

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR INMUNOELECTROQUÍMICO CON
NANOPARTÍCULAS DE CARBONO PARA LA DETECCIÓN
DEL ANTÍGENO TUMORAL HER2/neu

Por:

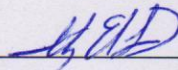
LBG. MÓNICA DENISSE GARZA VILLEGAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

NOVIEMBRE 2020

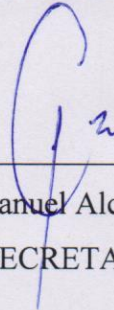
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR INMUNOELECTROQUÍMICO CON
NANOPARTÍCULAS DE CARBONO PARA LA DETECCIÓN
DEL ANTÍGENO TUMORAL HER2/neu

Comité de Tesis



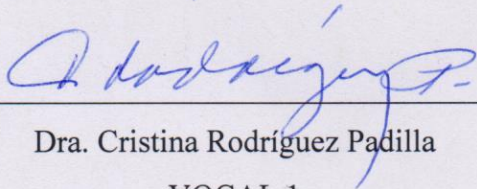
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

PRESIDENTE



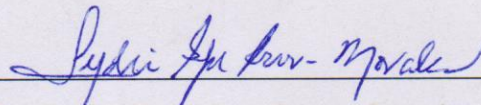
Dr. Juan Manuel Alcocer González

SECRETARIO



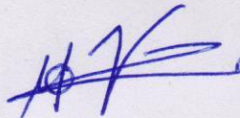
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL 1



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

VOCAL 2



Dr. José Alberto Valadéz Lira

VOCAL 3

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. Noviembre del 2020

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación de tesis fue elaborado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado hacia mi persona para cumplir con la obtención de este grado (CVU: 894634).

Quiero agradecer a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología y Virología, donde fue posible el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, gracias por los consejos, comentarios, observaciones invaluable y disposición que brindó, los cuales ayudaron a enriquecer esta investigación.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz, por apoyarme y guiarme durante todo el proyecto, por solventar dudas, así como dificultades que se hayan presentado. Gracias por la confianza que depositó en mí, por sus consejos y principalmente gracias por su amistad.

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, por su valiosa contribución y asesoramiento hacia el proyecto, gracias por las enseñanzas que impartió durante sus clases, las cuales ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. José Alberto Valadéz Lira, por la disposición presentada, así como el apoyo y observaciones que brindó durante el proyecto.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Azael, Daniel, Cynthia, Silvia, Aramis, Andrea, Samantha y Cecilia, quienes siempre me apoyaron y ayudaron a superar los momentos difíciles o agotadores presentados. Gracias a todos por su amistad, compañerismo y buen ambiente de trabajo.

Muchas gracias a Carolina, quien fue siempre una amiga incondicional a pesar de ya no estar presente en el laboratorio, gracias por estar pendiente y preocuparte por seguir enseñándome. En cada ensayo recuerdo y practico las habilidades y enseñanzas que me brindaste desde el primer día.

Por último, gracias a todas aquellas personas que durante esta investigación formaron parte de ella.

DEDICATORIA

A mis padres Arturo Garza y Rebeca Villegas, sin su apoyo y amor incondicional, así como su esfuerzo no habría podido alcanzar esta meta. Gracias por siempre creer en mí y en lo que me propongo.

A Azael Cavazos, quien es una de las personas que siempre ha creído en mí, que me motiva en seguir adelante y conseguir mis metas. Gracias por el amor que me brindas, por los momentos hermosos y divertidos que hemos pasado, gracias por estar siempre.

A mi hermana Andrea Garza quien, gracias a sus chistes, apoyo, motivación y consejos logró siempre animarme y librarme del estrés en momentos de angustia.

Para mis abuelos Álvaro Garza y Ma. del Socorro León con quienes he compartido grandes momentos de mi vida, gracias por brindarme su amor incondicional, por alentarme y creer en mis proyectos.

