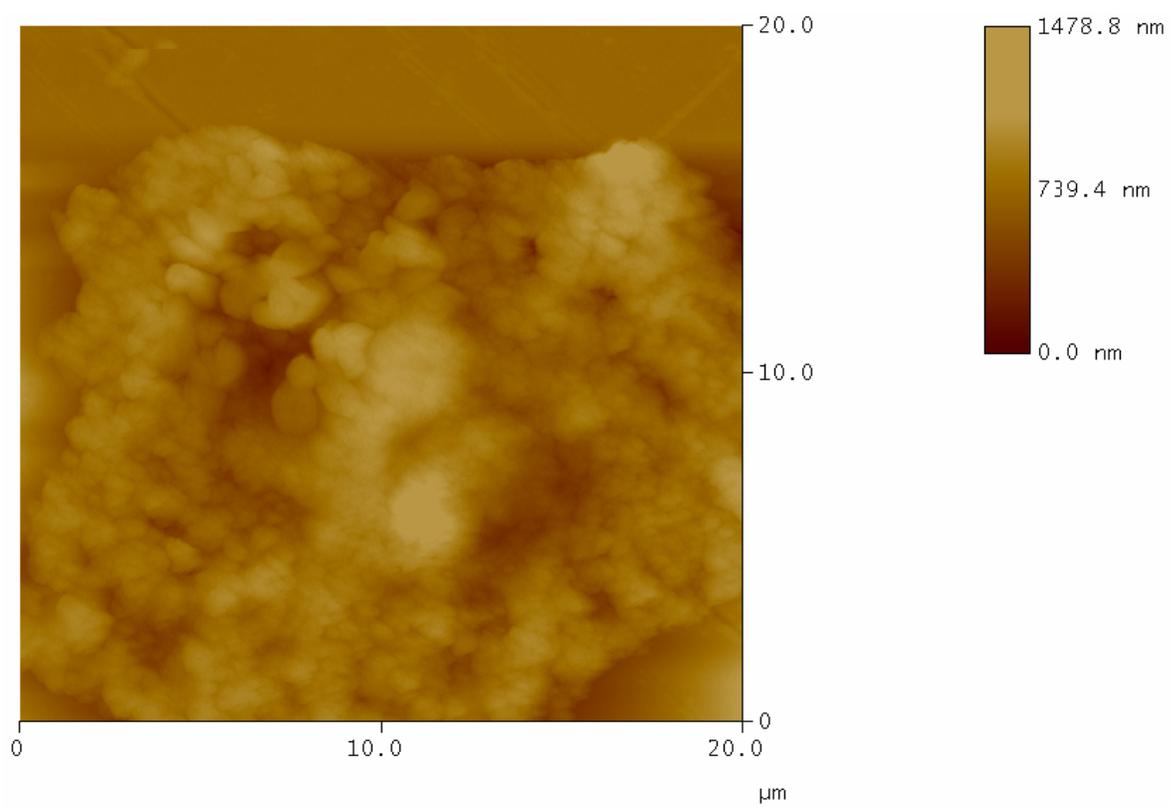
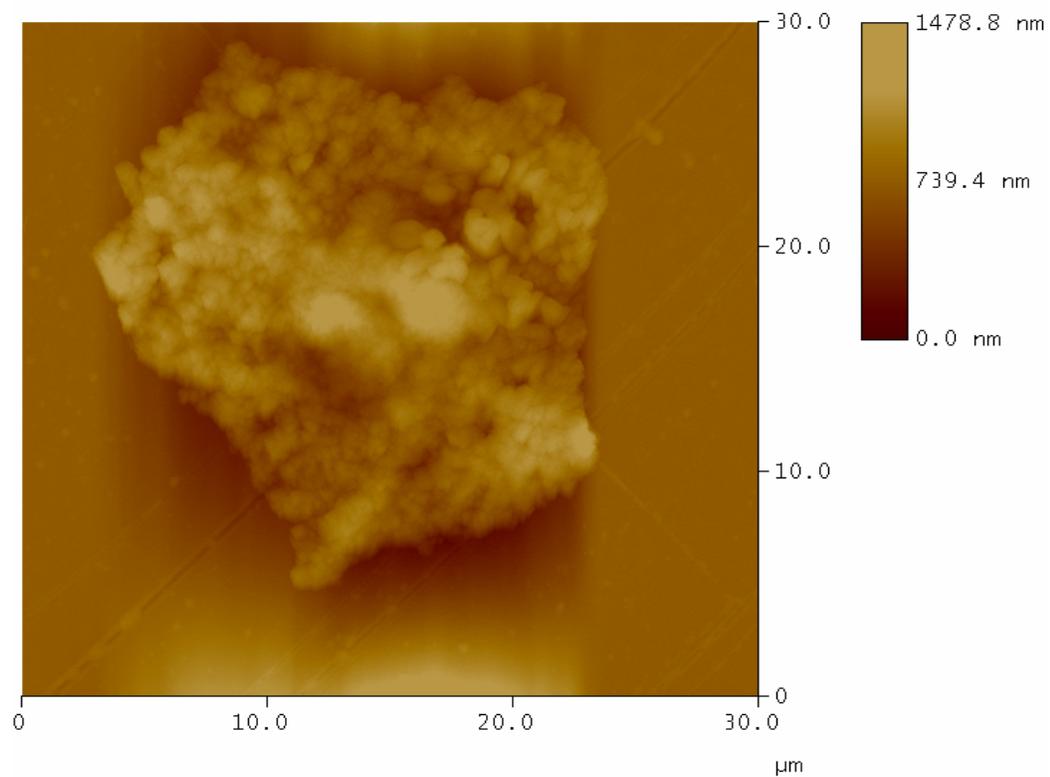


