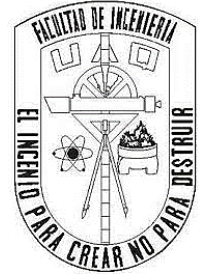


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ingeniería



Estructuras híbridas que contienen nanopartículas de oro para biosensado mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Andrea Denisse Sánchez Nieves

Director de Tesis:

Dr. Rufino Nava Mendoza

Codirectora de tesis:

Dra. Luz María López Marín

Santiago de Querétaro, Querétaro.

Marzo 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estructuras híbridas que contienen nanopartículas de oro para biosensado mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada

por

Andrea Denisse Sánchez Nieves

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

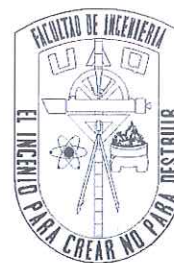
Clave RI: IGLIN-262927



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología



Estructuras híbridas que contienen nanopartículas de oro para biosensado mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Andrea Denisse Sánchez Nieves

Dirigido por:

Dr. Rufino Nava Mendoza

Codirector:

Dra. Luz María López Marín

SINODALES

Dr. Rufino Nava Mendoza
Presidente

Firma

Dra. Luz María López Marín
Secretario

Firma

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández
Vocal

Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Suplente

Firma

M. en C. Carlos Manuel Valdemar Aguilar
Suplente

Firma

Querétaro, QRO.
Marzo 2023.

Agradecimientos

El proyecto se realizó bajo la supervisión de Doctores de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro y del Centro de Física Aplicada y Tecnologías Avanzadas de la UNAM, Campus Juriquilla, el Doctor Rufino Nava Mendoza y la Doctora Luz María López Marín.

Agradezco por el apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 53395, y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, a través del proyecto IT200421.

A mis asesor Dr. Rufino Nava Mendoza, por su apoyo para supervisar mi tesis y su guía durante mi formación en las clases.

A mi asesora Dra. Luz María López Marín, por haberme enseñado numerosas técnicas nuevas, por su amplia disposición hacía la supervisión de mi trabajo y fomentar la convivencia para formar un equipo multidisciplinario.

A los miembros del jurado de tesis, la Dra. María Ángeles Cuan Hernández, c.Dr. Carlos Manuel Valdemar Aguilar y Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por sus aportaciones para enriquecer el trabajo.

A la técnica titular de la unidad de microscopía M. en C. María Lourdes Palma Tirado, por su ayuda en la obtención de las micrografías TEM.

A la Dra. María Antonieta Mondragón Sosa y M. en C. Jesús Fernando Solís Vivanco por su apoyo en la obtención y análisis de Espectroscopía Raman.

A los miembros y amigos del Laboratorio de Nanobio-óptica, Dr. Alejandro Magallanes Puebla que me apoyo cuando se presentaba una duda y en enseñarme el método bicinconínico entre otras cosas, M. en C. Armando Becerra Hernández, por ayudarme en el análisis de espectroscopía Uv-vis, al M. en C. Juan Patiño Cárdenas por auxiliarme en la técnica de contraste del TEM y a mis compañeras María, Paola y Mariana por su apoyo incondicional y tiempo de convivencia.

A mi familia, que siempre estuvieron brindándome apoyo durante todo el proceso no solo del trabajo si no en toda mi formación para lograr mis objetivos.

Dedicatoria

A mi familia, que me brindó soporte cuando por la pandemia lamentablemente no se podía continuar con el trabajo y sus continuos ánimos que me brindaban para no abandonar el trabajo.

A todas aquellas personas que me mostraron su apoyo y confiaron en mí.

Resumen

El proyecto se enmarca dentro de la búsqueda de nuevos biosensores que presenten características como sensibilidad, selectividad y sin necesidad de un marcador, ya que el diagnóstico a temprana etapa posibilita su detección el decremento de la defunción de las personas.

Las lectinas poseen una aplicación potencial y prometedora en el campo de diagnóstico y terapia del cáncer. Son una clase especial de proteínas de origen no inmunitario que reconocen selectivamente y se unen reversiblemente a carbohidratos y glicoconjugados.

Se desarrolló una estructura híbrida compuesta por nanopartículas de oro sintetizada por el método de Turkevich y mediante una fisisorción, se funcionalizó con una lectina proveniente de un cereal conocida como *Wheat Germ Agglutinin*. La estructura obtenida se caracterizó por espectroscopía ultravioleta visible, microscopía electrónica de transmisión, cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico, así como por espectroscopía Raman convencional y de superficie mejorada.

Mediante las propiedades de superficie que presentan las nanopartículas de oro, en particular por la resonancia de plasmón superficial, el sistema híbrido indujo la amplificación de la señal en espectroscopía Raman de superficie mejorada para azúcares que se unen específicamente a la lectina. El sistema fue probado con soluciones del azúcar libre, así como con cultivos de células inmortales de las líneas MCF-7 y MCF-12.

Abstract

This project forms part of the search for new biosensors, with characteristics such as sensitivity, and selectivity, furthermore without the need for new markers. Early diagnosis of diseases makes it possible to detect them and decrease the death rate in the population.

Lectins have a potential and promising application in the field of cancer diagnosis and therapy. They are a special class of non-immune proteins that selectively recognize and bind reversibly to carbohydrates and glycoconjugates.

A hybrid structure was developed composed of gold nanoparticles synthesized by the Turkevich method, then functionalized by physisorption with a lectin derived from a cereal known as *Wheat Germ Agglutinin*. The obtained structure was characterized by visible ultraviolet spectroscopy, transmission electron microscopy, protein quantification by the bicinchoninic acid method, as well as by conventional and enhanced surface Raman spectroscopy.

Through the surface properties of gold nanoparticles, particularly by surface plasmon resonance, the hybrid system induced signal amplification for sugars that bind specifically to the lectin. The system was tested using solutions of the free sugar, as well as cultures of the immortal cell lines MCF-7 and MCF-12.

Contenido

Introducción	9
Antecedentes teóricos	12
Cáncer.....	12
Detección precoz.....	12
Biosensor.....	14
Nanopartículas de Oro.....	15
Síntesis de nanopartículas por el método de Turkevich.....	16
Proteínas.....	17
Lectinas.....	17
Método para cuantificación de proteínas: Método del ácido bicinonínico (BCA).....	20
Cultivos celulares.....	20
MCF-7.....	21
MCF-12.....	21
Espectroscopía Raman.....	22
Teoría del método Raman.....	22
Espectroscopía Raman con superficie mejorada (SERS).....	26
Justificación	29
Descripción del problema	30
Hipótesis	31
Objetivo General	31
Objetivos particulares.....	31
Metodología	32
Materiales y métodos.....	32
Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.....	32
Adherencia de la corona dura en las AuNP.....	32
Remoción de corona suave.....	32
Cultivos celulares MCF-7 & MCF-12.....	33
Caracterizaciones.....	34
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	34
Espectroscopía Raman.....	34
Espectroscopía Ultravioleta visible (Uv-vis).....	35

Cuantificación de proteínas	35
Método del ácido bicinconínico (BCA)	35
Resultados y Discusión	36
Nanopartículas de Oro.....	36
UV-visible	37
Formación de corona de lectina sobre AuNP	38
Espectro de absorción de la proteína WGA.....	40
Método del ácido bicinconínico (BCA)	41
Microscopía electrónica de Transmisión	43
Espectroscopía Raman	45
Señales Raman del híbrido obtenido AuNP@WGA	45
Uso del híbrido para el análisis Raman de azúcares control y azúcares específicamente reconocidos por WGA.....	50
Uso del híbrido para el análisis Raman de células control y células cancerosas, ricas en el azúcar NANA.....	52
Optimización de señales mediante el uso de un láser compatible con la energía de resonancia del híbrido AuNP@WGA	55
Conclusiones	58
Referencias	59

Lista de Abreviaturas

AuNP	Nanopartículas de oro
WGA	Aglutinina de germen de trigo
NP	Nanopartículas
Uv-vis	Ultravioleta Visible
NANA/Neu5ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
δ	Deformación
ν	Estiramiento
λ	Longitud de onda

Introducción

El rastreo, identificación y análisis cuantitativo de biomarcadores a muy bajas concentraciones para el diagnóstico presintomático representa una nueva frontera en la investigación en biomédica, facilitada por el uso de la nanomedicina (Pelaz, 2017; Chen, 2016; Barz M, 2015; Maddu, 2021) e impulsada por la química bioanalítica (Henry, 2016).

La detección de enfermedades en etapas tempranas significa el salvar o mejorar las vidas de los pacientes. En el caso de los cánceres es especialmente crítico, para que la eficiencia de los tratamientos ya existentes presente una mejora significativa al ser administrada en las primeras etapas de la enfermedad. Por lo tanto, es evidente que los diagnósticos cuantitativos y altamente sensibles son críticos y vitales. Asimismo, el manejo de enfermedades crónicas, como la diabetes, pueden beneficiarse considerablemente con diagnósticos sensibles, precisos y rápidos para mediciones continuas, como en este caso, de los niveles de glucosa.

Los biosensores con dimensiones a nanoescala, como las nanopartículas (NPs) y las superficies nanoestructuradas, ofrecen perspectivas interesantes, ya que pueden actuar como transductores de señal (Amendola, 2017) y, en última instancia, ofrecen un medio para sondear y cuantificar los bioanalitos, como los biomarcadores relacionados con enfermedades, en concentraciones muy pequeñas (de nano a zeptomolar) (Fenzl C., 2016).

Las nanoplataformas plasmónicas como el oro, el material de elección en nanotecnología biomédica (Yang 2015), las NPs de plata y las superficies nanoestructuradas presentan propiedades ópticas únicas debido a su función dieléctrica intrínseca, dimensiones a nanoescala y la naturaleza oscilante de la luz. En este régimen de tamaño (~10-100 nm), los efectos superficiales se vuelven prominentes, de modo que los electrones del metal y los fotones de luz incidente se acoplan en una cuasipartícula denominada polaritón de superficie.

Esta cuasipartícula oscila a una frecuencia que se conoce como la resonancia de plasmón de superficie localizada (por sus siglas en inglés LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance), con dos consecuencias importantes en las propiedades de la nanoplateforma: la dependencia de la longitud de onda y el campo electromagnético mejorado. En primer lugar, la dependencia de longitud de onda LSPR en la región del visible de infrarrojo cercano (por sus siglas en inglés, VISIBLE-NIR) del espectro electromagnético dicta que la nanoplateforma plasmónica posee intrínsecamente un color específico. Principio de los ensayos colorimétricos basados en LSPR, que pueden ser cualitativos o cuantitativos. En segundo lugar, el campo electromagnético alto en una superficie de nanoplateforma ofrece la oportunidad de acoplar las vibraciones moleculares de un analito cercano (hasta 10 nm de distancia de la superficie a la LSPR, lo que resulta en un aumento masivo de la intensidad de la señal molecular (Le Ru, 2008).

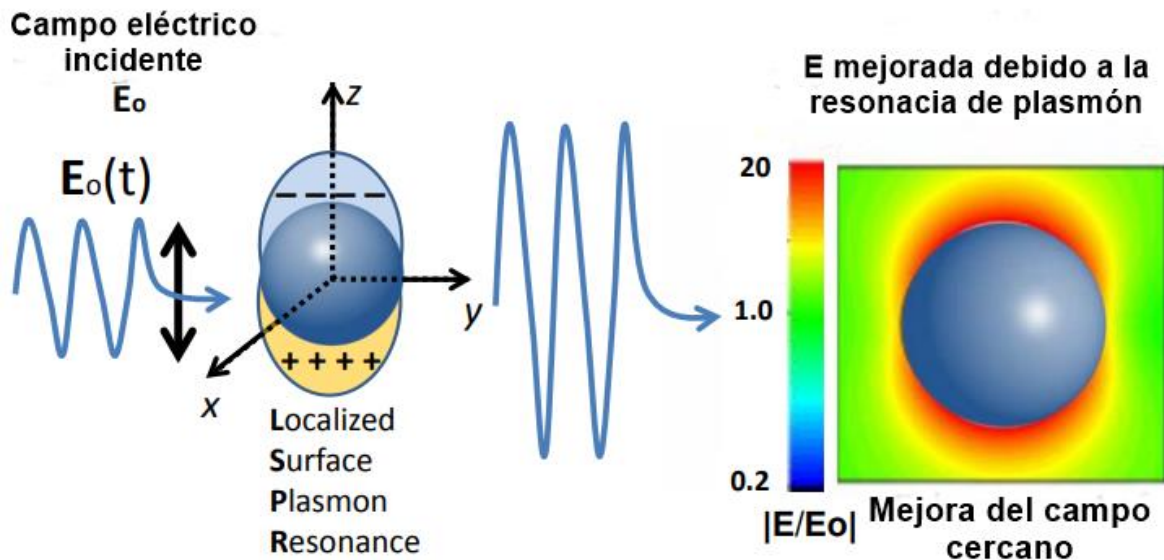


Figura 1. Esquemas de la polarización plasmónica estimulada en la nanoesfera y la modificación del campo eléctrico correspondiente en su entorno (Zapata-Herrera M., 2014).

Este fenómeno, denominado dispersión Raman en superficie, permite el uso de nanoplateformas plasmónicas como amplificador de señal Raman. La dispersión de Raman, que surge de la interacción inelástica de la luz con la materia, es

intrínsecamente una herramienta molecularmente específica. Sin embargo, la espectroscopia de Raman tiene poca sensibilidad, ya que sólo 1 de cada 10^8 fotones es dispersado por Raman. Mediante el uso de nanoplataformas plasmónicas como amplificadores de señal Raman, la espectroscopia Raman mejorada en superficie (SERS) es una herramienta espectroscópica ultrasensible (Langer, 2019).

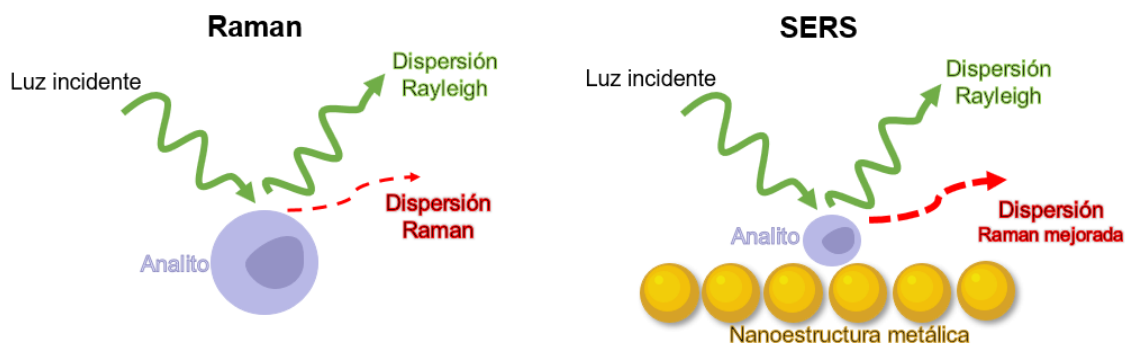


Figura 2. Esquema de la diferencia entre la espectroscopía Raman y SERS.

La configuración analítica para un experimento SERS y su diagnóstico es lo mismo que un experimento Raman "normal", ya que la sensibilidad obtenida por el método SERS es proporcionada por la nanoplataforma a la que se unen los analitos objetivo (Lane, 2015). Como tal, los desarrollos técnicos en la espectroscopia de Raman han beneficiado directamente al campo de SERS. Por ejemplo, el rango de longitudes de onda accesibles ahora abarca todo el espectro visible (400-750 nm), así como el NIR (750-1064 nm), que incluye la ventana óptica biológica (~600-1200 nm) para el análisis a través del tejido.

La técnica SERS se ha convertido en un campo que incluye una gran cantidad de experimentos a temperatura ambiente y dentro de las células vivas. El rápido crecimiento de SERS ha sido el resultado de su capacidad para sondear una NP a la vez (Wang L. H., 2020; Khurana, 2021) o varias, a través de imágenes (tanto *in vitro* como *in vivo*) y teledetección (a través de la detección de compensación espacial). Una abundante literatura se puede encontrar en los sustratos de SERS (Jahn, 2016; Ding, 2016; Lane, 2015) aplicados a la biodetección (Xu, 2015; Su X., 2016; Shvalya V., 2020), biomoléculas (Cialla-May, 2017), biofluidos de sondeo

(Henry, 2016), problemas médicos (Langer, 2019) y detección de cáncer (Santos, 2017; Zong, 2018), en particular.

Antecedentes teóricos

Cáncer

"Cáncer" es un término general usado para describir una variedad de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo; también tiene el término "tumor maligno" o "neoplasia maligna". Una característica definitoria del cáncer es la rápida propagación de células anormales que se propagan más allá de su rango normal y pueden invadir partes cercanas del cuerpo o diseminarse a otros órganos, un proceso llamado "metástasis". La propagación de metástasis es la principal causa de muerte por la enfermedad (OMS, 2022).

El cáncer es un importante problema de salud pública en todo el mundo y la segunda causa principal de muerte en el continente americano después de las enfermedades cardiovasculares. En 2020, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer se vieron afectados negativamente por la pandemia de coronavirus 2019 (COVID-19). El decremento de la atención debido al cierre de los centros de atención médica y el miedo a la exposición provocó el retraso del diagnóstico y el tratamiento. Sin embargo, llevará años cuantificar los efectos secundarios de esta y otras pandemias a nivel poblacional debido a la demora en la difusión de los datos de vigilancia basados en la población (Siegel, 2022).