De igual manera y aunque físicamente no se encuentran ya presentes externo mi dedicatoria a mis abuelos José Ángel Villegas y Rebeca González quienes representan una figura que ha servido de inspiración para cumplir mis objetivos.

A mis primos Mariel y Alejandro Gamboa quienes siempre han estado al pendiente de mí y de mis estudios, gracias por compartir lindos y divertidos momentos, así como alentarme en momentos de estrés.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| LUGAR DE TRABAJO | I |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| DEDICATORIA | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | VIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS | XI |
| RESUMEN | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Cáncer e incidencia | 3 |
| 2.1.2 Cáncer de mama | 3 |
| 2.2 Marcadores tumorales | 4 |
| 2.2.1 Marcadores tumorales para el cáncer de mama..... | 4 |
| 2.2.1.1 HER2/neu | 5 |
| 2.2.1.1.1 Técnicas de detección de HER2/neu | 7 |
| 2.3 Nanopartículas..... | 8 |
| 2.3.1 Nanopartículas de carbono (CNPs) | 9 |
| 2.3.2 Nanopartículas y anticuerpos | 9 |
| 2.4 Electrodo serigrafiados (SPEs)..... | 10 |
| 2.4.1 Electrodo de Carbono Serigrafiados (SPCE)..... | 10 |
| 2.5 Biosensores | 11 |
| 2.5.1 Tipos de biosensores..... | 13 |
| 2.5.2 Biosensores y su aplicación..... | 16 |
| 2.5.2.1 Biosensores y cáncer..... | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.5.2.2 Biosensores para HER2/neu | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. HIPÓTESIS | 20 |
| 5. OBJETIVOS | 20 |
| 5.1 Objetivo general | 20 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 20 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 21 |
| 6.1 Síntesis de CNPs | 21 |
| 6.1.1 Método de coprecipitación | 21 |
| 6.1.2 Método multicore por coprecipitación | 22 |
| 6.2 Activación de las CNPs e inmovilización del anticuerpo en su superficie | 22 |
| 6.3 Caracterización de los nanomateriales | 22 |
| 6.4 Inmovilización de los nanoconjugados al SPCE..... | 22 |
| 6.5 Determinación de la efectividad del prototipo de biosensor | 23 |
| 6.6 Determinación de la especificidad y sensibilidad del prototipo de biosensor para el antígeno tumoral HER2/neu..... | 23 |
| 6.6.1 Detección del antígeno tumoral en muestras de suero humano | 23 |
| 6.6.2 Detección del antígeno tumoral en líneas celulares | 23 |
| 6.6.2.1 Cultivo celular | 23 |
| 6.6.2.2 Medición de voltametría en líneas celulares para la detección del antígeno tumoral | 24 |
| 7. RESULTADOS | 25 |
| 7.1 Caracterización de las CNPs | 25 |
| 7.1.2 CNPs obtenidas por el método de coprecipitación..... | 25 |
| 7.1.3 CNPs obtenidas por el método multicore por coprecipitación | 30 |
| 7.2 Caracterización de los nanoconjugados CNPs/anti-HER2 | 31 |
| 7.3 Desarrollo y análisis del sistema SPCE | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 7.3.1 Caracterización del prototipo de biosensor | 33 |
| 7.3.2 Análisis de la efectividad del prototipo de biosensor para la detección del antígeno tumoral HER2/neu | 36 |
| 7.3.3 Determinación de la especificidad y sensibilidad del prototipo de biosensor para el antígeno tumoral HER2/neu..... | 37 |
| 7.3.3.1 Análisis del antígeno tumoral HER2/neu en muestras de suero humano..... | 37 |
| 7.3.3.2 Análisis del antígeno tumoral HER2/neu en líneas celulares..... | 41 |
| 8. DISCUSIÓN | 45 |
| 9. CONCLUSIONES | 50 |
| 10. PERSPECTIVAS | 51 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 52 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis mediante DLS (dispersión de luz dinámica) de las nanopartículas con cubierta de carbono obtenidas a partir de distintas condiciones.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la estrategia experimental general del proyecto.