Fig. 65 Célula MCF-7 sobre el sustrato nanoestructurado AgNP 3000 p /Au no funcionalizado.

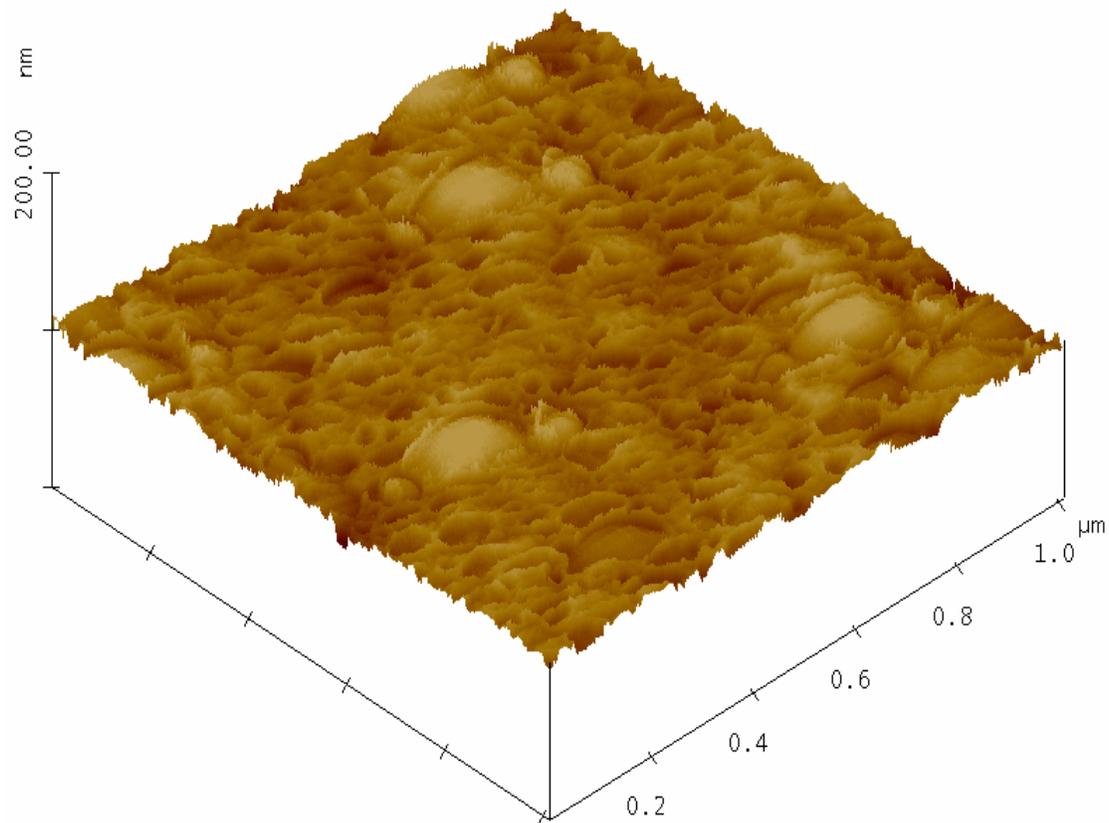
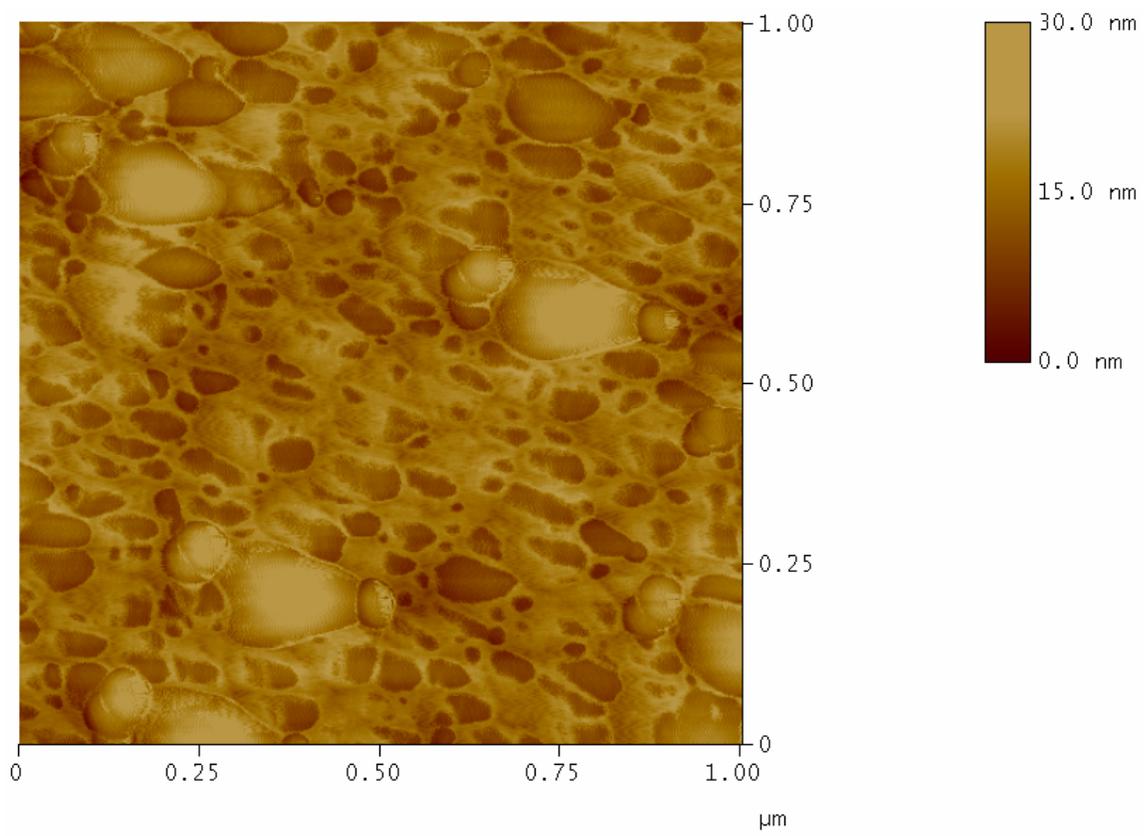