Detección precoz

La mortalidad por cáncer se puede reducir si se detecta y se trata a tiempo. La detección precoz tiene dos componentes: el diagnóstico precoz y el tamizaje (cribado).

→ Diagnóstico precoz

Cuando el cáncer se detecta en una fase temprana es más probable que responda al tratamiento, lo que podría aumentar las probabilidades de supervivencia, reducir la morbilidad y abaratar la terapia. Si la enfermedad se detecta pronto y no se

retrasa la atención, se puede mejorar significativamente la vida de los enfermos oncológicos. El diagnóstico precoz consta de tres componentes:

- El conocimiento de los síntomas de los distintos tipos de cáncer y de la importancia de acudir al médico si se observan anomalías que suscitan preocupación.
- El acceso a los servicios clínicos de evaluación y diagnóstico; y la derivación oportuna del paciente a los servicios de tratamiento.
- El diagnóstico precoz de los cánceres sintomáticos se puede y se debe hacer en todas las situaciones para la mayoría de los tipos de cáncer.

Los programas oncológicos deben diseñarse para reducir los retrasos y los obstáculos al acceso a los servicios de diagnóstico, tratamiento y atención.

→Tamizaje

La finalidad del tamizaje es detectar indicios de un cáncer concreto o una determinada lesión precancerosa en personas asintomáticas. Cuando se encuentran anomalías durante el tamizaje deberán realizarse más pruebas para confirmar o descartar el diagnóstico y para derivar al paciente a tratamiento, si es necesario (OMS, 2022).

Biosensor

Un biosensor es un dispositivo analítico que consta de un transductor, un receptor biológico y un detector de salida digital que convierte un evento biológico o bioquímico en una señal que se puede medir a través del transductor. Dependiendo del tipo de método de detección, la señal se genera directamente en la superficie del transductor (impedancia o resonancia de plasmón superficial) o indirectamente por moléculas de señal, como fluoróforos, enzimas y moléculas electroquímicamente activas. Según la señal de respuesta de bioidentificación que se somete a la transducción, el mercado de biosensores electroquímicos se segmenta en potenciómetro, medidor de impedancia, medidor de conductividad, medidor de voltaje y otros tipos (Macovei, 2022).

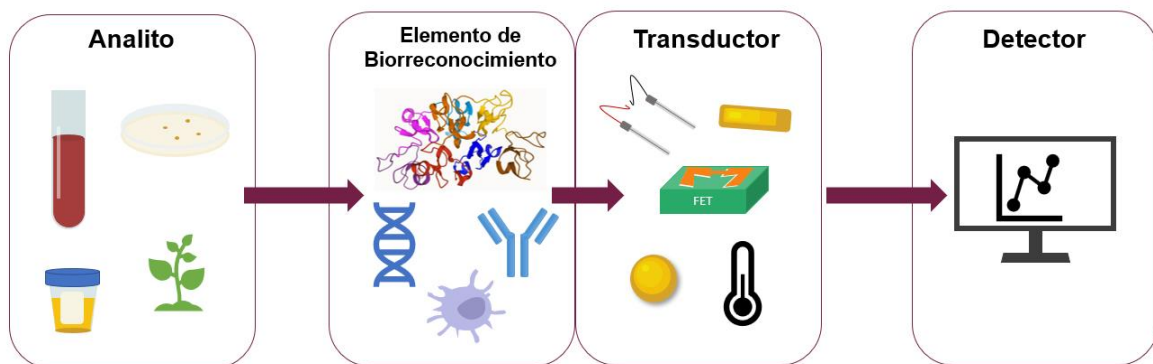


Figura 3. Un esquema del biosensor con un analito, un elemento de biorreconocimiento, un transductor y un detector.

El desarrollo de los biosensores fue iniciado por los pioneros Clark y Lyons en la década de 1960 y gracias a los avances logrados, hoy en día los principales tipos de biosensores son: basados en enzimas, basados en tejidos, inmunosensores, biosensores de ADN y biosensores térmicos y piezoeléctricos.

El primero de ellos, el biosensor basado en enzimas fue inicialmente reportado por Updike y Hicks en 1967. Para explorar enzimas, los biosensores enzimáticos hacen uso de métodos de inmovilización, tales como adsorción por fuerzas de van der Waals, enlaces iónicos o enlaces covalentes. Las enzimas comúnmente utilizadas para este propósito son oxidorreductasas, polifenol oxidasas,

peroxidasas y amino oxidasas (Mehrotra, 2016). En este tipo de biosensor, las enzimas como el elemento de reconocimiento detectan a un determinado analito de manera directa o indirecta (Darius G. Rackus, 2015).

Diviès realizó el primer sensor basado en microbios o en células. En otro tipo de sensores, compuestos por tejidos, el analito puede inhibir o ser un sustrato para el proceso, y sus elementos de reconocimiento proceden de fuentes vegetales y animales. El primero de estos sensores se desarrolló para la detección de arginina.

Por su parte, los sensores formados de orgánulos hacen uso de membranas, cloroplastos, mitocondrias y microsomas, y mostraron una mejora en la estabilidad del sistema. Sin embargo, se disminuyó la especificidad y los tiempos de detección se elevaron respecto a los demás tipos de biosensores.

Por último, los inmunosensores se basan en anticuerpos, esto debido a la alta selectividad que tienen hacia sus antígenos. Por ello, este tipo de sensores se utilizan para la detección de patógenos o toxinas bien definidas, o bien para interactuar con componentes en específico del sistema inmunológico (Mehrotra, 2016).

Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de oro se han utilizado ampliamente para aplicaciones biológicas debido a su química simplista y sintonizable que proporciona la capacidad de controlar y modificar el tamaño, la morfología y la funcionalidad de la superficie (Singh, 2019). Típicamente, la generación de nanopartículas de oro requiere, como mínimo, ácido cloroaurico (HAuCl_4) como material precursor y un agente reductor para catalizar la nucleación reductiva. Las variaciones en la molécula del agente reductor, así como las condiciones de reacción (por ejemplo, pH, temperatura, tiempo de incubación) darán lugar a diferentes morfologías, tamaños y funcionalidades de las nanopartículas resultantes (Ashley, 2018).

Para aplicaciones biomédicas, estas variaciones en morfología, tamaño y funcionalidad están directamente correlacionadas con su internalización celular

(Singh, 2019), biodistribución, vida media biológica (Singh, 2019), secreción renal (Singh, 2019) y propiedades ópticas de plasmón (Elahi, 2018).

Debido a sus propiedades plasmónicas, las nanopartículas de oro son intrínsecamente terapéuticas, proporcionando contraste de imágenes a través de infrarrojo cercano (NIR) (Kumar, 2020), fluorescencia (Purohit, 2018), rayos-X (Chhour, 2017), fotoacústico (Han, 2019) y mejoramiento Raman (Jang, 2018). Por lo tanto, esta propiedad óptica plasmónica permite que las nanopartículas de oro actúen como un vehículo para mejorar las terapias ablativas tanto para la radiación fototérmica (Wang X. G., 2018), como para la radiación de rayos-X (Benton, 2018). Debido a las diferentes propiedades que han presentado, este tipo de nanopartículas son de especial interés en los estudios de la comunidad científica (Didóa C. A., 2018).

Síntesis de nanopartículas por el método de Turkevich

El protocolo de Turkevich es el método más confiable y popular para la síntesis de AuNP. El mecanismo admitido para la síntesis por el método de Turkevich radica en la reacción redox inicial (R1) en la que el citrato reduce el oro trivalente a oro monovalente, que a su vez se oxida en ácido acetonadicarboxílico (DC²⁻), la base conjugada de la dicarboxiacetona (DCA). Este primer paso redox se considera como el paso determinante de la velocidad. Y a su vez, la reacción de desproporción (R2) ocurre continuamente para producir oro metálico y oro trivalente (Gao, 2020).

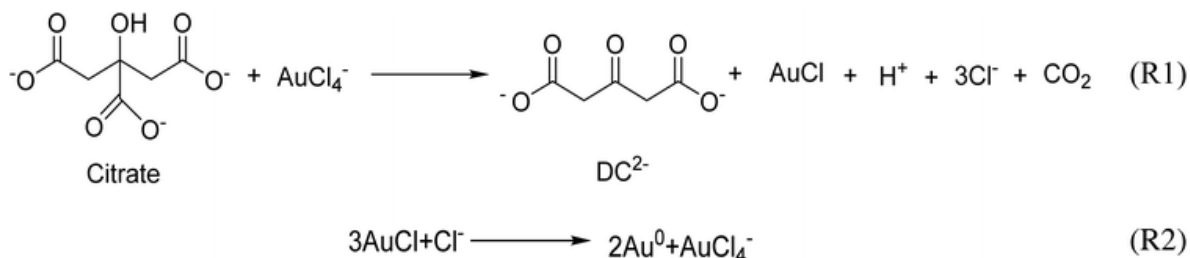


Figura 4. Reacción redox inicial (R1) y reacción de desproporción (R2) del método de Turkevich (Gao,2020).

Proteínas

Lectinas

Las lectinas son proteínas naturales ubicuas que reconocen y se unen específicamente a complejos de carbohidratos. La mayoría de las lectinas interactúan con los residuos de carbohidratos no reductores terminales de una glicoproteína o con componentes glicolípidos de la membrana celular. Varias lectinas se localizan en diferentes partes del organismo, dependiendo de su función. El término lectina se deriva de la palabra latina *legere* que significa elegir, escoger o seleccionar.

Los tipos de lectinas involucradas en procesos de reconocimiento y señalización en el sistema inmune, así como en programas vasculares son: a) Receptores lectina de tipo C, b) Lectinas de unión a ácido siálico y c) galectinas (Pinto, 2017).

La interacción de estas proteínas con las células puede ser inhibida en muchos casos por los azúcares, por lo que se puede concluir que se unen a los azúcares en la superficie celular, lo que proporciona a los investigadores marcadores útiles para estudios histoquímicos y de microscopía electrónica. membrana de plasma. Las lectinas conjugadas con etiquetas fluorescentes se usan comúnmente. PHA-L, PHA-E y las procedentes de *Pisum sativum* (PSA), *Triticum vulgare* (WGA), *Solanum tuberosum* (STL), *Arachis hypogae* (PNA), *Datura stramonium* (DSL), *Lens culinaris* (LCA) y *Griffonia simplicifolia* (GSL) (Hernández Díaz, 1999).

Por sus características únicas como sistemas de reconocimiento y por su afinidad a glicanos se han utilizado en diversas aplicaciones que incluyen el diagnóstico del cáncer, la administración de fármacos, los estudios inmunohistológicos, el análisis de bacterias patógenas, etcétera (Pihíková, 2015).

Lectina aglutinina de germen de trigo (WGA)

La aglutinina de germen de trigo (WGA) es una de las primeras lectinas purificadas extraídas al inicio del campo de la lectinómica. La estructura de WGA se describió durante la década de 1970. WGA es una mezcla de tres isoformas

principales estrechamente relacionadas, denominadas WGA1, WGA2 y WGA3, que son un homodímero de cadena polipeptídica de 18,0 kDa de tamaño estable de 36,0 kDa con simetría de doble eje (Balciunaite M., 2021).

WGA es una lectina de cereal que se une a la sialilactosa y su estructura cristalina proporciona información importante sobre cómo la lectina reconoce el ácido siálico. Varios enlaces de hidrógeno estabilizan el complejo. WGA tiene cuatro sitios de unión a carbohidratos funcionales, aunque dos de ellos no tienen afinidad detectable en solución.

Los monosacáridos estructuralmente no relacionados que poseen características topográficas similares a veces pueden unirse a la misma lectina. Por ejemplo, WGA reconoce *N*-acetilglucosamina, Neu5Ac y *N*-acetilgalactosamina (Dam, 2007).

De acuerdo con las características estructurales del ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y de la *N*-acetilgalactosamina (N-AcGln). Los grupos que ocupan la misma posición en el espacio están subrayados. Se observa similitud conformacional de *N*-acetilglucosamina y Neu5Ac en las posiciones subrayadas (acetamida e hidroxilo) de los anillos de piranosa cuando la molécula de ácido siálico se gira adecuadamente. La conformación de *N*-acetilgalactosamina en las posiciones relevantes es idéntica a la de *N*-acetilglucosamina (Dam, 2007; Lis H, 1998).

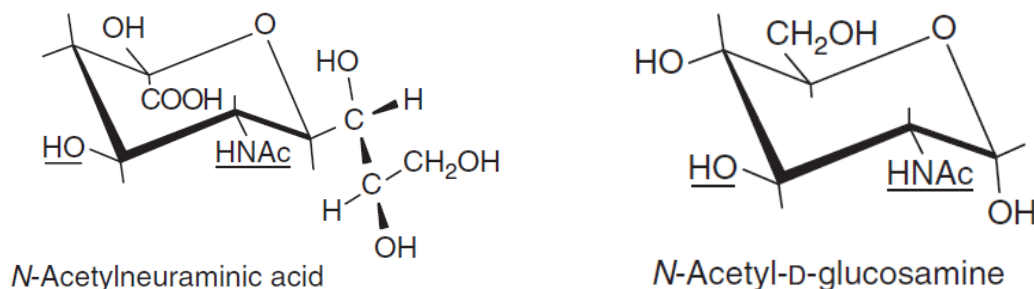


Figura 5. Características estructurales comunes de Neu5Ac y *N*-acetilglucosamina (Lis H, 1998).

Interacción Neu5Ac con WGA

En la interacción azúcar-lectina, el grupo carbonilo está unido por puente de hidrógeno al hidroxilo de Ser62 y su amida al carbonilo de Glu115. Además, forma de cinco a siete contactos de van der Waals con el anillo de fenilo de Tyr73. El hidroxilo del anillo adyacente (4-OH) está unido por puente de hidrógeno al hidroxilo de la misma tirosina y una molécula de agua ordenada. El grupo carboxilato de Neu5Ac está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno del hidroxilo de Ser114. Varios contactos de van der Waals estabilizan la orientación del anillo de azúcar a través de interacciones de apilamiento no polar con la cadena lateral aromática de Tyr66. Una tercera cadena lateral aromática, la de Tyr64, interactúa a través de contactos no polares con la cola de glicerol del Neu5Ac. Solo una molécula de agua parece estar involucrada en la estabilización del complejo lectina-azúcar. Está tetraédricamente coordinado por enlaces de hidrógeno con el 4-OH de Neu5Ac, la amida del esqueleto de Ser114 y el hidroxilo de Ser43.

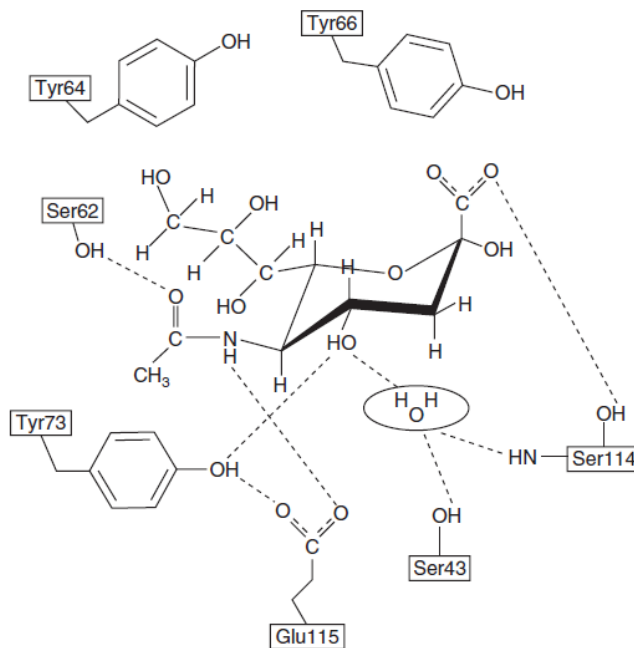


Figura 6. Representación esquemática de la interacción del ácido *n*-acetilneuramínico con la lectina Wheat Germ Agglutinin (Lis H, 1998).

Método para cuantificación de proteínas: Método del ácido bicinconínico (BCA)

Fue propuesto por primera vez en 1985 por Paul. K, Smith. El BCA es un método colorimétrico para detección y cuantificación de proteínas.

El ensayo de ácido bicinconínico (BCA) es un método colorimétrico comúnmente utilizado para estimar la concentración de proteína en las muestras. En este ensayo, los niveles de proteína se miden mediante la formación de un cromóforo púrpura Cu^{+1} (BCA) ($k_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$). En tubos de ensayo o placas de 96 pocillos, la relación entre la concentración de proteína y la absorbancia es casi lineal en un amplio intervalo de trabajo (0.02 a 2 $\mu\text{g/L}$). Sin embargo, el rendimiento del ensayo se reduce en formatos de volumen más pequeño, un fenómeno físico común en muchos ensayos colorimétricos. A pesar de estos problemas, a veces se prefieren los ensayos BCA a pequeña escala, por ejemplo, cuando las muestras biológicas son particularmente limitadas (Bainor, 2011).