Figura 2. DLS del tamaño población de magnetita obtenida a partir del método de coprecipitación.

Figura 3. DLS del tamaño población de magnetita obtenida a partir del método de coprecipitación.

Figura 4. DLS del tamaño población de las CNPs obtenidas por el método de coprecipitación.

Figura 5. DLS del tamaño población de las CNPs obtenidas por el método de coprecipitación, con un flujo constante de Nitrógeno y glucosa 1:25.

Figura 6. Determinación de la propiedad magnética de las CNPs muestra 2.

Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de las CNPs muestra 2.

Figura 8. Microscopía de fuerza atómica de las CNPs muestra 2.

Figura 9. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los nanomateriales.

Figura 10. Determinación de la propiedad magnética de las CNPs multicore.

Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión.

Figura 12. DLS del tamaño de los nanoconjugados CNPs/anti-HER2.

Figura 13. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los nanomateriales.

Figura 14. Voltamograma cíclico de la caracterización del prototipo de biosensor.

Figura 15. Voltamograma cíclico de la caracterización de la repetibilidad del prototipo de biosensor.

Figura 16. Voltamograma cíclico del tiempo de anaquel del prototipo de biosensor.

Figura 17. Voltamograma cíclico de la curva de calibración del antígeno tumoral HER2/neu.

Figura 18. Voltamograma cíclico del análisis del suero 1.

Figura 19. Voltamograma cíclico del análisis del suero 2.

Figura 20. Voltamograma cíclico del análisis del suero 3.

Figura 21. Voltamograma cíclico del análisis del suero 4.

Figura 22. Voltamograma cíclico del análisis de la línea celular SK-BR-3.

Figura 23. Voltamograma cíclico del análisis de la línea celular MCF-7.

Figura 24. Voltamograma cíclico de la concentración mínima detectable de células.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| °C | grados Celsius |
| μL | microlitro |
| μA | microamperios |
| CNPs | Nanopartículas de carbono |
| CV | Voltamperometría cíclica |
| G | gauss |
| g | gramos |
| g | gravidades |
| h | horas |
| I | corriente resultante |
| M | molaridad |
| mg | miligramos |
| min | minutos |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |
| mVs⁻¹ | milivolts por segundo |
| ng | nanogramos |
| nm | nanómetros |
| Pdl | polidispersión |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SPCE | Electrodo de carbono serigrafiado |
| V | volts |

RESUMEN

La nanotecnología ha permitido el desarrollo de biosensores al integrar bioreceptores y nanopartículas de carbono (CNPs) en la superficie de un electrodo de carbono serigrafado (SPCE) para la detección de un analito de interés, potenciado las propiedades del sistema, siendo de bajo costo, portátil y de fácil manejo. La detección del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu) en pacientes con cáncer de mama, se realiza mediante inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), sin embargo, dichas técnicas presentan baja sensibilidad y alto costo respectivamente, además de requerir una muestra de tejido que puede ser de difícil acceso, es por esto, que el desarrollo de un biosensor basado en CNPs y anticuerpos acoplados al SPCE podría mejorar en forma específica y rápida la detección del antígeno tumoral HER2/neu. Las CNPs compuestas por múltiples núcleos de óxido de hierro y una cubierta de carbono, fueron obtenidas mediante el método multicore por coprecipitación. Los nanoconjugados se obtuvieron mediante la inmovilización del anticuerpo anti-HER2/neu a la superficie de las CNPs por la formación de enlaces amida entre los grupos amino de los anticuerpos y los grupos carboxilo de las CNPs funcionalizados con los agentes EDC y NHS. Las CNPs y los nanoconjugados fueron caracterizados mediante análisis de dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier. La caracterización y la curva de calibración del biosensor se realizó mediante voltamperometría cíclica (CV). Como resultado se obtuvo una muestra de CNPs magnéticas homogénea de 50 nm con morfología esférica y múltiple núcleos y los nanoconjugados presentaron un tamaño de 229.2 nm. Se logró observar un incremento en la corriente catódica resultante al modificar el SPCE con las CNPs, determinando que estas aumentan la conductividad eléctrica del sistema. Al realizar la curva de calibración para el antígeno tumoral HER2/neu se observó una disminución de la corriente catódica tras aumentar la concentración de la proteína en un rango de 0 a 100 ng/mL, también se determinó la especificidad del sistema ante la detección del antígeno tumoral suplementado en suero y en la línea celular SK-BR-3 de cáncer de mama, así como la sensibilidad del mismo al detectar un mínimo de 5 ng del antígeno tumoral en solución y de 10 células. El prototipo de biosensor inmunoelectroquímico desarrollado y caracterizado en este estudio permitirá la detección del antígeno tumoral HER2/neu de una forma rápida, sensible, específica, no invasiva y portable con el propósito de contribuir a mejorar el diagnóstico temprano del cáncer de mama.