Fig. 66 Superficie nanoestructurada al final del proceso de fijación de celular.

4.2.1 Caracterización por espectroscopia Raman de BODIPY R6G-trastuzumab con células MCF-7 y T47D

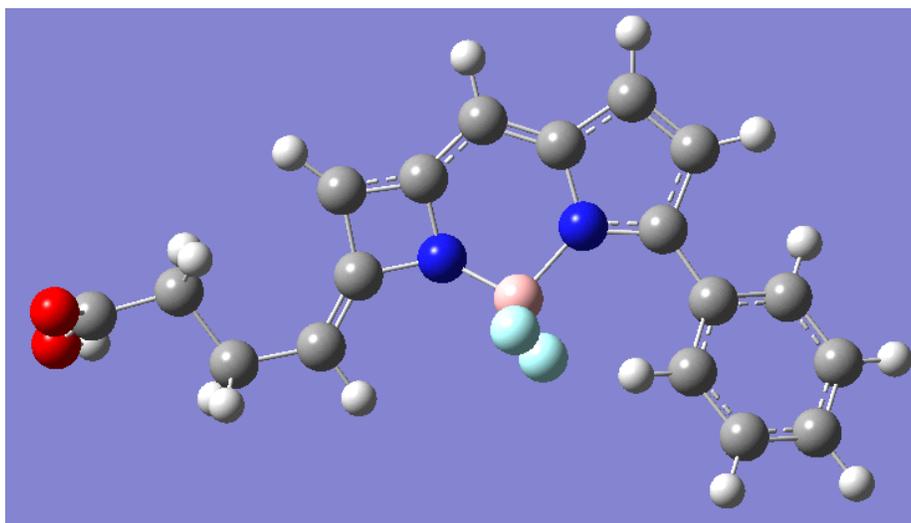


Fig. 67 Confórmero de mínima energía en fase gas del BODIPY R6G obtenido con el funcional B3LYP y la función base 6-311++G (d,p) mediante el software Gaussian 09 [39].