El reactivo BCA reacciona con cisteína, triptófano, tirosina y con cada uno de enlaces peptídicos de una proteína. El reactivo BCA es estable en condiciones alcalinas, por lo que puede incluirse en la solución alcalina de cobre biuret. El ensayo se puede realizar a temperatura ambiente o se puede aumentar la sensibilidad a 60 °C. El ensayo es compatible con detergentes, lo que le da una ventaja sobre los ensayos de colorantes de Lowry y Coomassie (Goldring, 2019).

Cultivos celulares

Una línea celular es una población de células que pueden multiplicarse indefinidamente en condiciones de cultivo apropiadas. Su uso se remonta a 1951 cuando se describió el primer linaje, el famoso linaje HeLa. La American Type Culture Collection (ATCC) ofrece más de 2000 líneas celulares humanas de varios tejidos y morfologías. Debido a que estas células son muy accesibles y fáciles de manipular, se han convertido en una de las herramientas de investigación más importantes en los laboratorios de todo el mundo, contribuyendo significativamente

a nuestra comprensión de la biología celular y molecular fundamental, la patología y los desarrollos terapéuticos (E. Poletto, 2021).

MCF-7

MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama humano con receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides. Fue obtenida en 1970 por el Dr. Soul en la Michigan Cancer Foundation, Detroit, Michigan, de un derrame pleural en una mujer caucásica de 69 años con cáncer de mama metastásico (adenocarcinoma). Las células MCF-7 son útiles para estudios de mama in vitro porque conservan varias características del epitelio mamario, como el procesamiento de estrógeno en forma de estradiol por el receptor de estrógeno (ER) en el citoplasma (Camarillo, 2014).

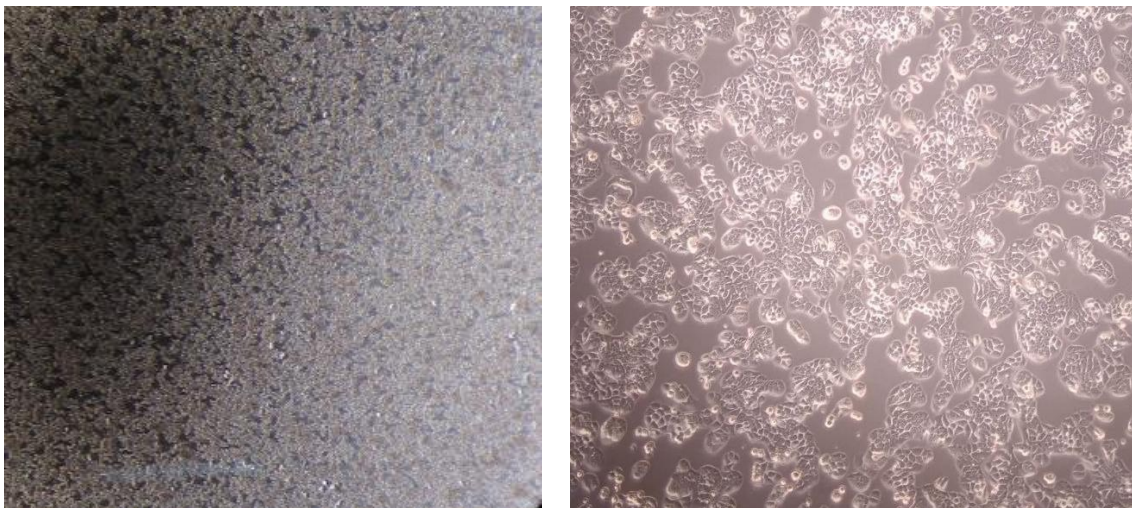


Figura 7. Morfología obtenida de las células Michigan Cancer Foundation 7.

MCF-12

Las células MCF-12A, desarrolladas originalmente por la Michigan Cancer Foundation, son células humanas no cancerígenas obtenidas de una cirugía de reducción mamaria en una mujer nulípara posmenopáusica de 63 años.

El tejido extraído de la mama donante reveló una enfermedad fibroquística no maligna que contenía hiperplasia intraductal adyacente al estroma denso. Las células supervivientes se expandieron y durante los siguientes 2 meses las

sublíneas MCF-12A (células adherentes) y MCF-12F (células flotantes) se mantuvieron por separado y se fijaron (Sweeney, 2018).

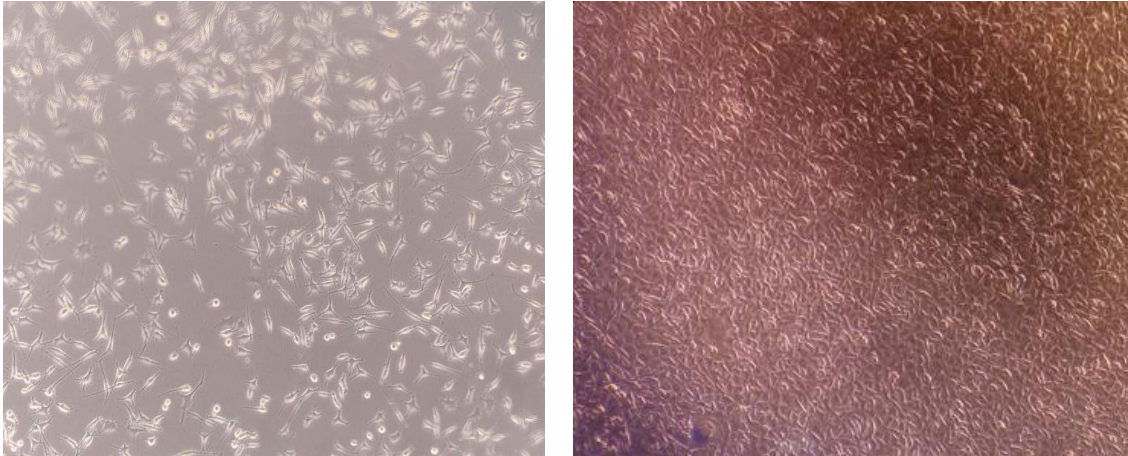


Figura 8. Morfología obtenida de las células Michigan Cancer Foundation 12.

Espectroscopía Raman

La espectroscopia Raman es una técnica analítica basado en la dispersión de luz inelástica puede proporcionar información bioquímica importante de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, ya que cada molécula tiene su propio patrón de vibraciones (huella molecular) (Kong K., 2015).

Posee una alta especificidad química y se puede obtener información molecular sin requerir una tinción o etiquetado. La espectroscopia Raman puede proporcionar información molecular en tiempo casi real e imágenes de alta resolución a un costo relativamente bajo en comparación con otras técnicas de imágenes médicas bien establecidas. Las señales Raman bajas a menudo han limitado la velocidad de la técnica (Kang, 2015).

Teoría del método Raman

El fenómeno de la dispersión de luz inelástica fue observado por primera vez de forma experimental en 1928 por Raman y Krishnan. En ese experimento se enfocó

con un telescopio la luz solar en una muestra que era un líquido purificado o un vapor sin polvo. Un segundo lente fue enfocado en la muestra y se recogió la dispersión radiada. Un sistema de filtros ópticos fue usado para mostrar la existencia de la radiación dispersada con una frecuencia alterada por la luz incidente.

Cuando la luz interactúa con la materia, los fotones que componen la luz pueden ser absorbidos, dispersados o no interactuar. Cuando la energía del fotón incidente coincide con la brecha de energía entre el estado fundamental de la molécula y el estado excitado, el fotón se puede absorber y la molécula pasa a un estado excitado con una energía más alta. Este cambio se mide en espectroscopia de absorción al detectar la pérdida de esta energía de emisión de luz. Sin embargo, un fotón también puede interactuar con una molécula y dispersarse.

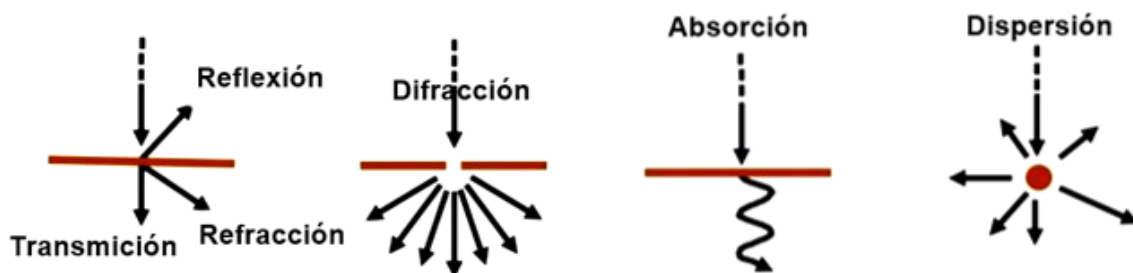


Figura 9. Los diferentes procesos fundamentales de la luz durante la interacción material.

El fotón no tiene por qué tener una energía que corresponda a la diferencia entre los dos niveles de energía de la molécula. Los fotones dispersos se pueden observar recolectando luz en un ángulo con respecto al haz de luz incidente, y mientras no haya absorción por una transición electrónica con una energía similar a la de la luz incidente, la eficiencia aumenta como la cuarta potencia de la luz.

Dado que en espectroscopia nos interesa la interacción de la radiación con los estados de la molécula en estudio, y esto suele discutirse en términos de energía, suele ser útil utilizar la frecuencia (ν) o número de onda (ω), que están relacionados linealmente con la energía. Las proporciones entre estas escalas se dan a continuación:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

$$\nu = \frac{\Delta E}{h}$$

$$\omega = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

En las ecuaciones anteriores nos indica que la energía es proporcional de la longitud de onda.

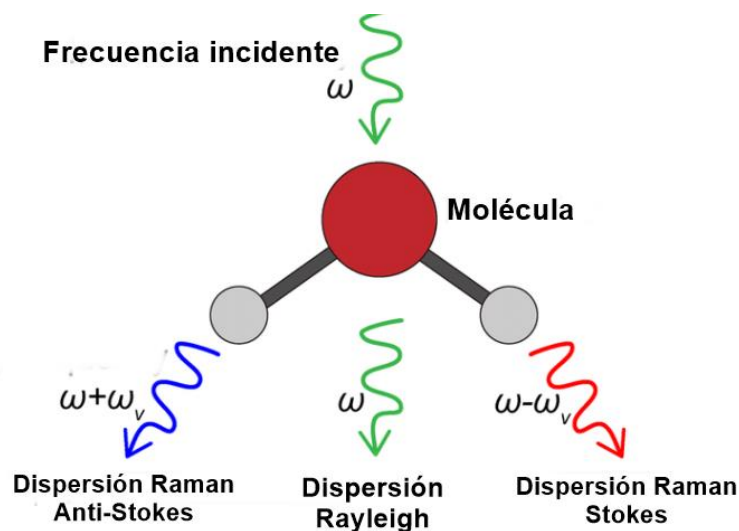


Figura 10. Diagrama de dispersión de Raman y Rayleigh (Lin, 2021).

La forma en que se emplea la radiación en las espectroscopias infrarroja y Raman es diferente. En la espectroscopia infrarroja, la energía infrarroja que cubre un rango de frecuencias se dirige a la muestra. La absorción se produce cuando la frecuencia de la radiación incidente coincide con la de una vibración, de modo que la molécula pasa a un estado vibratorio excitado. Entonces se detecta la pérdida de esta frecuencia de radiación del haz después de que pasa a través de la muestra. Por el contrario, la espectroscopia Raman utiliza una sola frecuencia de radiación para irradiar la muestra y es la radiación dispersada de la molécula, una unidad vibratoria de energía diferente del haz incidente, lo que se detecta. Por lo tanto, a diferencia de la absorción infrarroja, la dispersión Raman no requiere que la radiación incidente coincida con la diferencia de energía entre los estados

fundamental y excitado. En la dispersión Raman, la luz interactúa con la molécula y distorsiona (polariza) la nube de electrones alrededor de los núcleos para formar un estado de corta duración llamado " radiación con los estados de la molécula en estudio, y esto suele discutirse en términos de energía, suele ser útil utilizar la frecuencia (ν) o número de onda " .

Los cambios de energía que detectamos en la espectroscopia vibratoria son los necesarios para provocar el movimiento nuclear. Si solo la distorsión de la nube de electrones está involucrada en la dispersión, los fotones se dispersarán con cambios de frecuencia muy pequeños, ya que los electrones son comparativamente ligeros. Este proceso de dispersión se considera dispersión elástica y es el proceso dominante. Para las moléculas se llama dispersión de Rayleigh. Sin embargo, si se induce movimiento nuclear durante el proceso de dispersión, la energía se transferirá del fotón incidente a la molécula o de la molécula al fotón dispersado. En estos casos el proceso es inelástico y la energía del fotón dispersado es diferente de la del fotón incidente en una unidad de vibración. Esta es la dispersión Raman.

Dado que los estados virtuales no son estados reales de la molécula, sino que se crean cuando el láser interactúa con los electrones y provoca la polarización, la energía de estos estados está determinada por la frecuencia de la fuente de luz utilizada. El proceso de Rayleigh será el proceso más intenso ya que la mayoría de los fotones se dispersan de esta manera. No implica ningún cambio de energía y, en consecuencia, la luz vuelve al mismo estado de energía. El proceso de dispersión Raman desde el estado vibratorio fundamental m conduce a la absorción de energía por parte de la molécula y su promoción a un estado vibratorio excitado de mayor energía (n). Esto se llama dispersión de Stokes. La dispersión de estos estados al estado fundamental m se denomina dispersión anti-Stokes e implica la transferencia de energía al fotón disperso. Las intensidades relativas de los dos procesos dependen de la población de los diversos estados de la molécula (Smith E. &., 2005).

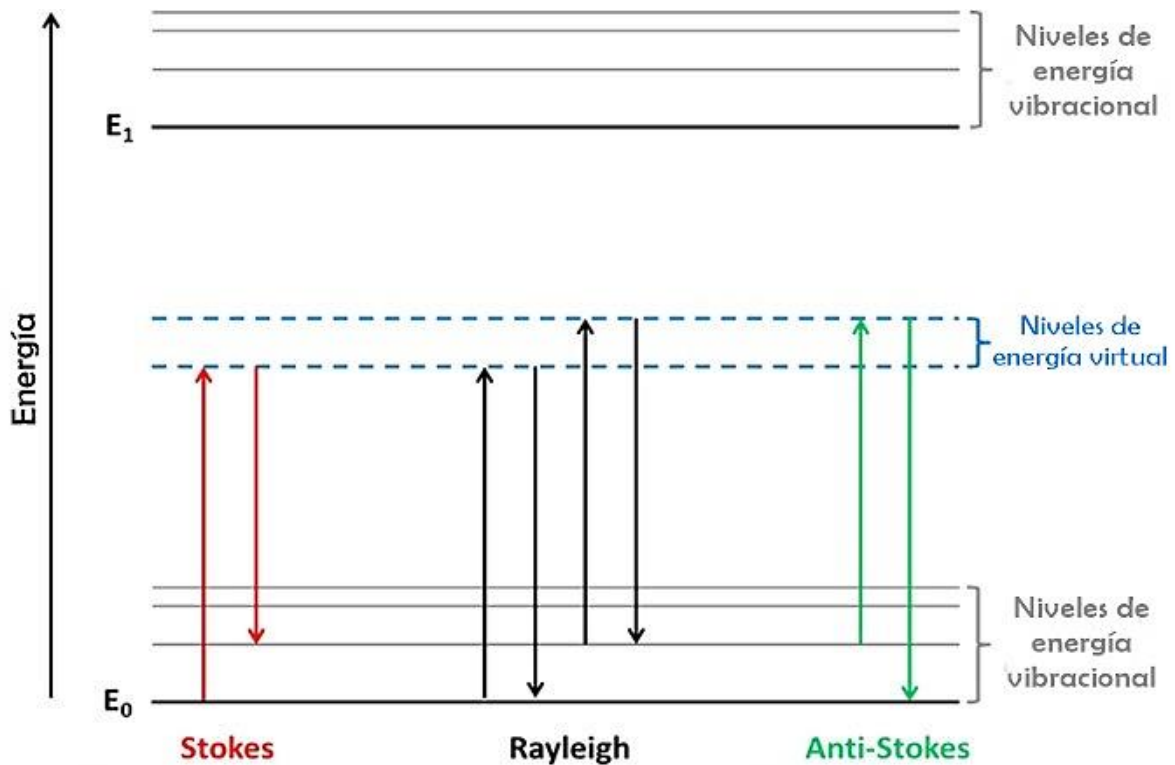


Figura 11. Diagrama de los procesos de dispersión de Rayleigh y Raman (Ember, 2017) .

Espectroscopía Raman con superficie mejorada (SERS)

La espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) fue descrita por primera vez en 1974, cuando Fleischman et al. informaron una fuerte dispersión Raman de la piridina adsorbida de una solución acuosa en un electrodo de plata grueso como resultado de ciclos redox sucesivos. Los autores atribuyeron este efecto a un aumento significativo en el área superficial del electrodo como resultado del proceso de rugosidad, lo que permitió que se adsorbieran más moléculas de piridina en la superficie. Sin embargo, Ginmari, Van Duijn, Albrecht y Creighton demostraron que la intensidad no solo se debió al aumento de área. Descubrieron que el aumento probable en la intensidad de la rugosidad de la superficie sería inferior a un factor de 10 y la mejora resultante sería de unas 10^6 .