ABSTRACT

Nanotechnology has allowed biosensors development integrating bioreceptors and carbon nanoparticles (CNP) in a screen-printed carbon electrode (SPCE) to detect an interest analyte, increasing the system properties, being low cost, portable, and easy to work. The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) detection in breast cancer patients, is through immunohistochemistry (IHC) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), however, these techniques have a low sensibility and high cost respectively, in addition to requiring a tissue sample that can be difficult to obtain, is for these reasons, that the biosensor development based on CNPs and coupled antibodies on SPCE could allow HER2/neu specific detection. CNPs have multiple iron oxide core and a carbon shell, these were obtained through the coprecipitation multicore method. The nanoconjugates were obtained through antibodies anti-HER2/neu immobilization on CNPs surface by amide bonds formed between the antibodies amine groups and the CNPs carboxyl groups functionalize with EDC and NHS agents. The CNPs and the nanoconjugates were characterized by dynamic light scattering analysis, transmission electron microscopy, and Fourier transform infrared transmission spectroscopy. It was obtained a CNPs homogeneous sample of 50 nm with spherical morphology and multiple cores. The amide bonds formation of the nanoconjugates were confirmed by FTIR and had a size of 229.2 nm. The biosensor characterization and calibration curve were realized through cyclic voltammetry (CV). It was possible to observed an increment in the resultant cathodic current when modifying the SPCE with the CNPs, determined that these increase the system electric conductivity. When the calibration curve for tumoral antigen HER2/neu was performed it was observed a decrease of cathodic current after increment the protein concentration ranging from 0 to 100 ng/mL, also the system specificity was determined though the tumoral antigen detection in the cell line SK-BR-3 of breast cancer, as well as its sensitivity when a minimum of 5 ng of tumoral antigen in solution and 10 cells were detected. The immunoelectrochemical biosensor prototype developed and characterized in this study will allow tumoral antigen HER2/neu detection through a quick, sensitive, specific, not invasive, and portable way with the purpose of contribute the breast cancer early diagnostic.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un padecimiento que afecta a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte, dicha enfermedad se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales, debido a fallos a nivel genómico, transcriptómico, durante la traducción o a nivel postraducciona. El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer causante del mayor número de muertes, afectando principalmente a las mujeres de 20 años de edad y más. En México, durante el periodo del 2011 al 2016, las muertes relacionadas con el cáncer de mama afectaron principalmente los estados de Chihuahua, Nuevo León y Ciudad de México presentando un promedio mayor de 20 fallecimientos por cada 100,000 mujeres.

Existen distintos tipos de métodos de detección para el cáncer de mama los cuales presentan un porcentaje alto de eficacia entre un 80 al 90%, sin embargo, estos métodos presentan algunas desventajas como el ser invasivos, proporcionar baja sensibilidad, son costosos, entre otras características. Debido a lo anterior, se ha buscado implementar otro tipo de metodología para superar estas limitaciones, dado a que es importante la detección temprana del cáncer, puesto que la supervivencia se encuentra relacionada con el estadio de desarrollo de la enfermedad, en etapa 0 y I la supervivencia ronda alrededor de un 98%, en etapa II 85%, etapa III 60% y en la etapa IV alrededor de un 20% a 5 años. Además, mediante la detección temprana es posible seleccionar el mejor tratamiento y seguimiento que se le dará al paciente, según sea la etapa en que se encuentre desarrollado el cáncer, así como evitar el desarrollo de la metástasis.