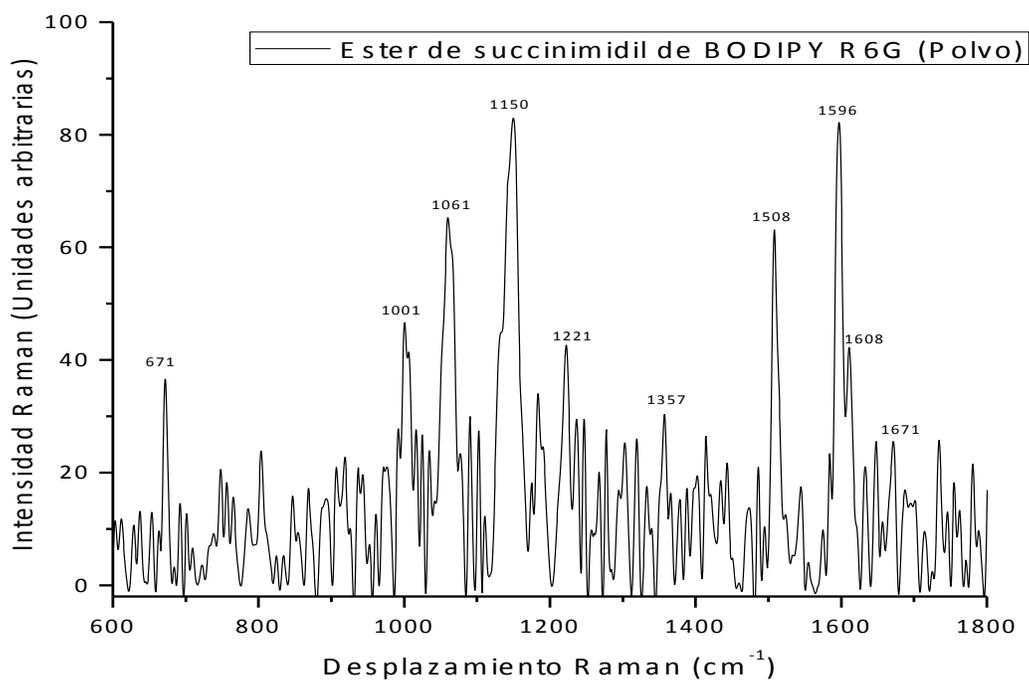


Fig. 68 Espectro Raman del éster de succinimidil de BODIPY R6G en polvo.

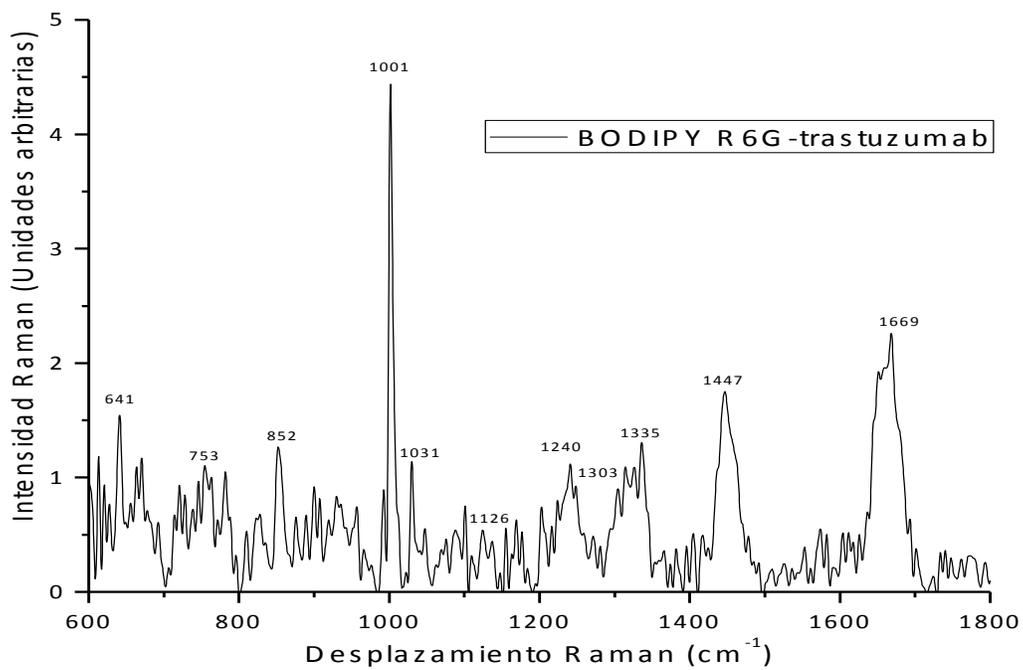


Fig. 69 Espectro Raman de BODIPY R6G conjugado a trastuzumab.