El método SERS consiste en inducir un incremento de la señal de dispersión Raman de las moléculas que se encuentran en contacto con superficies metálicas

rugosas o con nanoestructuras. Este incremento se explica mediante la resonancia de los electrones del metal con el campo eléctrico de la luz del láser incidente, actuando en forma localizada sobre las moléculas de la muestra en contacto o en regiones muy cercanas al metal (Varela-Fonseca S., 2019).

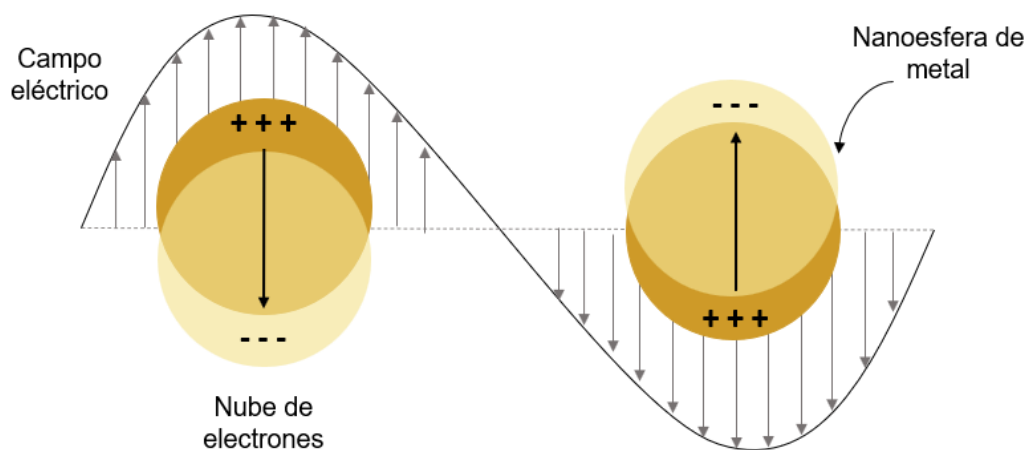


Figura 12. Esquema de resonancia de plasmón de superficie.

La intensidad del SERS para un determinado modo de vibración de un determinado analito también debe ser proporcional a la intensidad del láser y a la sección Raman normal, pero afectada por un factor de mejora (EF, Enhancement factor). Los factores de mejora del SERS se dividen tradicionalmente en dos contribuciones multiplicativas principales:

- El factor de mejora electromagnético. Es causado principalmente a un conjunto de ondas de electrones oscilantes en el sustrato, típicamente observado con sustratos abundantes en electrones libres, como los metales Ag, Ag y Cu, y que pueden generar resonancia de plasmones de superficie localizada (LSPR) tras la excitación. Para beneficiarse de estos, la molécula debe entonces estar muy cerca de la superficie (normalmente dentro de ≤ 10 nm de la superficie). En la mayoría de las implementaciones, la molécula se adsorbe directamente en la superficie, ya sea por fisisorción o quimisorción.

Las mejoras electromagnéticas tanto del láser incidente como de la luz de dispersión Raman son la fuente de este aumento del campo electromagnético. El primero es una mejora del campo local cercano a las NP plasmónicas a la frecuencia incidente resonante, y el segundo es una mejora adicional de la luz dispersada Raman cuando la frecuencia coincide con la resonancia del plasmón (Cong, 2020; Le Ru, 2008).

- El factor de mejora químico. Se ve como una modificación de la polarización electrónica de la sonda, que puede inducir dispersión resonante-Raman a longitudes de onda donde las moléculas no adsorbidas no serían resonantes. En donde la molécula se adsorbe químicamente en la superficie (Le Ru, 2008).

Justificación

La espectroscopia Raman es una poderosa técnica analítica que puede medir la composición química de muestras biológicas complejas, como biofluidos, células y tejidos. La espectroscopia Raman refleja la huella molecular de una muestra y proporciona información cuantitativa sobre su composición química (Kong L., 2014; Camp C.H., 2014).

Los cambios bioquímicos en las células y tejidos que pueden ser o son la causa de la enfermedad pueden provocar cambios significativos en los espectros Raman. El potencial de la espectroscopia Raman radica en su capacidad para detectar dichos cambios bioquímicos a nivel molecular y, por lo tanto, ser útil para el diagnóstico, pronóstico o como herramienta para evaluar nuevas terapias (Langer, 2019).

La espectroscopia Raman tiene varias características que son ventajosas para el diagnóstico médico. Tiene alta especificidad química y la información molecular se puede obtener sin necesidad de tinción o etiquetado. Los cambios en la composición molecular de las muestras biológicas medidos por la espectroscopia Raman se pueden utilizar para construir modelos de calibración y clasificación multivariados, que permiten el diagnóstico cuantitativo y objetivo para pacientes independientes (Langer, 2019; Camp C.H., 2014).

Uno de los principales inconvenientes de la espectroscopia Raman, que hasta ahora ha limitado en parte su traslado a la clínica, es la eficiencia relativamente baja de la dispersión de luz inelástica en comparación con la dispersión elástica, la emisión de fluorescencia o la absorción de luz infrarroja. Las señales débiles de Raman a menudo han limitado la rapidez en el análisis mediante esta técnica. Los compromisos para reducir los tiempos de adquisición pueden disminuir la precisión del diagnóstico cuando los espectros se adquieren con insuficientes relaciones de señal- a -ruido (Kong L. 2014).

Sin embargo, recientemente se han desarrollado nuevas estrategias para superar esta limitación: métodos de imagen basados en dispersión Raman no lineal,

integración multimodal y microscopía Raman selectiva, la utilización de nanomateriales y estructuras fotónicas para amplificar señales Raman, sondas de fibra óptica para dispositivos de diagnóstico portátiles y endoscopios, compensación de habitación y sondas de aguja para diagnósticos de fondo y profundidad. Estos desarrollos han dado pasos importantes para incrementar la precisión y la velocidad del diagnóstico y, a menudo, se basan en soluciones de bajo costo que probablemente sean adoptadas por los proveedores de atención médica (Xu, 2015).

Por estas razones, este proyecto de tesis tiene como propósito el desarrollo de un material híbrido a partir de nanopartículas de oro y biomoléculas de lectina funcionalizadas. Por un lado, mejorar la calidad del espectro por AuNP y, por otro lado, mejorar la selectividad del material por la especificidad del azúcar ácido *N*-acetilneuramínico y por lo tanto un biomarcador de células cancerosas. Desarrollando la estructura híbrida, la detección de cáncer mediante la discriminación de las células por medio de la NANA a través de un método simple y de menor costo.

Descripción del problema

La ganancia en la espectroscopia Raman mejorada por superficie (SERS) depende de las propiedades del sustrato, como su tamaño (que oscila entre 10 y 100 nm), la forma y composición del tipo de metal (que afecta el mecanismo electromagnético) y el analito sola (afectando el mecanismo químico) (Camp C.H., 2014; Xie, 2012; Langer, 2019).

Entre los diversos metales activos empleados en SERS, la plata y el oro son los de mayor uso, ya que muestran las mayores mejoras. Sin embargo, se prefiere el uso de oro debido a su biocompatibilidad, toxicidad casi nula y mayor estabilidad, especialmente en el campo biológico. A pesar de que los índices de aumento de señal con respecto a las de plata es mucho menor (Xie, 2012).

También se han utilizado técnicas de biorreconocimiento como SERS para ensayos basados en el uso de anticuerpos marcados con otras biomoléculas; sin

embargo, existen limitaciones como el alto costo de los anticuerpos y las duras condiciones de almacenamiento que reducen su viabilidad. En condiciones de almacenamiento y transporte, los anticuerpos que quieran actuar como sensores biomoleculares deben considerar el uso de otros materiales para lograr la reducción de las limitaciones mencionadas (Kong K., 2015).

Por estas razones, en este trabajo de investigación, se propone un arreglo estructural de las AuNP con una lectina que es la WGA y se espera la generación un patrón espectroscópico de la NANA gracias a la presencia de oro coloidal en forma de nanopartículas de oro, las cuales servirán para aumentar las señales Raman de su entorno para su posible aplicación en células cancerosas.

Hipótesis

La propiedad de las nanopartículas de oro, resonancia de plasmón superficial, con una superficie recubierta de la lectina *wheat germ agglutinin* presentará una capacidad para discriminar, mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada, su acoplamiento con el azúcar ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico).

Objetivo General

Desarrollar estructuras híbridas, constituidas de nanopartículas de oro decoradas con la lectina *wheat germ agglutinin*, con capacidad para discriminar, mediante la espectroscopía Raman de superficie mejorada, muestras que contengan ácido *N*-acetilneuramínico.

Objetivos particulares

1. Sintetizar nanopartículas de Oro mediante el método de Turkevich.
2. Desarrollar la metodología experimental para obtener nanopartículas de oro con corona de lectina WGA.
3. Evaluar la capacidad de la estructura obtenida para discriminar, mediante espectroscopía Raman de superficie mejorada, muestras de azúcares y /o células que contengan ácido siálico.

Metodología

Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich

Se sintetizaron 15 mL de nanopartículas por el método de Turkevich, para obtener una concentración de oro de 0.5 mM. Para lo cual, se colocó en un vial un volumen de 3 mL de ácido cloroáurico monohidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 2.5mM, y la solución se llevó a punto de ebullición $\sim 90^\circ\text{C}$ en agitación constante. Una vez alcanzado el punto de ebullición se añadió por goteo 0.75 mL de una solución de citrato de sodio al 1% preparado al momento y se incubó por 10 min aproximadamente hasta que el sistema comience a cambiar de una tonalidad transparente a un rojo oscuro. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se esterilizó con ayuda de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ de porosidad y se dejó almacenado en refrigeración. Un esquema del procedimiento de síntesis se presenta en la figura 13.

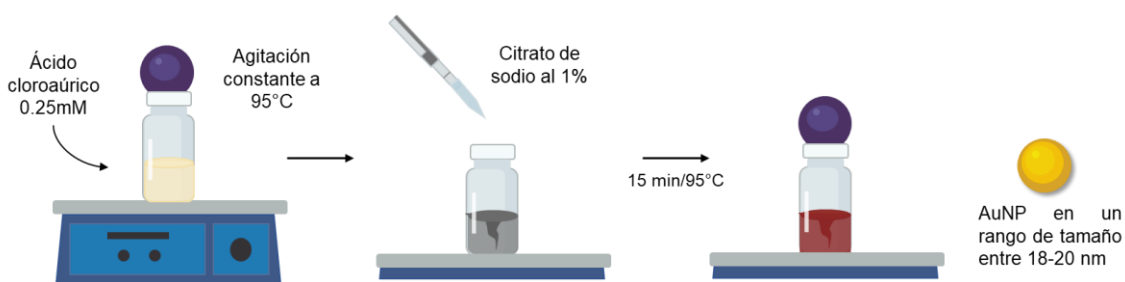


Figura 13. Esquema de la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.

Adherencia de la corona dura en las AuNP

La lectina fue activada disolviendo en PBS 1X a 1mg/mL y almacenada a -20°C . Se realizaron diferentes híbridos AuNP@WGA 1:1, 10:1 y 5:1 vol/vol. Se incubó la WGA con las nanopartículas en agitación constante a 4°C por 48 horas.

Remoción de corona suave

Posteriormente a la incubación, se realizaron lavados para retirar la proteína que no se adhirió fuertemente a las nanopartículas, también llamada corona suave. Se

realizaron 3 lavados centrifugando a 13,000 rpm, 4 °C por 45 minutos en una microcentrífuga refrigerada (Sigma 1-14k). El sobrenadante se removió con una micropipeta, almacenando el primer sobrenadante para posteriores análisis. Finalmente, la muestra se dispersó en una solución de PBS 1X y se dejó incubando por 48 horas. En la figura 14 se exhibe un esquema con el procedimiento de adhesión y remoción de la lectina.

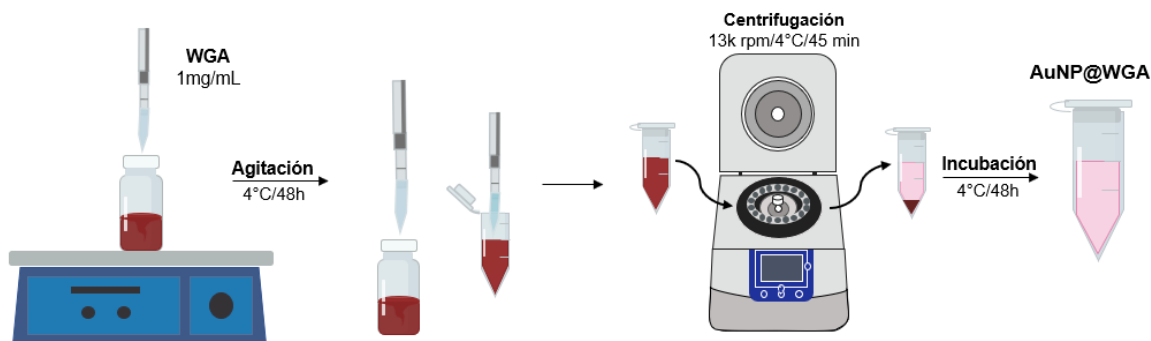


Figura 14. Esquema del proceso de adherencia de la corona dura y la remoción de la corona suave.

Cultivos celulares MCF-7 & MCF-12

Primero, las líneas celulares almacenadas a -70°C se descongelaron y se les añadieron 10 mL de DMEM completo, precalentado en una caja de cultivo, y se dejó incubando a 37°C.

Para realizar pases celulares, se retiró el medio de cultivo y luego se lavó suavemente con PBS 1X para eliminar el suero residual en la placa de Petri. Luego se añadió TripLE, se incubó durante 5 minutos a 37 °C y se observó bajo un microscopio invertido para ver si las células flotaban. Luego se agregaron 8 mL de medio completo, se aspiró cuidadosamente y se colocó en un tubo de centrifuga Falcon a 2500 rpm durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 4 mL de medio completo para conteo en cámara de Neubauer. Luego de obtener el número de células deseado, se ajustó la densidad celular con el fin de realizar el pase.

Caracterizaciones

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras fueron depositadas en rejillas de cobre con una película de carbono (Formvar, Ted Pella Inc.), colocando 4 μL y dejándose secar en una campana de flujo laminar. Posteriormente, se añadió un medio de contraste, consistente en una solución de acetato de uranilo al 2% y se observaron con un microscopio JEOL JEM 2000FX FASTEM. Esta técnica permitió obtener información acerca de la morfología y tamaño de las AuNP dispersas, además del arreglo de la lectina en la superficie de las nanopartículas.

Espectroscopía Raman

Los espectros vibracionales de los enlaces moleculares debido a la presencia de las proteínas de lectina adheridas en las nanopartículas de oro, como caracterización complementaria, se realizó la espectroscopía micro Raman, utilizando un micro espectrómetro comercial (modelo Dilor Labram equipado con un láser He-Ne de 20 mW que emite a 632.8 nm, y un filtro holográfico de Kaiser Optical Systems, Inc. (modelo SuperNotch- Plus) y de igual manera, se utilizó el Microscopio Raman Confocal Senterra marca Bruker, provisto de un láser que emite a 785 nm.

Preparación de cultivos para observación en espectroscopía Raman

Con respecto a la obtención del SERS con cultivos celulares, se diseñó un método para su análisis y comparación con respecto a los azúcares. Este método consistió en cultivar células sobre portaobjetos con aluminio. Para que esto fuera posible se añadió una película de poli-*D*-lisina en la superficie del aluminio, la cual se dejó incubar 24 horas previas.

Para optimizar el cultivo, se realizaron pruebas previas con cantidades diferentes de células, utilizando tres diferentes cantidades de células como se muestra en la figura 15.

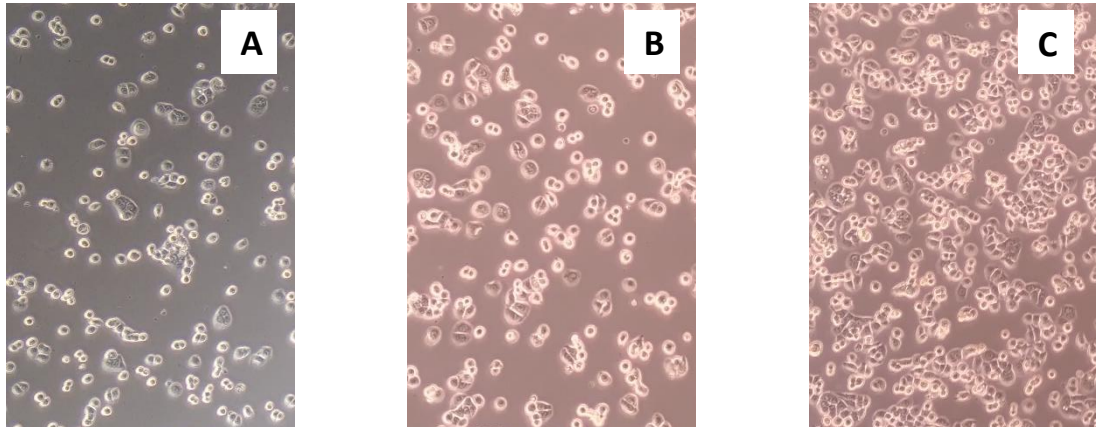


Figura 15. Cultivos celulares de MCF-7 donde A son 3 millones de células, en B son 4 millones de células y 5 millones de células.