En la terapia contra el cáncer de mama, se han implementado diferentes moléculas que van dirigidas contra marcadores tumorales, entre estas moléculas podemos encontrar los anticuerpos como anti-HER2/neu, estos anticuerpos se dirigen específicamente al dominio extracelular (EDC) de HER2/neu, el cual es una glicoproteína transmembranal perteneciente a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER), encargado de realizar distintas actividades celulares, sin embargo, si este receptor se ve alterado conduce a un mal funcionamiento de la célula desembocando en cáncer.

El uso de nanomateriales, como las nanopartículas, en el área de diagnóstico han obtenido resultados prometedores en el desarrollo de dispositivos, entre ellos los sensores, que son capaces de detectar enfermedades proporcionando grandes avances al permitir detectar un

analito de interés clínico, sin embargo; con el desarrollo de los biosensores los cuales se basan en detectar distintas reacciones bioquímicas a través de señales de origen eléctricas, ópticas o térmicas, es posible disminuir el costo que poseen los métodos tradicionales para la detección del cáncer, así como aumentar la sensibilidad, especificidad y portabilidad que presenta dicha tecnología mediante la combinación de la nanotecnología y el uso de moléculas biológicas.

Es debido a esto que en este trabajo se desarrollará un prototipo de biosensor basado en nanopartículas de carbono (CNPs) recubiertas con anticuerpos con el objetivo de detectar el antígeno tumoral HER2/neu empleando un electrodo de carbono serigrafiado (SPCE).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer e incidencia

El cáncer representa la segunda causa de muerte a nivel mundial, se define como el crecimiento descontrolado de células anormales que pueden invadir, diseminar y afectar a otros órganos (World Health Organization, 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2015 se obtuvieron 8.8 millones de casos de muerte a causa de 5 distintos tipos de cáncer, de los cuales 571,000 de estos fueron a causa del cáncer de mama. Para el 2016, en México el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportaba 16 defunciones por cada 100,000 mujeres de un grupo de edad de más de 20 años, siendo la principal causa de muerte por tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018). Así mismo, en México en el periodo que comprende del año 2011 al 2016, las tasas de mortalidad observadas por tumor maligno de mama presentaron una tendencia alta, siendo Chihuahua, Nuevo León y Ciudad de México los estados que presentaban más de 20 fallecimientos a causa de esta enfermedad por cada 100,000 mujeres de 20 años o más. En el 2018, se reportó un 26% de nuevos casos de mujeres que padecían cáncer de mama en México (Global Cancer Observatory, 2018).

2.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tipo de neoplasia maligna que afecta principalmente a las mujeres y ocupa el segundo lugar en el rango de tipo de cáncer que causa el mayor número de muertes (Misek and Kim, 2011; Mittal et al., 2017). Para la detección de esta enfermedad se encuentran distintos métodos convencionales entre los cuales podemos encontrar la mamografía, biopsia, resonancia magnética, sonografía, imágenes moleculares mamarias, termografía, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica (IHC), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), entre otros, a pesar de que estas técnicas presentan una buena eficiencia de detección alrededor del 80 al 90%, presentan a su vez diversas limitaciones como ser invasivos, costosos, baja sensibilidad, falsos positivos o negativos, requieren de mayor tiempo para la obtención de resultados, riesgo de reactividad, entre otros (Tothill, 2009; Mittal et al., 2017). Sin embargo, a través del tiempo se ha buscado

alguna alternativa para la detección del cáncer de mama con el fin de evitar las limitaciones anteriores.