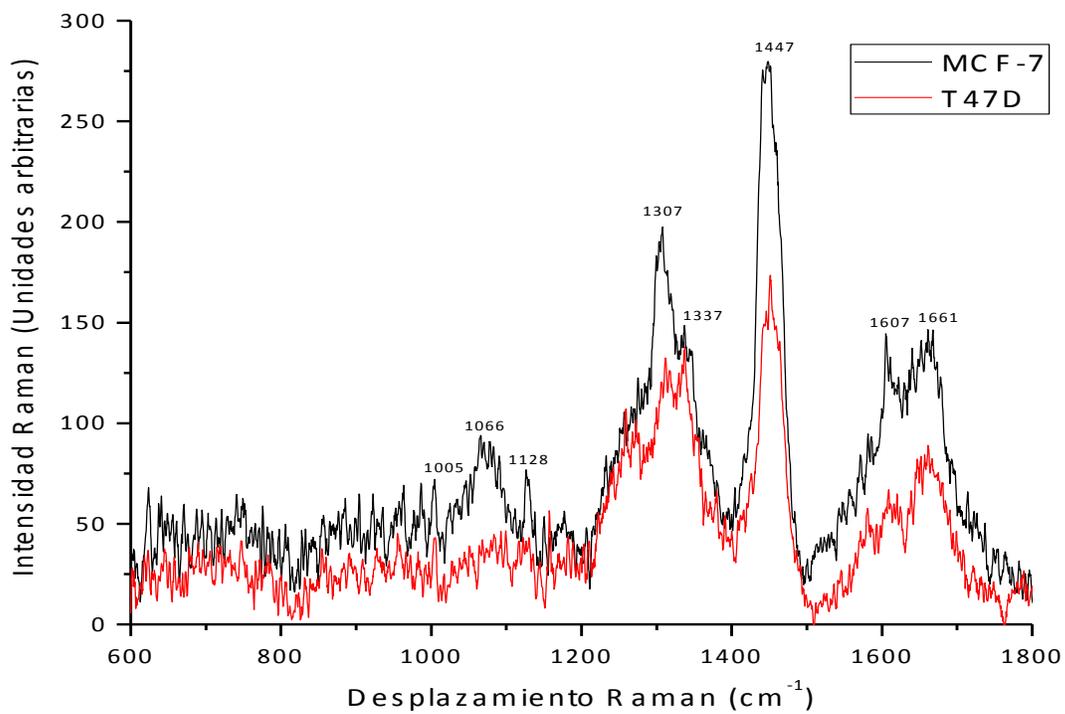


Fig. 70 Obtención del espectro Raman de BODIPY R6G conjugado con trastuzumab en presencia de células MCF-7 y T47D.

4.3 Discusión y conclusiones sobre la interacción de células de cáncer con el sustrato nanoestructurado no funcionalizado en presencia de BODIPY R6G.

La obtención de la imagen de AFM de las células T47D no fue posible debido a que las células están muy altas (>5 μm) por lo que el cantiléver de AFM no fue capaz de resolver la imagen. Tal altura se debió al proceso de fijación, el cual fue a través de formalina neutra al 10 % el cual no permite una deshidratación adecuada equiparable como la fijación por un tren de alcohol.

La conjugación del éster de succinimidil de BODIPY R6G con trastuzumab se llevó a cabo obteniéndose un grado de etiquetamiento de 3:1. El colorante fluorescente BODIPY R6G presenta un desplazamiento de Stokes relativamente pequeño por lo que presenta mayor dispersión Raman que fluorescencia (en teoría), los cuales son fenómenos de igual naturaleza pero competitivos. Cabe mencionar que son ampliamente utilizadas las proteínas conjugadas a colorantes fluorescentes para teñir especímenes biológicos utilizando microscopia confocal de fluorescencia para su análisis. En el presente trabajo se exploró la aplicación de trastuzumab conjugado a BODIPY R6G en presencia de dos líneas celulares de cáncer: MCF-7 y T47D haciendo uso de una superficie nanoestructurada libre de funcionalización para analizar la interacción anticuerpo-antígeno por medio de espectroscopia Raman. Ambas líneas celulares presentan ligeras diferencias en la cantidad de receptores HER2 sobre su superficie [59]. Los modos vibracionales en 1303, 1337, 1447, y 1661 cm^{-1} de la Fig. 70 tentativamente corresponden a la interacción BODIPY R6G-trastuzumab-receptores HER2 presentes en las células MCF-7 y T47D, ya que están presentes en los espectros Raman de la Fig. 69 (BODIPY R6G-trastuzumab).

Tabla 7. Diferencias entre sustrato funcionalizado vs. no funcionalizado

	Sustrato funcionalizado	Sustrato no funcionalizado
Adhesión celular	4 horas	48 horas
Fijación	Tren de alcohol	Formalina neutra al 10 %
Morfología celular por AFM	Normal	Alterada
Posible uso	Biosensor para células de carcinoma de mama a través de espectroscopia Raman.	No muy apto para espectroscopia Raman (presencia de mucha fluorescencia).

CAPÍTULO V (Conclusiones)

5.1 Conclusiones globales

En esta tesis se desarrolló el diseño de superficies nanoestructuradas para la detección de células de cáncer de mama.

Este trabajo fue realizado en diferentes etapas, empezando con la selección del sustrato metálico más adecuado (nanopartículas de plata sobre una placa de oro). Después el proceso continúa con diferentes etapas, donde el sustrato se funcionaliza con 4-MBA-trastuzumab para aumentar la interacción específica entre el biosensor y las células de cáncer.

Después de cada etapa de funcionalización, la superficie del biosensor se analizó detalladamente a nivel molecular por AFM y espectroscopia Raman. De esta manera tuvimos un completo control de la calidad de la morfología, el proceso y alcance de la funcionalización de la superficie. Es importante destacar que no existe antecedente en la bibliografía consultada sobre este tipo de desarrollo metodológico (análisis paso por paso).

En cada etapa de la funcionalización optimizamos las propiedades de la superficie mediante variaciones de concentración de adsorbato, pH y tiempo de adsorción del adsorbato.

Los resultados de AFM y espectroscopia Raman muestran claramente significativas diferencias en la superficie del biosensor durante cada etapa de funcionalización o modificación.

Al final, este biosensor fue probado en términos de interacción con células de cáncer de mama MCF7 y T47D. Como control en este estudio se usaron células de cáncer de mama con receptores previamente pre-bloqueados.