De acuerdo con el crecimiento de este tipo de células, se determinó también el tiempo necesario previo a la realización del Raman. Una hora previa a su análisis, las nanopartículas híbridas fueron añadidas para observar su comportamiento sobre portaobjetos a fin de obtener su espectro SERS. Este proceso fue de relevancia ya que se deseaba evaluar células activas, sin ningún fijador tal como el paraformaldehído que pudiera influir en la conservación de grupos químicos a identificar.

Espectroscopía Ultravioleta visible (Uv-vis)

La espectroscopía UV-vis se realizó con la finalidad de determinar tanto el plasmón superficial como el estado electrónico de las AuNP. Los espectros se registraron en el rango de 300–800 nm a temperatura ambiente, utilizando un espectrómetro GENESYS™ 10S UV/Vis de la marca Thermo Scientific.

Cuantificación de proteínas

La eficiencia de adherencia de la proteína lectina en las nanopartículas de oro se calculó a partir del análisis del material no adherido de lectina en el sobrenadante, analizando por espectrofotometría UV en un equipo Nanodrop 1000.

Método del ácido bicinconónico (BCA)

El Reactivo de Trabajo (WR) se preparó mezclando una solución de Cu^{2+} al 4% y 4,9 mL de una solución de BCA. Mezclar bien hasta obtener una solución verde transparente. A continuación, se preparó una solución madre de albúmina de

suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/mL en solución salina isotónica (0,9% NaCl). Se realizaron diluciones seriadas de BSA añadiendo la solución madre de BSA y agua a tubos Eppendorf que tendrían las siguientes concentraciones: 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/mL.

Realizado lo anterior, se procedió a agregar 10 μ L de cada solución estándar o solución problema por triplicado seguido de 200 μ L de reactivo WR a cada pocillo. Se cubrió con aluminio, se agitó en un agitador orbital durante 1 min y se incubó a 37°C durante 30 min. Se dejó enfriar durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 562 nm (Smith P. E., 1985).

Resultados y Discusión

Nanopartículas de Oro

Se sintetizaron nanopartículas de oro por el método de Turkevich y se caracterizaron de la siguiente manera para su pronta adhesión de las proteínas conocidas como lectinas WGA.

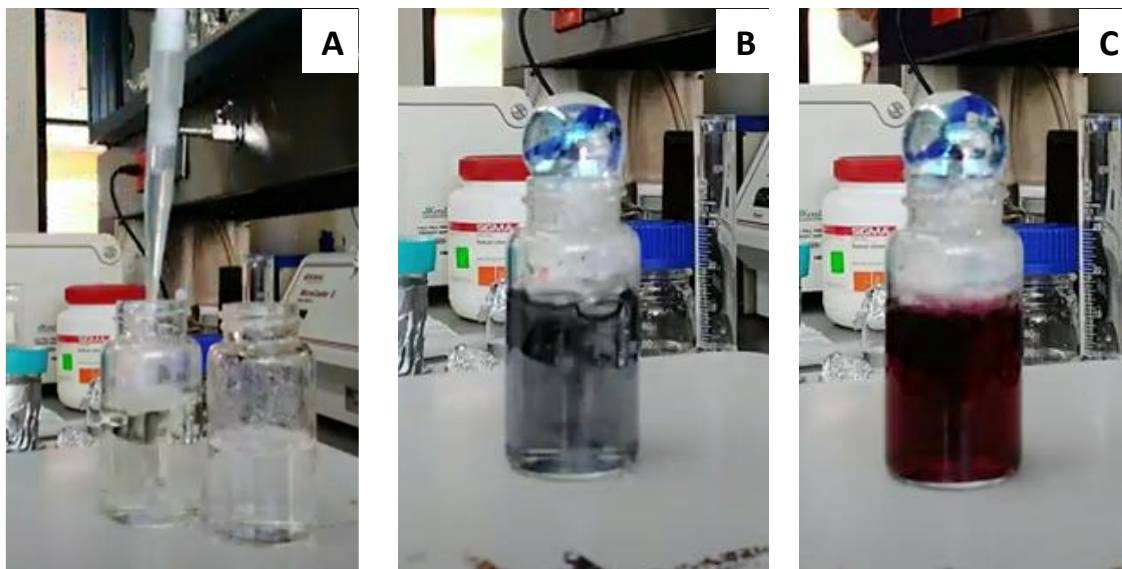


Figura 16. Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich en donde A se encuentra una solución de precursor de oro donde se le añadió un agente reductor; en B la solución se comienza a formar las semillas y en C han crecido para generar partículas con un tamaño de 15-20 nm.

UV-visible

De acuerdo con lo reportado en la literatura abierta, las nanopartículas obtenidas por este método de síntesis presentaron un tamaño de 15 a 20 nm. Las nanopartículas de oro se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis para evaluar si el plasmón de superficie era el esperado para este tamaño, forma, así como para monitorear su estabilidad.

En la figura 17A se puede visualizar la presencia del plasmón superficial que tienen presentes las nanopartículas de oro al ser incididas con luz verde, dando como resultado una señal máxima de 520 nm. Dicho valor de λ de máxima absorción se mantuvo estable conforme avanzaban los meses, para comprobar si se mantenía la resonancia del plasmón superficial a la misma longitud de onda. Esta absorbancia es compatible con un tamaño entre 15 a 20 nm y con una morfología esférica, pero se requiere de un análisis por microscopía electrónica de transmisión para confirmarlo.

Los espectros de UV-vis (en el rango de 300 a 800 nm) se exhiben en la Figura 17 A. Para todos los espectros, se puede identificar la presencia del plasmón superficial que manifiestan las nanopartículas de oro, al ser incididas con la luz visible, dando como resultado una señal característica con un máximo centrado en aproximadamente 520 nm. Este valor se mantuvo conforme avanzaban los meses, sin embargo, se presentó una ligera disminución en la intensidad de la absorbancia en unos meses. Las posiciones de los plasmones superficiales y la forma de las curvas, en acuerdo con lo reportado en la literatura, indican que las nanopartículas de oro poseen un tamaño alrededor de 15-20 nm y con morfología esférica. En la figura 17 (B), se observa la imagen obtenida en el TEM en donde las AuNP también se encuentran en el rango de tamaño anteriormente mencionado y presentan una morfología cuasi esférica.

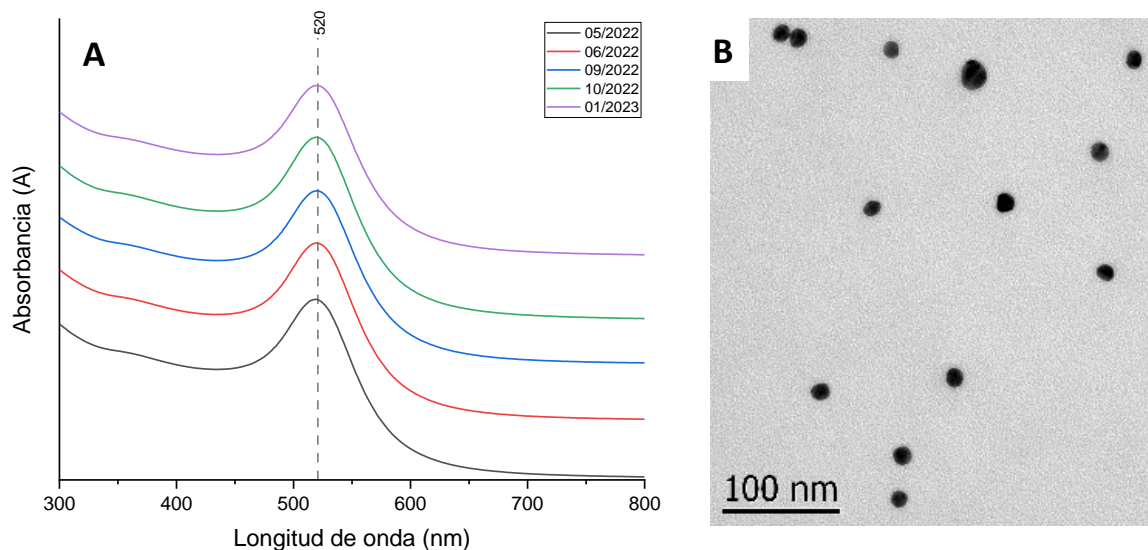


Figura 17. A Curvas de absorción en el espectro visible de las Nanopartículas de Oro obtenidas por el método de Turkevich en donde la línea negra es la primera curva obtenida y esta va incrementando hasta llegar a la línea morada que es la más reciente; B Imagen obtenida del TEM de las nanopartículas de oro.

Formación de corona de lectina sobre AuNP

Debido a que las nanopartículas de oro presentan un mayor número de átomos superficiales al entrar en un medio con proteínas, las NP experimentan procesos como agregación, corrosión, disolución e interacción. La corona “suave” consiste en proteínas abundantes y móviles que recubren la superficie de la nanopartícula, sin embargo, presentan interacciones débiles y dinámicas, estableciendo un equilibrio temporal entre las proteínas unidas y no unidas en solución. Pasando el tiempo, el equilibrio de adsorción se desplaza hacia la unión de proteínas con mayor afinidad por la superficie de las NP, modificando la composición inicial de la corona dando como resultado una corona “dura”. Además, mediante mecanismos de estabilización termodinámica, como el reordenamiento conformacional y efectos de hacinamiento, endurece la capa de proteínas y la lleva a un estado de energía mínima constante e irreversible (Barbero, 2017).

Considerando lo anterior, es indispensable la formación de la corona “dura”, la proteína fuertemente adherida, a causa de que tiene una mayor estabilidad en

comparación con la corona “suave” con interacciones más débiles presentes. Al contar con un híbrido estable, se puede inducir el efecto SERS con los azúcares que reconocen la lectina WGA y amplificando su señalización por el efecto presente del plasmón superficial de las nanopartículas de oro a ≤ 10 nm.

La construcción de la corona “dura” se formó mediante la fisisorción, la cual mediante enlaces de Van der Waals a partir de interacciones con los dipolos eléctricos y a su vez, es posible por la energía que presenta la superficie de las nanopartículas de oro. Además, se removió la corona “suave” que no interacciona con las AuNP mediante la precipitación de la estructura híbrida por centrifugación y lavados.

Para confirmar la obtención de la estructura híbrida, se realizó una espectroscopía ultravioleta visible la cual permite visualizar la presencia de proteína a partir de la banda de absorbancia de la muestra. La formación de la corona “dura” en las AuNP se evidencia por los cambios como el corrimiento de la banda o la disminución de la absorbancia. No obstante, se requieren de otros métodos de caracterización complementarios para estudiar la interacción de la estructura híbrida (Antosiewicz, 2016).

En la Figura 18, se presenta el espectro en Uv-vis de las AuNP con la lectina adsorbida en su superficie. En ella se puede observar la presencia de una banda con un máximo en aproximadamente 523 nm con mayor amplitud en comparación con las bandas observadas en la Figura 17. Este resultado podría indicar que ha ocurrido un crecimiento en el tamaño de las AuNP, que se podría deber efectivamente a la presencia de las moléculas de lectina que se encuentran recubriendo la superficie de las AuNP. Además, a pesar del recubrimiento de las AuNP con las moléculas de lectina, el plasmón superficial de la AuNP se puede observar claramente. Sin embargo, se requiere de comprobación por medio de TEM para descartar la presencia de otro sistema ajeno a lo anteriormente mencionado o la posible pérdida de la estabilidad a como consecuencia de la aglomeración de las partículas por contaminación u otro factor.

En el caso de la Figura 18, se muestra el análisis de nanopartículas de oro y WGA, luego de su incubación.

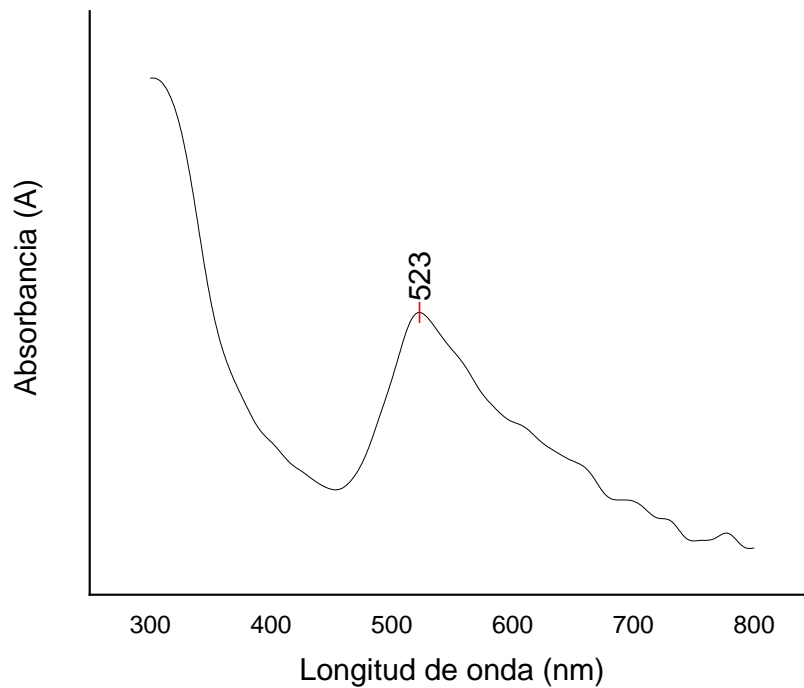


Figura 18. Curvas de absorción en el espectro visible de las Nanopartículas de Oro con la lectina WGA.

Espectro de absorción de la proteína WGA

Las proteínas pueden presentar una absorción UV en el rango de 180-230 nm, las cuales se deben a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos benceno en las cadenas R de triptófano, tirosina y fenilalanina, además de enlaces disulfuro alrededor de 260 nm (Antosiewicz, 2016). En la figura 19, se muestra el espectro de absorción en el espectro visible de la lectina WGA. El espectro de la lectina exhibió dos bandas importantes centradas aproximadamente en 228 nm y 272 nm que concuerdan con la literatura.

De igual manera, al examinar nanopartículas de oro y WGA, los resultados obtenidos mostraron la presencia de una gran cantidad de ruido, además de que la intensidad era muy reducida.

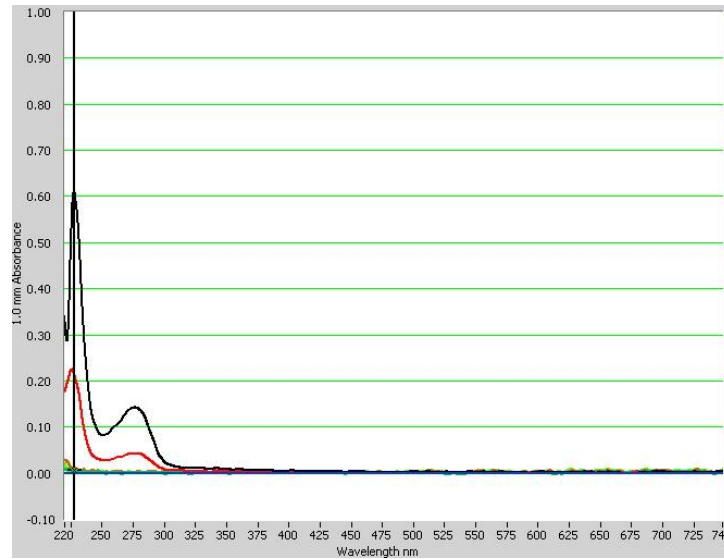


Figura 19. Curvas de absorción en el espectro visible: WGA 1mg/mL y rojo: WGA 0.85 mg/mL.

Por lo tanto, al no visualizarse con los espectros obtenidos para confirmar la presencia de la lectina en la estructura, se optó por la realización de métodos de cuantificación de proteínas.

Método del ácido bicinonónico (BCA)

Las nanopartículas de oro al interactuar con la lectina WGA, mediante fisisorción, presentan la llamada de corona dura. De igual manera, en el proceso se presentan proteínas con adherencia muy débil o nula, conocidas como corona suave. La corona suave al encontrarse suspendida en la solución puede provocar una interferencia y se separa mediante la centrifugación donde el sedimento es la estructura híbrida y el sobrenadante es la proteína no adherida a las AuNP.

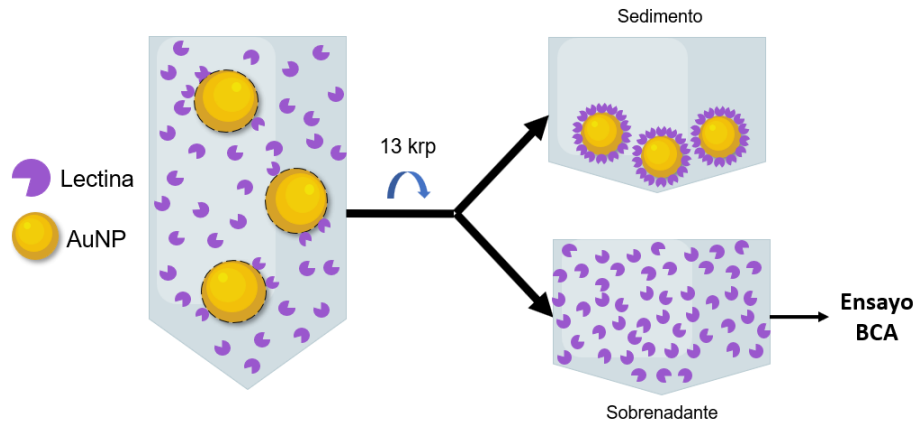


Figura 20. Diagrama de remoción de la corona suave de las nanopartículas de oro con la corona dura.