2.2 Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son productos de las células cancerosas o de células distintas a estas como respuesta al cáncer (Coronato et al., 2002), estos productos son categorizados según su origen, estructura, función biológica o formación del tumor como antígenos oncofetales, hormonas, glicoproteínas, metabolitos, marcadores asociados a tumores, componentes ultraestructurales y antígenos asociados a tumores, estos últimos a su vez se encuentran subcategorizados en antígenos virales, antígenos relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), enzimas, productos de oncogenes y productos citogenéticos (Sharma, 2009).

Se ha implementado el uso de marcadores tumorales para la detección del cáncer en un estadio temprano, debido a que existen pacientes que no presentan los síntomas característicos de la enfermedad, además, es posible la determinación del pronóstico y progresión del padecimiento. Una de las ventajas que ofrece el utilizar marcadores tumorales para la detección, es el tipo de muestra en que pueden ser analizados, entre las cuales destaca el plasma, sangre, orina, fluidos corporales, tumores sólidos, células tumorales circulantes, ganglios linfáticos y médula ósea. Uno de los usos más importantes para los marcadores tumorales y que puede clasificarse como una ventaja, es que, gracias a estos, es posible monitorear y determinar el comportamiento del cáncer ante una terapia o tratamiento aplicado (Nagpal et al., 2016).

2.2.1 Marcadores tumorales para el cáncer de mama

El diagnóstico del cáncer de mama se basa en la detección de distintos biomarcadores los cuales podemos clasificar en glicoproteínas (MUC1, HER2, CEA, EpCAM y EGFR), ADN (BRCA1 y BRCA2) y micro ARN (miR-21, 16, 27a, 150 y 191). También podemos encontrar biomarcadores para determinar el estado en que se encuentra desarrollado el cáncer, como biomarcadores para pronóstico (ER, PR, HER-2, BRCA1, Ki67, osteopontina, mamoglobina, sirtuinas y autoanticuerpo), terapéuticos (ER, PR, HER-2, CA15-3, CA27.29, Ki67, miR-21 y CTC) y para el diagnóstico (HER2, CEA, BRCA1, miR-21, 155 y 222) (Mittal et al., 2017).

2.2.1.1 HER2/neu

HER2/neu, también conocido como HER2, c-erbB2 o erbB2, es una glicoproteína transmembranal que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER o ErbB). Dicha proteína presenta un peso de 185 kDa y es codificado por el gen *HER2* localizado en el brazo largo del cromosoma 17 humano (17q21). Dentro de esta familia se encuentran también HER1 (ErbB1), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). Estas proteínas se localizan en la superficie celular y están involucradas en la regulación de distintos procesos fisiológicos como en el crecimiento, proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular, interacción entre célula-célula y en la señalización de citocinas (Spiridon et al., 2002; Iqbal and Iqbal, 2014). Su estructura se encuentra conformada por tres dominios, un sitio de unión a ligando extracelular, también conocido como dominio extracelular (ECD) dividido en cuatro dominios: dos dominios ricos en leucina (I y III) involucrados en la unión al ligando y dos dominios ricos en cisteína (II y IV) involucrados en la formación de enlaces de disulfuro responsables en la dimerización; un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad catalítica de tirosina quinasa (Hirsch et al., 2002; Tsé et al., 2012; Iqbal and Iqbal, 2014). Se ha descrito que la activación del receptor HER2/neu es mediante mecanismos de homo y heterodimerización con miembros de la propia familia HER y por el desprendimiento del ECD a pesar de no requerir algún ligando activador, estos mecanismos guardan relación con el desarrollo del cáncer, debido que, al estar constantemente activo promueve la autofosforilación del dominio con actividad tirosina quinasa intracelular y la fosforilación de proteínas blanco intracelulares, iniciando una cascada de señalización capaz de promover una proliferación celular descontrolada y una resistencia a la apoptosis (Hirsch et al., 2002; Tsé et al., 2012).