En general, el éxito en este estudio nos enseña que a través de espectroscopia Raman se puede identificar claramente la interacción de células cancerígenas con el biosensor (Fig. 51) *versus* la muestra control (Fig. 47 en la Región 3). La diferencia en sensibilidad y magnitud de interacción de las células de cáncer con el biosensor diseñado en este trabajo, también es

visible cuando dichas células de cáncer de mama fueron expuestas en contacto con diferentes superficies de sustrato (funcionalizado y no funcionalizado).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la metodología desarrollada sustenta una nueva vía en el diseño de un inmunosensor de cáncer de mama.

5.2 Perspectivas

El presente trabajo abre un panorama para el desarrollo de un biosensor para la detección de la interacción anticuerpo-antígeno en células de carcinoma de mama haciendo uso de una superficie nanoestructurada funcionalizada y utilizando la espectroscopia Raman como un transductor de señal (aunque realmente podría utilizarse algún otro tipo de transductor de señal). En base a nuestros resultados encontramos que es altamente factible desarrollar un biosensor comercial.

Algunas propuestas adicionales son:

- ✓ Utilizar trastuzumab conjugado a peroxidasa y una vez fijadas las células, utilizar el cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), lo cual permitiría visualizar macroscópicamente a través de un cambio de color la interacción anticuerpo-antígeno.
- ✓ Anclar sobre el sustrato nanoestructurado otro biomarcador tal como Anti-EpCAM (su antígeno EpCAM juega un rol en tumorigénesis y metástasis de ciertos carcinomas)

Referencias

1. A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, **Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors**, *Biotechnology Advances*, 30, 489-511, 2012.
2. G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, **Atomic Force Microscope**, *Phys. Rev. Lett.*, 56(9), 930-933, 1986.
3. B. Chase, **A new generation of Raman instrumentation**, *Appl. Spectr.*, 48, 14–19, 1994.
4. K.C. Bantz, A.F. Meyer, N.J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtuluş, S.H. Lee, N.C. Lindquist, S.H. Oh, C.L. Haynes, **Recent progress in SERS biosensing**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(24), 11551-11567, 2011.
5. E.B. Hanlon, R. Manoharan, T.W. Koo, K.E. Shafer, J.T. Motz, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, **Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy**, *Phys. Med. Biol.*, 45(2), R1, 2000.
6. C.V. Raman, K.S. Krishnan, **A new type of secondary radiation**, *Nature*, 121, 501–504, 1928.
7. A. Smekal, **Zur quantentheorie der dispersion**, *Naturwissenschaften*, 11(43), 873-875, 1923.
8. M. Moskovits, **Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective**, *J. Raman Spectroscopy*, 36, 485–496, 2005.
9. M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, **Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode**, *Chem. Phys. Lett.*, 26(2), 163–166, 1974.
10. D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, **Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode**, *J. Electroanal. Chem.*, 84, 1-20, 1977.

11. M.G. Albrecht, J.A. Creighton, **Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode**, J. Am. Chem. Soc., 99, 5215–5217, 1977.
12. P.F. Liao, J.G. Bergman, D.S. Chemla, A. Wokaun, J. Melngailis, A.M. Hawryluk, N.P. Economou, **Surface enhanced Raman scattering from microlithographic silver particle surfaces**, Chem. Phys. Lett., 82(2), 355–359, 1981.
13. R.E. Howard, P.F. Liao, W.J. Skocpol, L.D. Jackel, H.G. Craighead, **Microfabrication as a scientific tool**, Science, 221, 117–121, 1983.
14. S.M. Morton, E. Ewusi-Annan, L. Jensen, **Controlling the non-resonant chemical mechanism of SERS using a molecular photo-switch**, Phys. Chem. Chem. Phys., 11, 7424–7429, 2009.
15. J.R. Lombardi, R.L.A. Birke, **Unified approach to surface-enhanced Raman spectroscopy**, J. Phys. Chem. C, 112, 5605–5617, 2008.
16. P. Kambhampati, C.M. Child, M.C. Foster, A. Campion, **On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory**, J. Chem. Phys., 108, 5013–5026, 1998.
17. R.L. McCreery, **Raman spectroscopy for chemical analysis**, Vol. 157, Wiley-Interscience, USA, 2000.
18. L.L. Zhao, L. Jensen, G.C. Schatz, **Surface-enhanced Raman scattering of pyrazine at the junction between two Ag₂₀ nanoclusters**, Nano Lett., 6(6), 1229–1234, 2006.
19. A.J. Haes, C.L. Haynes, A.D. McFarland, G.C. Schatz, R.R. Van Duyne, S.L. Zou, **Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy**, MRS Bulletin, 30, 368–375, 2005.
20. N.R. Agarwal, E. Fazio, F. Neri, S. Trusso, C. Castiglioni, A. Lucotti, N. Santo, P.M. Ossi,

Ag and Au nanoparticles for SERS substrates produced by pulsed laser ablation, Cryst. Res. Technol., 46(8), 836-840, 2011.