Se generó una curva de cuantificación de proteína mediante la adición de ácido bicinonínico a 526 nm en la muestra a diferentes concentraciones de BSA, y a partir de la curva obtenida se determinaron datos de concentración obtenidos del sobrenadante a diferentes concentraciones de lectina que no se adhirió.

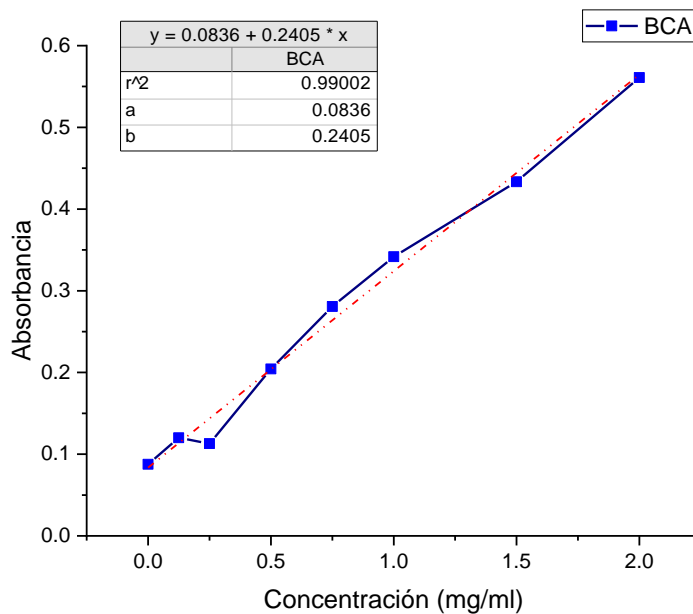


Figura 21. Curva de ensayo de BCA obtenidas por el método de ácido bicinonínico.

Y a partir de la ecuación de una recta obtenida por la proteína estándar, podemos obtener la concentración de las soluciones de los sobrenadantes de las muestras

a diferentes concentraciones de la lectina, dándonos como resultado la siguiente tabla:

Tabla 1. Concentración resultante de los sobrenadantes obtenidos de la síntesis de adherencia de la lectina.

Descripción	Absorbancia	Concentración (mg/mL)
AuNP@WGA 1:1	0.407	1.343
AuNP@WGA 10:1	0.150	0.277
AuNP@WGA 5:1	0.158	0.308

De acuerdo con la tabla anterior, en la estructura híbrida al incubar AuNP@WGA en proporciones 1:1, se genera una cantidad de corona suave en exceso, que es difícil de eliminar, mientras que la reducción de la cantidad de lectina al usar proporciones 5:1 y 10:1, no presenta una diferencia notable. Estos resultados sugieren que las AuNP@WGA obtenidas al usar una proporción 10:1, quedan por debajo de la cantidad necesaria para la formación de corona dura. Para comprobar lo anterior se requiere de su caracterización en TEM.

Microscopía electrónica de Transmisión

En la figura 22 (A) se observan nanopartículas con morfología cuasi esférica y mediante la obtención del promedio del tamaño de las nanopartículas por medio de la microscopía, tiene un tamaño aproximado de ~16 nm de diámetro que concuerda con el tamaño previamente estimado por el plasmón de 520 nm. Además, a partir de las estructuras híbridas se observó un incremento de diámetro a ~20 nm, indicando la absorción de la lectina en la superficie de la nanopartícula.

Se obtuvieron imágenes de TEM que se pueden visualizar en la figura 22 (C, D y E), donde se puede observar las nanopartículas de oro obtenidas por el método de Turkevich, con la lectina WGA adherida luego de su incubación a diferentes concentraciones. En algunas de estas muestras existen residuos de lectina que no se eliminaron en los lavados. Cabe mencionar que, para poder observar

estructuras poco densas como lo son las proteínas se les añadió contraste con acetato de uranilo. Se puede distinguir la presencia de excedente de proteína y este factor depende de la concentración de proteína añadida. Inclusive en la figura 22 (E) la densidad de WGA es tan grande, que se encubren las nanopartículas. En cambio, presenta una capa menos densa que rodea la nanopartícula de oro cuando la proporción AuNP@WGA es 10:1 (Figura 22 D).

En la figura 22 (E), la estructura híbrida AuNP@WGA 5:1 sin remoción de la corona suave, se observa una capa de proteína presente alrededor de las nanopartículas. Aunque es indispensable la extracción de la proteína que no se adhirió ya que reduce la eficiencia en la espectroscopía de superficie mejorada.

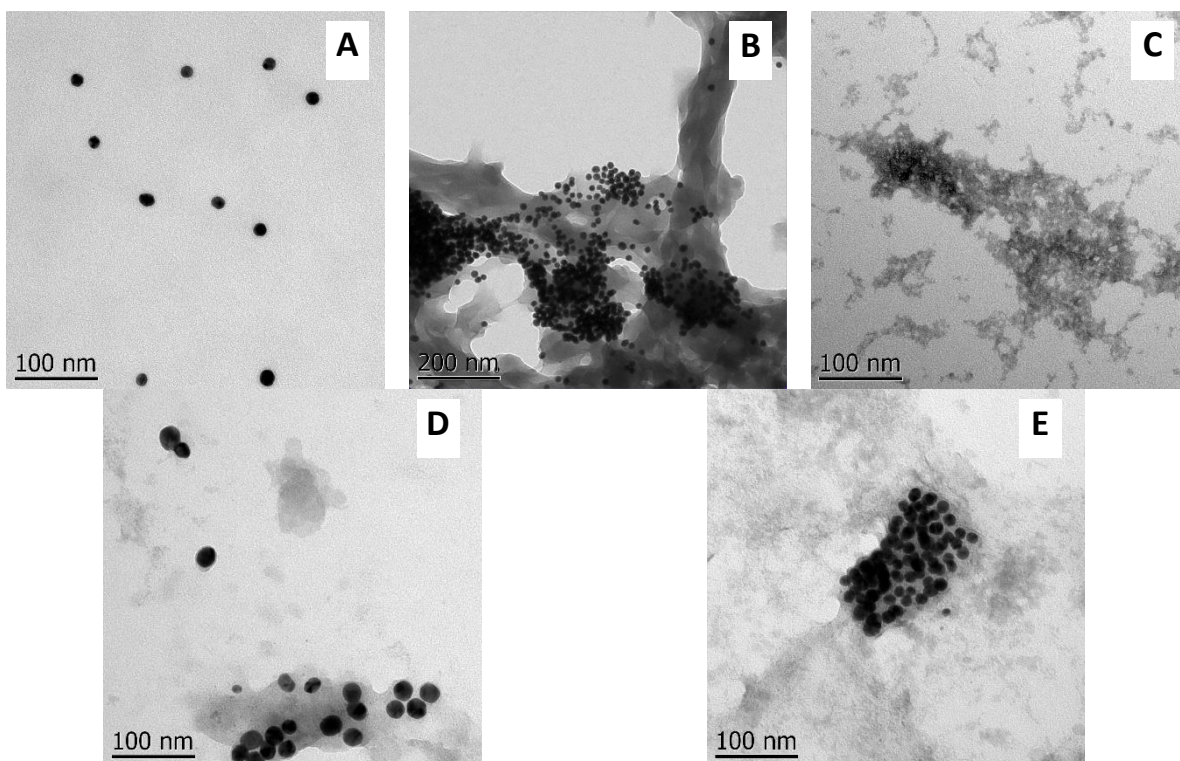


Figura 22. Imágenes obtenidas del TEM donde A son las nanopartículas de oro; B es AuNP@WGA 5:1 sin lavados; C es la estructura híbrida AuNP@WGA 1; D es la estructura híbrida AuNP@WGA 10:1 y E es la estructura híbrida AuNP@WGA 5:1.

Espectroscopía Raman

Señales Raman del híbrido obtenido AuNP@WGA

Primeramente, se efectuó la obtención de los espectros Raman de la estructura híbrida a diferentes concentraciones, así como las proteínas para confirmar su amplificación de las bandas características y de igual modo discernir cuál de las concentraciones entre nanopartículas de oro y la WGA son las más indicadas para trabajar. Las muestras presentaron una gran cantidad de ruido y esto puede deberse a la intensidad del láser, para todas las muestras se utilizó una potencia eléctrica de 10 mW. Esto debido a que al utilizar una magnitud más grande se puede dañar la muestra, a causa de que se trabaja con elementos biológicos y por tanto se opta por esta intensidad. De igual manera, se obtuvieron espectros en diferentes zonas para las distintas proporciones de la estructura híbrida a fin de obtener el óptimo espectro Raman de la muestra. En las figuras 23-26, se muestran ejemplos de espectros Raman obtenidos a partir de distintas zonas de la muestra.

En la Tabla 2, se presenta la comparación de las bandas observadas por el tipo de vibración asignada.

Tabla 2. Máximos números de onda de señales Raman características de proteínas (Gellini, 2022).

WGA solución	AuNP@WGA 1:1	AuNP@WGA 10:1	AuNP@WGA 5:1	Tipo de Vibración
	230			
		280	293	Desplazamientos Au-S
	509	525		Estiramiento S-S
646				Cisteina/Tirosina
718	716	718	718	Metionina
	760		761	Triptófano
775				Cisteina
856			861	Tirosina
		966	966	Triptófano
1005				Fenilalanina
	1012			Triptófano
1032			1032	Fenilalanina
1076	1072			Arginina
1236				Deformación C-H
1330	1340	1340	1336	Triptófano
1654				Amida I

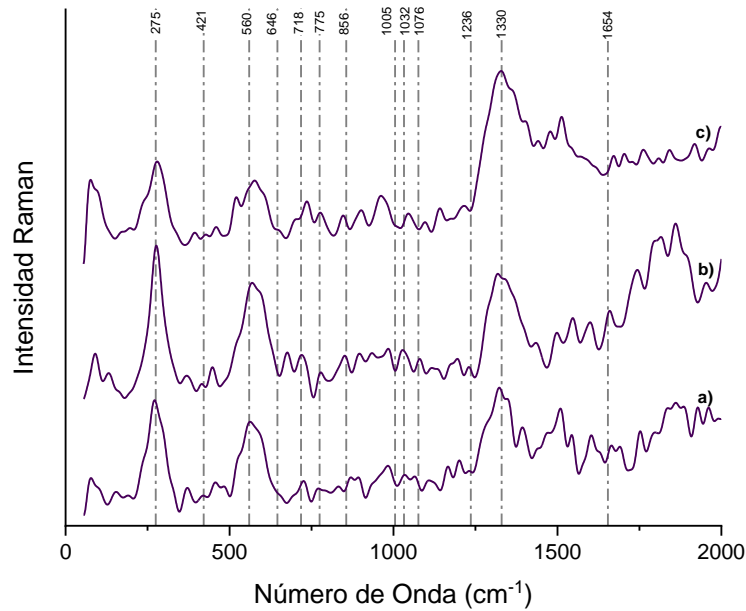


Figura 23. Espectros Raman de la proteína WGA en diferentes zonas de la muestra siendo (a) zona 1, (b) zona 2 y (c) zona 3. Los números y líneas punteadas indican bandas de señales Raman características de proteínas.

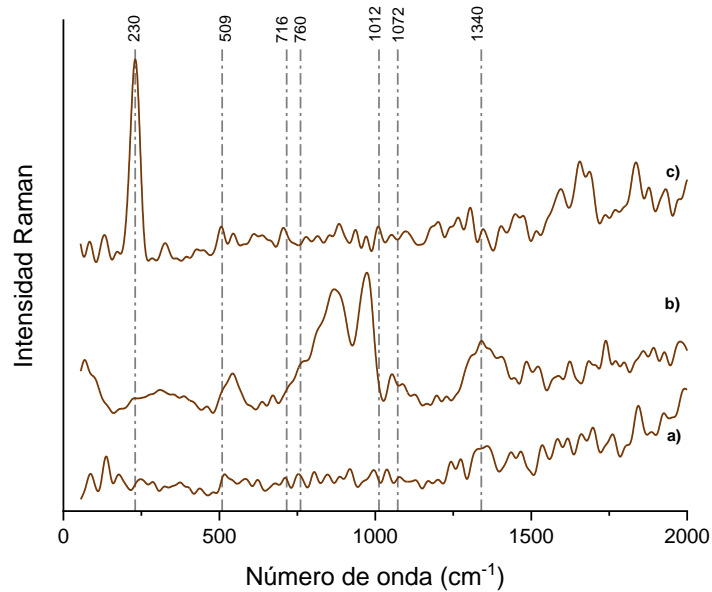


Figura 24. Espectros Raman de híbridos AuNP@WGA obtenidos en la proporción metal/proteína: 1:1 donde (a) zona 1, (b) zona 2, (c) zona 3. Los números y líneas punteadas indican bandas de señales Raman características de proteínas.

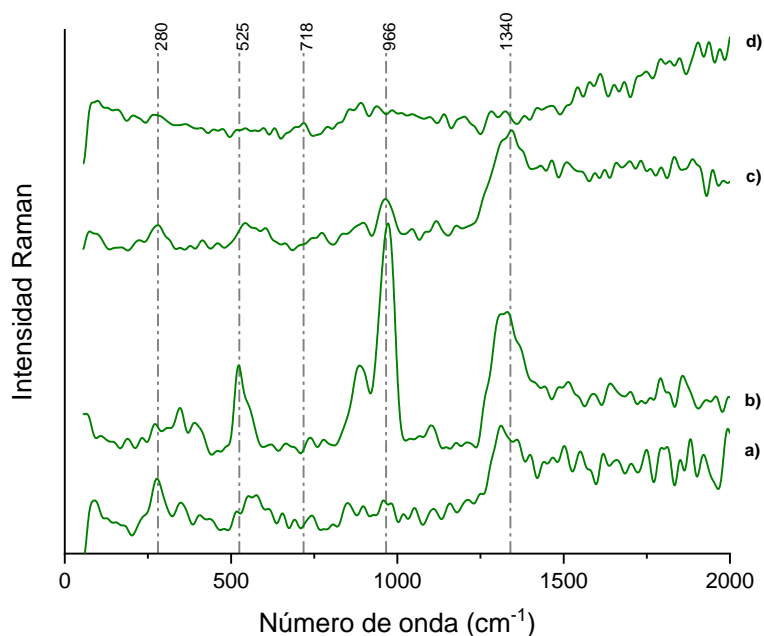


Figura 25. Espectros Raman de híbridos AuNP@WGA obtenidos en la proporción metal/proteína: 10:1 donde (a) zona 1, (b) zona 2, (c) zona 3. Los números y líneas punteadas indican bandas de señales Raman características de proteínas.

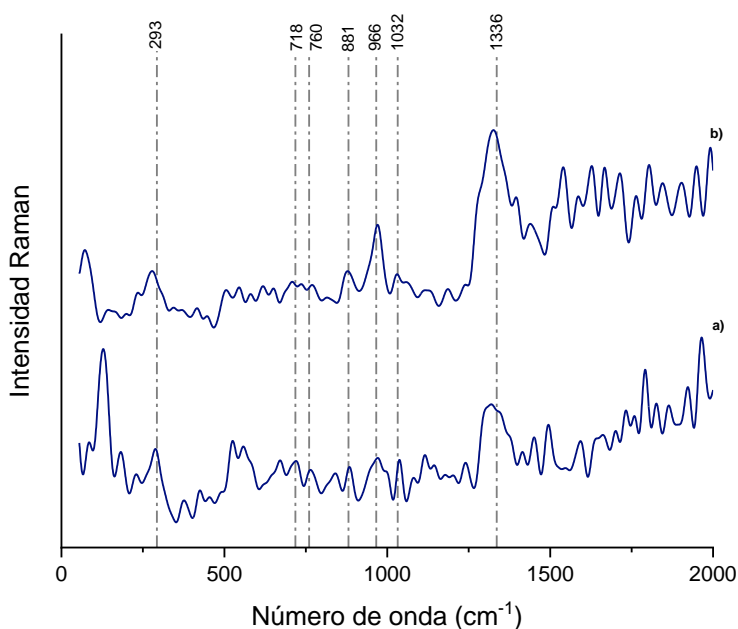


Figura 26. Espectros Raman de híbridos AuNP@WGA obtenidos en la proporción metal/proteína: 5:1 donde (a) zona 1, (b) zona 2, (c) zona 3. Los números y líneas punteadas indican bandas de señales Raman características de proteínas.

De acuerdo con los espectros obtenidos, puede observarse que el híbrido AuNP@WGA presenta señales Raman características de proteínas, aunque las señales no son siempre repetibles. Cabe mencionar que los primeros espectros Raman fueron obtenidos utilizando un láser de 785 nm, disponible en el equipo de nuestros laboratorios. La banda a $275\text{-}280\text{ cm}^{-1}$ es atribuida a la interacción Au-S, y se encuentra como una de las principales señales observadas en los 3 espectros. La fuerte interacción Au-S ha sido ampliamente documentada, y corresponde a uno de los enlaces más fuertes entre el oro y proteínas con grupos -SH (presentes en el aminoácido cisteína). Una señal a 718 cm^{-1} fue asignada a vibraciones en residuos de metionina. Esta señal se encuentra presente en los 3 espectros del híbrido. Por último, otras señales reproducibles en los 3 constructos fueron atribuidas a vibraciones en residuos de triptofano (a 966 y 1340 cm^{-1}). De notarse, otros tipos de señales no fueron observadas de manera consistente. Tal como ha sido ampliamente reportado con el uso de nanopartículas de oro en muestras diversas, la localización diferencial de partículas sobre la muestra puede dar lugar a la obtención de señales distintas en distintas localizaciones. Sin embargo, el espectro Raman del híbrido puede ser tipificado mediante las señales amplificadas mencionadas atrás. En la figura 27 se observa la comparación de los 3 espectros a diferentes proporciones metal/proteína.