21. M. Lacroix, G. Leclercq, **Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update**, Breast Cancer Res. Treat., 83, 249–289, 2004.
22. H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma**. J. Natl. Cancer Inst., 51, 1409-1416, 1973.
23. A.S. Levenson, V.C. Jordan, **MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line**, Cancer Res., 57, 3071-3078, 1997.
24. I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F.R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik, H.J. Brenne, **Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin**, European Journal of Cancer, 15(5), 659-670, 1965.
25. Z.M. Zhang, S. Chen, Y.Z. Liang, **Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares**, Analyst, 135 (5), 1138-1146, 2010.
26. M. Kerker, **Selected papers on surface-enhanced Raman scattering**, Vol. MS 10, SPIE Optical Engineering Press, USA, 1990.
27. R. Oriňáková, L. Škantárová, A. Oriňák, J. Demko, M. Kupková, J.T. Andersson, **Electrochemical deposition of SERS active nanostructured silver films**, Int. J. Electrochem. Sci., 8, 80-99, 2013.
28. T. Wadayama, M. Oishi, A. Hatta., **Surface enhanced Raman scattering of organic sample powders spread over vacuum-evaporated silver thin film**, Applied Surface Science, 253, 2713-2717, 2006.
29. J.A. Dieringer, A.D. McFarland, N.C. Shah, D.A. Stuart, A.V. Whitney, C.R. Yonzon, M.A. Young, X. Zhang, R.P. Van Duyne, **Surface enhanced Raman spectroscopy: New**

- materials, concepts, characterization tools, and applications**, Faraday Discussions, 132, 9-26, 2006.
30. D.J. Maxwell, S.R. Emory, S. Nie, **Nanostructured thin-film materials with surface-enhanced optical properties**, Chem. Mater., 13, 1082-1088, 2001.
31. N.A.A. Hatab, J.M. Oran, M.J. Sepaniak, **Surface-enhanced Raman spectroscopy substrates created *via* electron beam lithography and nanotransfer printing**, ACS Nano, 2(2), 377-385, 2008.
32. Z. Wang, S. Pan, T. D. Krauss, H. Du, L.J. Rothberg, **The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering**, Proc. Nat. Acad. Sci., 100(15), 8638-8643, 2003.
33. S.B. Chaney, S. Shanmukh, R.A. Dluhy, Y.P. Zhao. **Aligned silver nanorod arrays produce high sensitivity surface-enhanced Raman spectroscopy substrates**, Applied Phys. Lett., 87, 031908, 2005.
34. K. Seal, A.K. Sarychev, H. Noh, D.A. Genov, A. Yamilov, V.M. Shalaev, Z.C. Ying, H. Cao, **Near-field intensity correlations in semicontinuous metal-dielectric films**, Phys. Rev. Lett., 94, 226101, 2005.
35. Z. Wang, L.J. Rothberg. **Silver nanoparticle coverage dependence of surface-enhanced Raman scattering**, Appl. Phys. B, 84, 289-293, 2006.
36. R. Manoharan, J.J. Baraga, M.S. Feld, R.P. Rava, **Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy**, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 16, 211-233, 1992.
37. H. Hiramatsu, F.E. Osterloh, **pH-Controlled Assembly and disassembly of electrostatically linked CdSe-SiO₂ and Au-SiO₂ nanoparticle clusters**, Langmuir, 19, 7003-7011, 2003.

38. G. Millotti, C. Samberger, E. Frohlich, D. Sakloetsakun, A. Bernkop-Schnurch, **Chitosan-4-mercaptobenzoic acid: Synthesis and characterization of a novel thiolated chitosan** *J. Mater. Chem.*, 20, 2432–2440, 2010.
39. Gaussian 09, Revision B.01,
M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria,
M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci,
G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian,
A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada,
M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima,
Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr.,
J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers,
K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand,
K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi,
M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross,
V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann,
O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski,
R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth,
P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels,
O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski,
and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
40. J. Yang, Z. Wang, X. Tan, J. Li, C. Song, R. Zhang, Y. Cui, **A straightforward route to the synthesis of a surface-enhanced Raman scattering probe for targeting transferrin receptor-overexpressed cells**, *Nanotechnology*, 21, 345101 (7pp), 2010.
41. A. Michota, J. Bukowska, **Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates**, *J. Raman Spectrosc.*, 34, 21-25, 2003.
42. A. Kudelski, **Surface-enhanced Raman scattering study of monolayers formed from mixtures of 4-mercaptobenzoic acid and various aromatic mercapto-derivatives bases**, *J. Raman Spectrosc.*, 40, 2037-2043, 2009.

43. J. Yang, Z. Wang, S. Zong, C. Song, R. Zhang, Y. Cui, **Distinguishing breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 1093-1100, 2012.
44. J.V. Staros, R.W. Wright, D.M. Swingle, **Enhancement by *N*-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions**, *Anal. Biochem.*, 156(1), 220-222, 1986.
45. G.T. Hermanson, **Bioconjugate Techniques**, 1st edition, Academic Press, Inc., p.139-140, USA, 1996.
46. N.J. de Mol, M.J.E. Fischer (Eds.), **Surface Plasmon Resonance (Chapter 3)**, *Methods in Molecular Biology* 627, Springer Science+Business Media, LLC 2010.
47. T.P. Thomas, Y.C. Chang, J.Y. Ye, A. Kotlyar, Z. Cao, R. Shukla, S. Qin, T.B. Norris, J.R. Baker Jr., **Optical fiber-based in vivo quantification of growth factor receptors**, *Cancer*, 118(8), 2148-2156, 2012.
48. S.K. Muthuswamy, M. Gilaman, J.S. Brugge, **Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers**, *Mol. Cell Biol.*, 19(10), 6845-6857, 1999.
49. D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, *et al.*, **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer**, *Science*, 244(4905), 707-712, 1989.
50. Q. Matthews, A. Jirasek, J. Lum, X. Duan, A.G. Brolo, **Variability in Raman Spectra of Single Human Tumor Cells Cultured in Vitro: Correlation with Cell Cycle and Culture Confluency**, *Appl. Spectr.*, 64(8), 871-887, 2010.
51. J.W. Chan, D.S. Taylor, T. Zwerdling, S.M. Lane, K. Ihara, T. Huser, **Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells**,

Biophysical J., 90, 648-656, 2006.

52. D. Drescher, T. Buchner, D. McNaughton, J. Kneipp, **SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(15), 5364-5373, 2013.
53. H.J. Hathaway, K.S. Butler, N.L. Adolphi, D.M. Lovato, R. Belfon, D. Fegan, T.C. Monson, J.E. Trujillo, T.E Tessier, H.C. Bryant, D.L. Huber, R.S. Larson, E.R. Flynn, **Detection of breast cancer cells using targeted magnetic nanoparticles and ultra-sensitive magnetic field sensors**, *Breast Cancer Research*, 13:R108, 2011.
54. R. Reverberi, L. Reverberi, **Factors affecting the antigen-antibody reaction**, *Blood Transfusion*, 5(4), 227-240, 2007.
55. R.P. Haugland, **Antibody conjugates for cell biology**, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 16, Unit 16.5, 2001.
56. D. Zhang, Y. Wen, Y. Xiao, G. Yu, Y. Liu, X. Qian, **Bulky 4-tritylphenylethynyl substituted boradiazaindacene: Pure red emission, relatively large Stokes shift and inhibition of self-quenching**, *Chem. Commun.*, 4777-4779, 2008.
57. M. Shi, J.H. Wosnick, K. Ho, A. Keating, M.S. Shoichet, **Immuno-polymeric nanoparticles by Diels–Alder chemistry (Supporting Information)**, *Angew. Chem.*, 119, 6238-6243, 2007.
58. S. Bhattacharyya, S. Wang, D. Reinecke, W. Kiser Jr., R.A. Kruger, T.R. DeGrado, **Synthesis and evaluation of near-infrared (NIR) dye-herceptin conjugates as photoacoustic computed tomography (PCT) Probes for HER2 expression in breast cancer**, *Bioconjug. Chem.*, 19(6), 1186–1193, 2008.
59. D.W. Rusnak, K.J. Alligood, R.J. Mullin, G.M. Spehar, C. Arenas-Elliott, A.M. Martin, Y. Degenhardt, S.K. Rudolph, T.F. Haws Jr, B.L. Hudson-Curtis, T.M. Gilmer, **Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1) and HER2 (ErbB2) protein**

expression levels and response to lapatinib (Tykerb[®], GW572016) in an expanded panel of human normal and tumour cell lines, *Cell Prolif.*, 40, 580–594, 2007.

Páginas web:

^(I)<http://amyhallr.wordpress.com/2013/03/15/atomic-force-microscopy/> (accesado: 6/01/2014)

^(II)<http://www.sas.upenn.edu/~crulli/TheRamanSpectrophotometer.html> (accesado: 6/01/2014)

^(III)<http://research.chem.psu.edu/lxjgroup/page16.html> (accesado: 12/07/2014)

^(IV)http://www.iqfr.csic.es/ql/Web_QL_english/Ablacion_laser/AL_home_data/AL_Lineas_Investigacion/AL_LI_Lpad.html (accesado: 6/01/2014)

^(V)<http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf> (accesado: 07/07/2014)

^(VI)<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CurrentProtocols/3/Toolbox/000003.html> (accesado: 07/07/2014)

^(VII)<http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Spectrum2D.htm> (accesado: 03/06/2014)

^(VIII)<http://images.library.wisc.edu/EcoNatRes/EFacs/Argentum/Argentumv04/reference/econatres.argentumv04.bellsilver.pdf> (accesado: 30/05/2014)

^(IX)<http://www.gene.com/patients/disease-education/her-pathway> (accesado: 8/01/2014)

^(X)<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072> (accesado: 3/02/2014)

^(XI)<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm080591.htm> (accesado: 4/02/2014)

^(XII)<http://www.bioncology.com/research-education/her/dimer> (accesado: 8/01/2014)

^(XIII)<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072> (accesado: 6/02/2014)

^(XIV)https://mc.usp.org/sites/default/files/documents/Trastuzumab_Summary%20Validation%20Report_25JUL2013_Ver%200.2.pdf (accesado: 7/02/2014)

^(XV)<http://www.lifetechnologies.com/mx/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/bodipy-dye-series.html> (accesado: 7/02/2014)