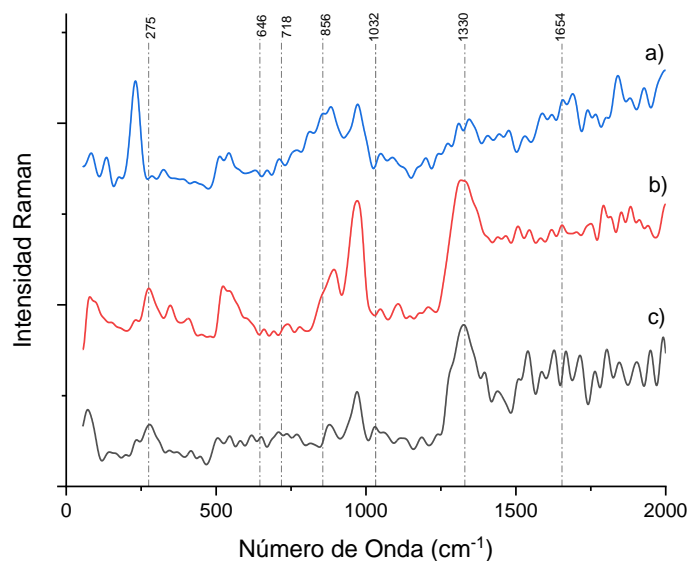


Figura 27. Espectros Raman de híbridos AuNP@WGA obtenidos al incubar distintas proporciones metal/proteína: 1:1 (a), 5:1 (b), 10:1 (c). Los números y líneas punteadas indican bandas de señales Raman características de proteínas.

Uso del híbrido para el análisis Raman de azúcares control y azúcares específicamente reconocidos por WGA

Enseguida, muestras de azúcares en solución fueron puestas en contacto con el híbrido AuNP@WGA. Para explorar la capacidad del híbrido de unirse fuertemente al azúcar reconocido por la lectina WGA, el constructo fue incubado con dos azúcares: el ácido *N*-acetilneuramínico (NANA), ligando específico de la lectina WGA, y glucosa, monosacárido que fue utilizado como control.

Para la NANA, la banda a 570 cm^{-1} $\delta(\text{C-O-C})$ en el anillo, donde δ es flexión y $\rho(\text{O-H})$, donde ρ es balanceo. La siguiente banda a 670 cm^{-1} $\delta(\text{anillo}) + \rho(\text{CH}_2)$, anillo. Posteriormente, la banda a 845 cm^{-1} $\delta(\text{C-H})$, equatorial + $\rho(\text{CH}_2)$, en 880 cm^{-1} $\nu(\text{C-O-C}) + \nu(\text{C-C})$, donde ν es estiramiento, en la banda a 1002 cm^{-1} $\nu(\text{C-C})$ el anillo, $\nu(\text{C-N})$ y en 1237 cm^{-1} Amida III, el cual es el más representativo del ácido *N*-acetilneuramínico, existen la presencia de otras bandas de importancia para la NANA pero lamentablemente debido al gran ruido que existe puede que sean tan pequeñas que no se puedan observar (Hernández-Arteaga, 2017).

En cambio para la glucosa, las bandas a 415 y 437 cm^{-1} representan $\delta(\text{C2-C1-O1})$ vibración de flexión en α - y β -glucosa, respectivamente, aunque se logra ver con mayor intensidad la segunda. La banda a 523 cm^{-1} , muestra la vibración esquelética de la glucosa, puede haberse perdido por el ruido existente. Las bandas de 838 y 856 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones $\nu(\text{C-C})$ y $\delta(\text{C1-H1})$. La banda de 1117 cm^{-1} se asignó al modelo de flexión del ángulo $\delta(\text{C-O-C})$ (Ilaslan, 2015).

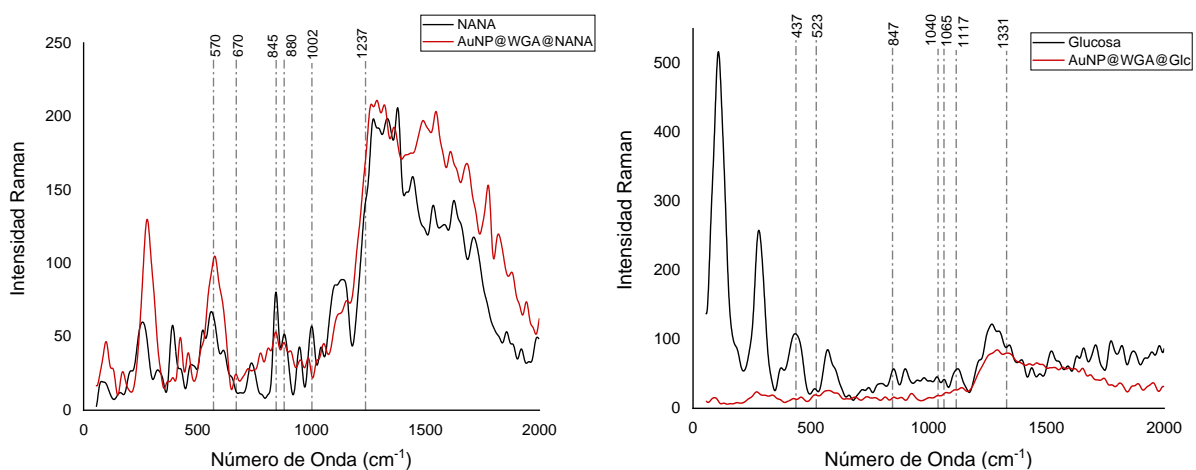


Figura 28. Espectros Raman de los monosacáridos ácido N-acetilneuramínico (NANA) (izquierda) y glucosa (derecha), solos y después de ser incubados con nanopartículas híbridas AuNP@WGA. Líneas negras, azúcares solos; líneas rojas, azúcares en presencia del híbrido.

En la Figura 28 se presentan los espectros obtenidos con los azúcares solos (líneas negras) y con los azúcares incubados con el híbrido (líneas rojas). Como puede observarse, el análisis de ambos azúcares en concentraciones altas arroja señales Raman visibles, las cuales son normalmente perdidas en muestras de mayor AuNP@WGA complejidad en donde cada azúcar quedaría en menor abundancia. De manera interesante, al analizar el híbrido AuNP@WGA para explorar su capacidad de incrementar señales Raman, las únicas señales incrementadas correspondieron únicamente al NANA, azúcar específicamente reconocido por la lectina WGA (Fig. 28a), mientras que ninguna banda fue

incrementada con la presencia del híbrido en una muestra de glucosa, que fue usado como azúcar control (Fig. 28b).

Como puede observarse en estos espectros, además de bandas características del híbrido utilizado (Fig. 27), en el espectro del azúcar NANA previamente incubado con el híbrido AuNP@WGA, señales bien definidas aparecieron de manera clara a máximos de números de onda de 1002 y 1237 cm^{-1} .

Este hallazgo resultó prometedor para el uso de las partículas como una herramienta de detección del azúcar NANA, por lo que el siguiente paso consistió en explorar su utilidad para discriminar células enriquecidas en NANA, es decir células cancerosas.

Uso del híbrido para el análisis Raman de células control y células cancerosas, ricas en el azúcar NANA

La mayor abundancia del azúcar NANA en células cancerosas, con respecto a la de células sanas, ha sido ampliamente documentada. Por ello, el uso de la lectina WGA como una herramienta para distinguir células con procesos oncogénicos ha sido propuesta. En general, las lectinas son moléculas cuya afinidad por ciertos azúcares permite su uso en métodos de detección. Sin embargo, la puesta en evidencia de la unión lectina-célula requiere de algún método de transducción, donde una señal física (comúnmente eléctrica u óptica) pueda ser monitoreada. En el caso de las lectinas, un método común es el empleo de señales luminiscentes acopladas ya sea a la misma lectina, o a algún ligando secundario capaz de reconocer la lectina.

En este trabajo se propone el uso de la lectina WGA acoplada por fisisorción a nanopartículas de oro con propiedades plasmónicas, y su uso para la inducción de señales Raman incrementadas de superficie mejorada (SERS), es decir el uso de nanopartículas funcionalizadas con la lectina, capaces de inducir un efecto SERS en el azúcar NANA.

En nuestros laboratorios, al no contar con sondas de medición de espectros Raman sumergibles en agua, uno de los pasos necesarios para este trabajo consistió en montar un método capaz de preservar intactas superficies con glicanos unidos a lectinas en células cultivadas, además de evitar el uso de superficies activas en el efecto Raman, tales como los materiales de uso común para cultivo celular (poliestireno o vidrio funcionalizado). Los azúcares son estructuras altamente estables en cuanto a su conformación, pero debía evitarse el uso de elementos de fijación comunes, tales como el paraformaldehído, que pudieran enmascarar las señales lectina-azúcar.

Los azúcares son estructuras altamente estables en cuanto a su conformación, lo cual facilita su detección, pero debía evitarse el uso de elementos de fijación comunes, tales como el paraformaldehído, que pudieran enmascarar las señales lectina-azúcar. En este trabajo se implementó el uso de portaobjetos recubiertos de hoja de aluminio estériles y funcionalizados con una capa del polímero poli-D-lisina. Estas superficies evitan el uso de superficies como poliestireno o vidrio, que cubrirían las señales Raman del analito (azúcar de superficie celular), a causa de su alta intensidad. El aluminio funcionalizado con poli-D-lisina resultó ser una superficie adecuada para el crecimiento de células inmortales, fenómeno que fue monitoreado mediante microscopía óptica (resultados no mostrados).

Las bandas típicas Raman atribuidos a los lípidos se encuentran a 1263 cm^{-1} deformación (C-H), 1451 cm^{-1} deformación (CH_2), 1658 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$ modos en proteínas del citoplasma y 1745 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$. La banda asignada a fenilalanina es a 1002 cm^{-1} , amida III a 1260 cm^{-1} y amida I a 1660 cm^{-1} y a 1444 cm^{-1} a $\delta(\text{CH}_2)$ (Schwarze, 2020). Además, las bandas en $\sim 750\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 855\text{ cm}^{-1}$ es la banda de la $\nu(\text{C}-\text{C})$ que suele indicar la presencia de proteínas, amino ácidos, hidroxiprolina y lípidos de células cancerígenas (Iwasaki, 2021).

Con respecto a las células normales MCF-12, no se presentó una intensidad muy alta de la banda de mayor intensidad que contiene las AuNP@WGA, dicha banda a $\sim 290\text{ cm}^{-1}$ indica la rotación de Au-S de las nanopartículas de oro. (Gellini, 2022; Iwasaki, 2021).

Considerando esto, las bandas más notorias además de las presentes en las nanopartículas de oro son: la banda a 1002 cm^{-1} presente en la fenilalanina, en 1445 cm^{-1} que es la banda vibracional de $\delta(\text{CH}_2)$ y a 1323 cm^{-1} que se refiere a lípidos torcedura de (CH_2) (Schwarze, 2020).

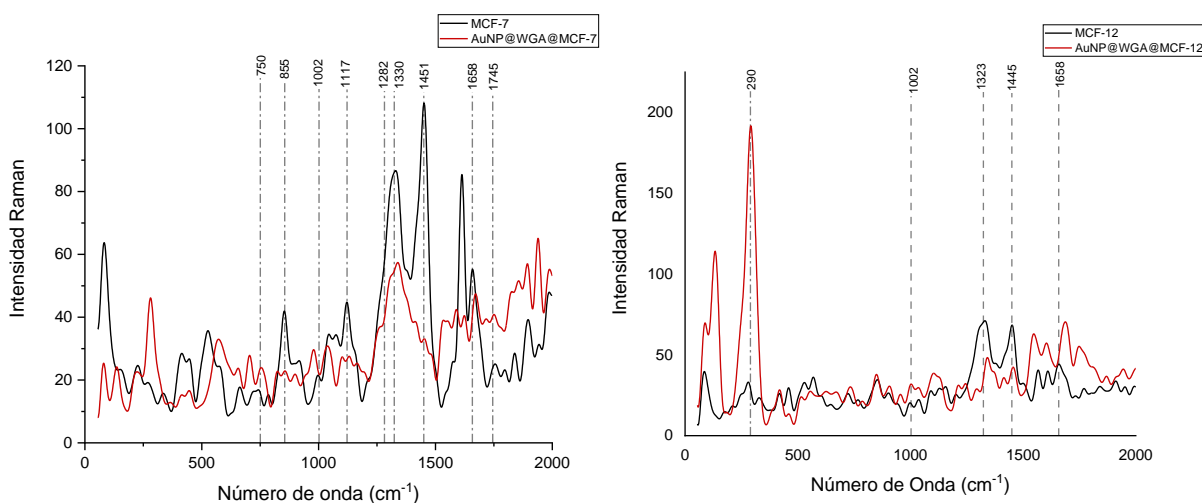


Figura 29. Espectros Raman de células inmortalizadas de tejido adenoide canceroso, MCF-7 (izquierda) y normal (derecha), en ausencia y en presencia de nanopartículas híbridas AuNP@WGA. Líneas negras, muestras sin nanopartículas; líneas rojas, muestras en presencia de híbrido.

En la Figura 29 se muestran los espectros Raman de células de tejido adenoide canceroso (células MCF-7) o normal (células MCF-12). Como era de esperarse, la incorporación de nanopartículas de oro sobre estas muestras generó el aumento de algunas señales Raman. Se observó la intensificación de picos no discriminantes entre los dos tipos celulares. También se observó el incremento de algunas señales únicamente visibles en células cancerosas. Sin embargo, era importante optimizar la medición del fenómeno. En particular, dado que las nanopartículas de oro de nuestros híbridos no son eficientemente excitadas con el láser de 785 nm (su pico de absorción es de 523 nm – Figura 18), nuestro trabajo fue continuado en un equipo Raman con fuente de luz láser mejor adaptada a nuestras partículas.

Optimización de señales mediante el uso de un láser compatible con la energía de resonancia del híbrido AuNP@WGA

En las Figuras 30 a 32, se muestran los espectros Raman del azúcar NANA en presencia del híbrido AuNP@WGA utilizando una energía de excitación de 532 nm. De acuerdo con este experimento, la intensidad de las señales aumentadas es óptima a una concentración del azúcar de 5 mM. Aunque estos resultados deberán ser confirmados, el análisis permite observar que la dispersión Raman obtenida con esta energía de excitación es reproducible y permite la detección del azúcar en solución.

En la figura 30, la señal obtenida para la estructura híbrida de AuNP@WGA a 10:1 muestran bandas características de la lectina y también la banda característica a $\sim 1255 \text{ cm}^{-1}$ que es perteneciente a la amida III en todas las señales obtenidas. Además de un número mayor de bandas provenientes de grupos orgánicos que pueden ser atribuidos tanto a la WGA como a la NANA. En relación con la que presenta una mejor señal con respecto a las demás son la de 2.5 mM y 5 mM.

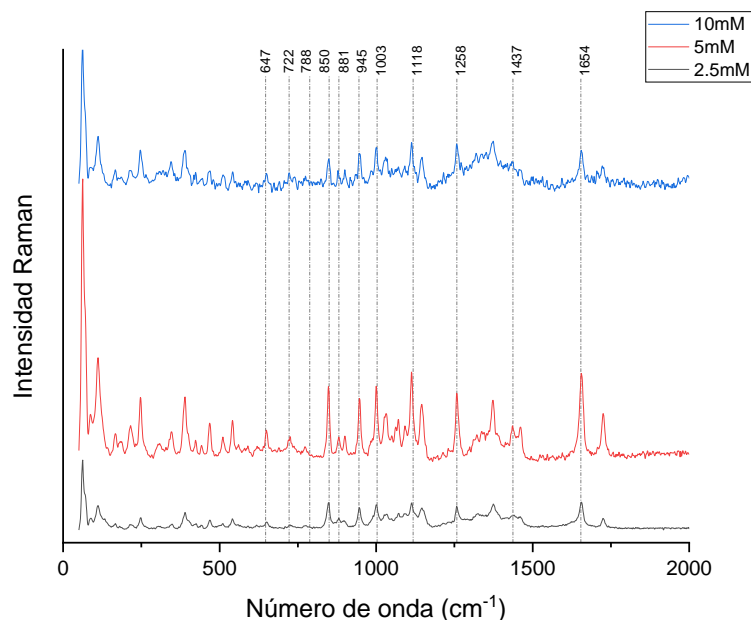


Figura 30. Espectros Raman a diferentes concentraciones del azúcar NANA (2.5, 5 y 10 mM), excitando a una $\lambda=532 \text{ nm}$, en presencia de híbridos AuNP@WGA. Las nanopartículas híbridas fueron obtenidas por incubación de una relación AuNP/WGA 1:1.

Con respecto a las señales obtenidas para la estructura híbrida de AuNP@WGA 5:1 (Figura 32) en la anterior figura (Fig. 30) se muestran bandas más definidas en las tres diferentes concentraciones. En particular, se presenta la banda característica de la NANA que se encuentra en $\sim 1258 \text{ cm}^{-1}$.

Finalmente, la detección del azúcar resultó de mayor reproducibilidad y con mayor intensidad de señales cuando el híbrido metal-proteína fue obtenido de tal forma que la proteína débilmente unida a las nanopartículas metálicas, es decir la corona suave, pudiera ser fácilmente eliminada. Este resultado es lógico, ya que solamente la lectina fuertemente adherida a las nanopartículas de oro sería capaz de acercar el azúcar a detectar al campo electromagnético de la superficie metálica.

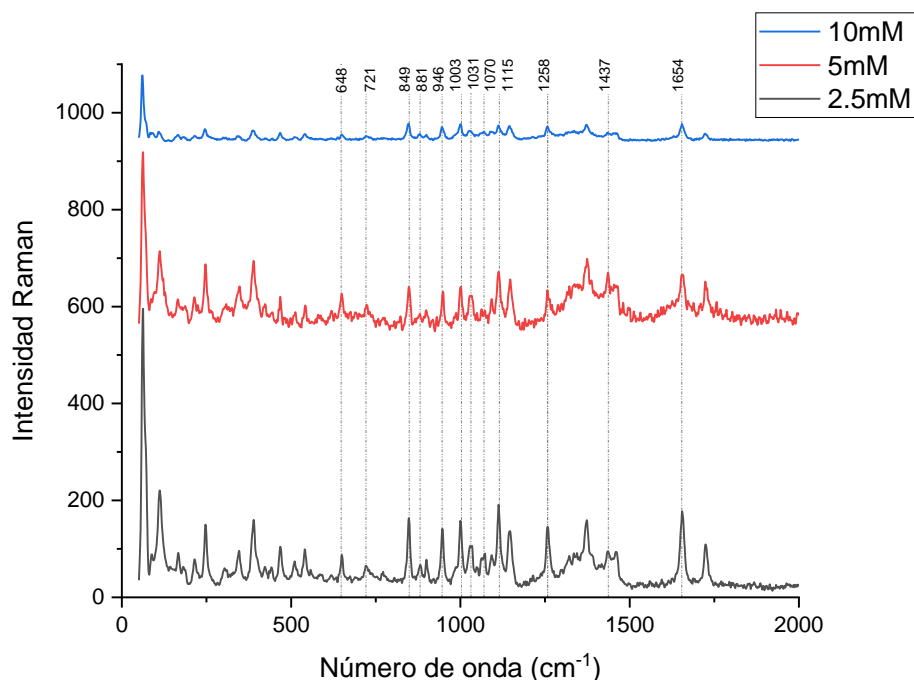


Figura 31. Espectros Raman a diferentes concentraciones del azúcar NANA (2.5, 5 y 10 mM), excitando a una $\lambda=532 \text{ nm}$, en presencia de híbridos AuNP@WGA. Las nanopartículas híbridas fueron obtenidas por incubación de una relación AuNP/WGA 10:1.

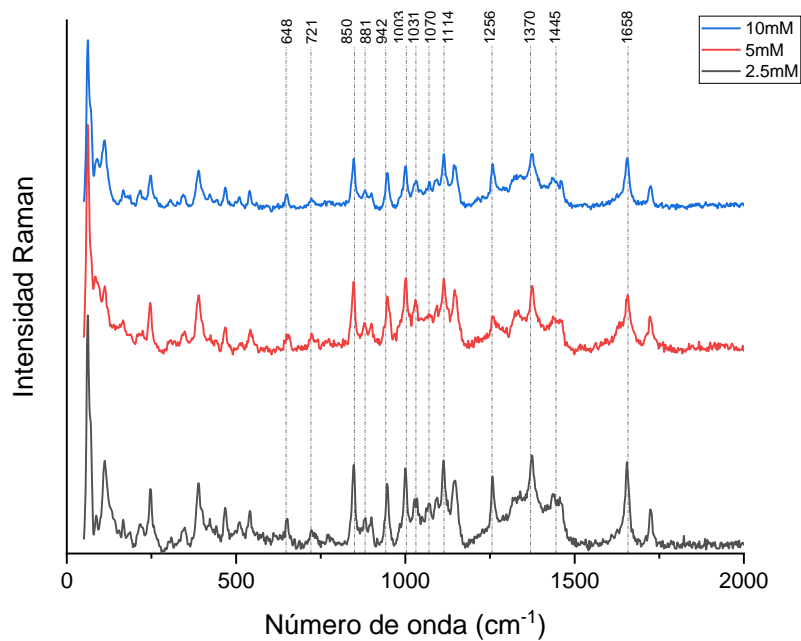


Figura 32. Espectros Raman a diferentes concentraciones del azúcar NANA (2.5, 5 y 10 mM), excitando a una $\lambda=532$ nm, en presencia de híbridos AuNP@WGA. Las nanopartículas híbridas fueron obtenidas por incubación de una relación AuNP/WGA 5:1.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de crear estructuras híbridas a partir de nanopartículas de oro biofuncionales y, debido a su recubrimiento con la lectina WGA, capaces de reconocer el ácido siálico, azúcar útil como biomarcador de células cancerosas.

Se demostró que la estructura híbrida AuNP@WGA se puede sintetizar fácilmente mediante la adsorción de la lectina, ya que la estructura metálica es adecuada para las interacciones con proteínas.

La estructura híbrida AuNP@WGA sufrió un cambio en la resonancia del plasmón superficial de la muestra después de su interacción con el azúcar, lo que indica una interacción con el ácido siálico.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el azúcar NANA, y la glucosa como azúcar control no reconocible por la lectina, el híbrido AuNP@WGA es capaz de incrementar señales Raman del azúcar NANA de manera específica.

Se implementó un método adecuado para el monitoreo de señales Raman en células adherentes en equipos carentes de sondas Raman sumergibles en agua.

El híbrido AuNP@WGA es capaz de incrementar señales Raman en células cancerosas, ricas en el azúcar NANA. Sin embargo, el método de medición deberá ser optimizado antes de continuar esta herramienta.

La optimización del método SERS con las partículas AuNP@WGA podría ser efectuada mediante un cambio en la energía utilizada para generar las señales Raman, o bien mediante un cambio en las propiedades plasmónicas de las partículas utilizadas.

Los resultados de este trabajo son altamente prometedores. Sin embargo, como confirman nuestros resultados preliminares, la optimización del método con nanopartículas y energía láser en resonancia será un punto indispensable para la continuación de este trabajo.

Referencias

- Amendola, V. P. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter (M. Science)*, 346, 1247390-1- 1247390-10. doi:10.1088/1361-648X/aa60f3
- Antosiewicz, J. M. (2016). UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: Selected applications. *Biophysical reviews*, 163-177. doi:10.1007/s12551-016-0197-7
- Ashley, M. J. (2018). Shape and size control of substrate-grown gold nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy detection of chemical analytes. *The Journal of Physical Chemistry*, 122(4), 2307- 2314. doi:10.1021/acs.jpcc.7b11440
- Bainor, A. C. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical biochemistry*, 410(2), 310-312. doi:10.1016/j.ab.2010.11.015
- Balcunaite M., G. &. (2021). Wheat Germ Agglutinin—From Toxicity to Biomedical Applications. *Applied Sciences*, 11(2), 884. doi:10.3390/app11020884
- Barbero, F. R. (2017). Formation of the protein corona: the interface between nanoparticles and the immune system. *Seminars in immunology*, 52-60. doi:10.1016/j.smim.2017.10.001
- Barz M, L. R. (2015). Quo vadis nanomedicine? *Nanomedicine (Lond)*, 3089-3091. doi:10.2217/nnm.15.156
- Benton, J. Z. (2018). Gold nanoparticles enhance radiation sensitization and suppress colony formation in a feline injection site sarcoma cell line, in vitro. *Research in veterinary science*, 104-110. doi:10.1016/j.rvsc.2017.11.018
- Camarillo, I. G. (2014). Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: An in vitro model study. *Electroporation-Based Therapies for Cance*, 55-102. doi:10.1533/9781908818294.55
- Camp C.H., Y. L. (2014). High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nat. Photonics*, 627-634. doi:10.1038/nphoton.2014.145
- Chen, G. I. (2016). Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Review*, 116 (2826-2885). doi:10.1021/acs.chemrev.5b00148
- Chhour, P. K. (2017). Effect of gold nanoparticle size and coating on labeling monocytes for CT tracking. *Bioconjugate Chemistry*, 260-269. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00566
- Cialla-May, D. Z. (2017). Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics. *Chemical Society Reviews*, 3945-3961.

- Cong, S. L. (2020). Surface enhanced Raman scattering revealed by interfacial charge-transfer transitions. *The innovation*, 1(3), 100051. doi:10.1016/j.xinn.2020.100051
- Dam, T. K. (2007). Fundamentals of Lectin-Carbohydrate Interactions. *Biochemistry of Glycoconjugate Glycans; Carbohydrate-Mediated Interactions*, 3-4, 397-452. doi:10.1016/B978-044451967-2/00058-1
- Darius G. Rackus, M. H. (2015). Electrochemistry, biosensors and microfluidics. *Chemical Society Reviews*, 5320-5340.
- Didóia C. A., C. C. (2018). Small gold nanoparticles with narrow size distribution achieved in SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*, 48-56. doi:10.1016/j.micromeso.2018.04.047
- Ding, S. Y. (2016). Nanostructurebased plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials. *Nature Reviews Materials*, 1-16.
- E. Poletto, G. B. (2021). Chapter Five - Creating cell lines for mimicking diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 181, 59-87. doi:10.1016/bs.pmbts.2021.01.014
- Elahi, N. K. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537-556. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088
- Ember, K. J. (2017). aman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *NPJ Regenerative medicine*, 2(1), 12. doi:10.1038/s41536-017-0014-3
- Fenzl C., H. T. (Mayo de 2016). Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio) analytical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 306-316. doi:10.1016/j.trac.2015.10.018
- Gao, Y. &.-M. (2020). Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol. *Nanoscale*, 12(4), 2740-2751. doi:10.1039/C9NR08877F
- Gellini, C. &. (2022). Thioglucose functionalized gold nanoparticles as active substrates for surface enhanced Raman spectroscopy of lectins. *Vibrational Spectroscopy*, 123, 103468. doi:10.1016/j.vibspec.2022.103468
- Goldring, J. D. (2019). easuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford Coomassie blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, 31-39. doi:10.1007/978-1-4939-8793-1_3
- Han, S. B. (2019). Molecular photoacoustic imaging with ultra-small gold nanoparticles. *Biomedical optics express*, 10(7), 3472-3483. doi:10.1364/BOE.10.003472

- Henry, A. I. (2016). Surface-enhanced Raman spectroscopy biosensing: in vivo diagnostics and multimodal imaging. *Analytical Chemistry*, 6638-6647. doi:10.1021/acs.analchem.6b01597
- Hernández Díaz, P. M. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15(2), 91-95. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02891999000200002&Ing=es
- Hernández-Arteaga, A. C.-N.-G.-S.-Y.-C. (2017). Surface-enhanced Raman spectroscopy of acetylneuraminic acid on silver nanoparticles: role of the passivating agent on the adsorption efficiency and amplification of the Raman signal. *The Journal of Physical Chemistry*, 121(38), 21045-21056. doi:10.1021/acs.jpcc.7b07186
- Ilaslan, K. B. (2015). Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. *Food Control*, 48, 56-61. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.001
- Iwasaki, K. A. (2021). Identification of molecular basis for objective discrimination of breast cancer cells (MCF-7) from normal human mammary epithelial cells by Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 800. doi:10.3390/ijms22020800
- Jahn, M. P.-M. (2016). Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods. *Analytst*, 756-793. doi:10.1039/C5AN02057C
- Jang, H. K.-S. (2018). Real-time tracking of the autophagy process in living cells using plasmonically enhanced Raman spectroscopy of fucoidan-coated gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 5460-5465. doi:10.1039/C8TB01402G
- Kang, J. W. (2015). High resolution live cell Raman imaging using subcellular organelle-targeting SERS-sensitive gold nanoparticles with highly narrow intranano-gap. *Nanoletters*, 113(8), 1766-1772. doi:10.1021/nl504444w
- Khurana, K. &. (2021). Localized surface plasmonic properties of Au and Ag nanoparticles for sensors: A review. *Plasmonics*, 981-999. doi:10.1007/s11468-021-01381-1
- Kong K., K. C. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121-134. doi:10.1016/j.addr.2015.03.009
- Kong L., C. J. (2014). A rapidly modulated multifocal detection scheme for parallel acquisition of Raman spectra from a 2-D focal array. *Analytical Chemistry*, 6604-6609. doi:10.1021/ac5012188
- Kumar, A. S. (2020). Perspective on recent developments of near infrared-emitting gold nanoclusters: applications in sensing and bio-imaging. *Analytical Methods*, 12(14), 1809-1826. doi:10.1039/D0AY00157K

- Lane, L. A. (2015). SERS nanoparticles in medicine: from label-free detection to spectroscopic tagging. *Chemical Review*, 10489-10529. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00265
- Langer, J. J.-P. (2019). Present and future of surface-enhanced Raman scattering. *American Chemical Society Nano*, 28-117. doi:10.1021/acsnano.9b04224
- Le Ru, E. &. (2008). *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Gran Bretaña: Elsevier.
- Lin, L. B. (2021). Surface-enhanced Raman scattering nanotags for bioimaging. *Journal of Applied Physics*, 129(19), 191101. doi:10.1063/5.0047578
- Lis H, S. N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Review*, 98(2), 637-674. doi:10.1021/cr940413g
- Macovei, D. G. (2022). Point-of-care electrochemical testing of biomarkers involved in inflammatory and inflammatory-associated medical conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-31. doi:https://doi.org/10.1007/s00216-022-04320-z
- Maddu, N. (2021). Nanoparticle mediated diagnosis of clinical biomarkers of different diseases: a medical application of nanotechnology. *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, 155-173. doi:10.1016/B978-0-12-821163-2.00009-1
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153-159. doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002
- OMS. (02 de 02 de 2022). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pelaz, B. A.-P. (2017). Diverse applications of nanomedicine. *Chemical Society*, 2313-2381. doi:10.1021/acsnano.6b06040
- Pihíková, D. K. (2015). Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chemistry*, 636-655. doi:10.1515/chem-2015-0082
- Pinto, N. A. (2017). Circuitos inmunológicos y vasculares mediados por lectinas y glicanos: implicancias en el desarrollo de nuevas terapias en cáncer y enfermedades autoinmunes. *Química Viva*, 3-18.
- Purohit, R. &. (2018). Fluorescent gold nanoclusters for efficient cancer cell targeting. *International journal of nanomedicine*, 15-17. doi:10.2147/IJN.S125003
- Santos, I. P. (2017). Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. *Analytst*, 3025-3047. doi:10.1039/c7an00957g

- Schwarze, B. G.-L.-H. (2020). Nanoparticle-based formulation of metallacarboranes with bovine serum albumin for application in cell cultures. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(1), 24. doi:10.1007/s11051-019-4708-x
- Shvalya V., F. G. (2020). Surface-enhanced Raman spectroscopy for chemical and biological sensing using nanoplasmonics: The relevance of interparticle spacing and surface morphology. *Applied Physics Reviews*, 031307. doi:10.1063/5.0015246
- Siegel, R. L. (2022). Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(1), 7-33. doi:https://doi.org/10.3322/caac.21708
- Singh, A. V. (2019). Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 378-387. doi:10.1080/15376516.2019.1566425
- Smith, E. &. (2005). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Gran Bretaña: John Wiley & Sons Ltd.
- Smith, P. E. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Su X., W. Y. (2016). Phospholipid Encapsulated AuNR@Ag/Au Nanosphere SERS Tags with Environmental Stimulus Responsive Signal Property. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10201-10211. doi:10.1021/acsami.6b01523
- Sweeney, M. F. (2018). Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer cell international*, 18(1), 1-12. doi:10.1186/s12935-018-0534-y
- Varela-Fonseca S., M.-Z. E.-R.-F.-F. (2019). Análisis de ADN mediante espectroscopía Raman utilizando el método SERS. *Tecnología en Marcha*, 118-125. doi:10.18845/tm.v32i2.4501
- Wang, L. H. (2020). Optical properties and applications of plasmonic-metal nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 30(51), 2005400. doi:10.1002/adfm.202005400
- Wang, X. G. (2018). Evans blue derivative functionalized gold nanorods for photothermal therapy-enhanced tumor chemotherapy. *ACS applied materials & interfaces*, 15140-15149. doi:10.1021/acsami.8b02195
- Xie, H. N.-S. (2012). Tracking bisphosphonates through a 20 mm thick porcine tissue by using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy. *Angewandte Chemie International*, 8509–8511. doi:10.1002/anie.201203728
- Xu, L. Y. (2015). SERS Encoded Silver Pyramids for Attomolar Detection of Multiplexed Disease Biomarkers. *Advanced Materials*, 1706-1711. doi:10.1002/adma.201402244

Zapata-Herrera M., F. J. (27 de Abril de 2014). *Quantum confinement effects on the near field enhancement in metallic nanoparticles*. doi:10.48550/arXiv.1404.6827

Zong, C. X. (2018). Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. *Chemical Reviews*, 4946-4980. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00668