HER2/neu se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cánceres, como el cáncer de mama, ovario, próstata, pulmón, vejiga, riñón y en el tracto gastrointestinal, además esta sobreexpresión se encuentra asociada a la metástasis y a un mal pronóstico de la enfermedad (Spiridon et al., 2002; Adams and Weiner, 2005). En el cáncer de mama, la sobreexpresión del receptor HER2/neu representa del 15 al 30% de los casos invasivos y es una de las alteraciones más comunes en este tipo de cáncer (Coronato et al., 2002; Molina et al., 2005; Iqbal and Iqbal, 2014).

El gen *HER2* en el cáncer de mama presenta alrededor de 25 a 50 copias del gen en lugar de solo 2 copias por célula, obteniendo un incremento de 40 a 100 veces de la proteína, resultando en la expresión de 2 millones de receptores en la superficie de la célula tumoral (Iqbal and Iqbal, 2014). Se ha determinado que el gen *HER2* se puede utilizar para la determinación del pronóstico de la enfermedad en estadios tempranos, así como utilizarlo como un marcador capaz de predecir la respuesta ante algún tratamiento o terapia dirigida contra el cáncer (Coronato et al., 2002).

La proteína HER2/neu es considerada como un marcador potencial y clínicamente relevante para el cáncer de mama, debido a que es posible encontrarlo en muestras que son de fácil acceso tal como lo es el suero sanguíneo, permitiendo discernir entre individuos sanos de pacientes con cáncer de mama, puesto a que en pacientes sanos se presentan niveles de HER2/neu entre 2 a 15 ng/mL en muestras de suero, además se ha demostrado que la medición de proteínas en este tipo de muestra permite la detección temprana del cáncer, así como la monitorización del tratamiento empleado (Loo et al., 2011; Tsé et al., 2012; Wujcik, 2014).

El ECD del receptor HER2/neu es el dominio que se encuentra soluble en el suero sanguíneo y cuya escisión está dada por el mecanismo proteolítico conocido como desprendimiento del ECD. La pérdida del ECD es atribuida a distintas metaloproteasas que se caracterizan por contener zinc, como aquellas pertenecientes a la familia ADAM (a disintegrin and metalloproteases) las cuales son glicoproteínas ancladas a la membrana que median funciones biológicas, entre ellas la proteólisis, también se encuentran las metaloproteasas pertenecientes a la familia MMP (matrix metalloproteases), que se caracterizan por degradar las proteínas estructurales de la matriz extracelular y escindir moléculas de la superficie celular, así como proteínas que no son de matriz. Después de la pérdida del ECD, se crea un fragmento truncado del receptor asociado a la membrana en el extremo amino con un aumento en la actividad tirosina quinasa favoreciendo su actividad oncogénica (Tsé et al., 2012; Wujcik, 2014).

El receptor HER2/neu ya ha sido empleado como marcador tumoral para la terapia en individuos con cáncer de mama mediante el uso del anticuerpo anti-HER2/neu, también nombrado comercialmente como Trastuzumab (Herceptin), el cual fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1998 y por la European Medicines Agency (EMA) en el

2000. Estos anticuerpos se caracterizan por ser monoclonales recombinantes humanizados capaces de dirigirse de manera específica al ECD del receptor HER2/neu evitando el desprendimiento por acción de las metaloproteasas (Carney et al., 2007; Arruebo et al., 2009; Tsé et al., 2012).

En el 2004, Wartlick et al., utilizaron como marcador tumoral el receptor HER2/neu, conjugando anticuerpos específicos dirigidos contra células que sobreexpresan este receptor como lo es Trastuzumab (Herceptin) a la superficie de nanopartículas biodegradables elaboradas a base de gelatina y albúmina sérica humana (HSA), determinando ser un sistema prometedor para la administración selectiva de fármacos.

En el 2010, Park et al., emplearon anticuerpos anti-HER2/neu como terapia contra el cáncer, los cuales promovieron la respuesta inmune innata y adaptativa, demostrando así un modelo y una estrategia capaz de producir una regresión del tumor utilizando como marcador tumoral el receptor HER2/neu.

2.2.1.1.1 Técnicas de detección de HER2/neu

Para la detección de cáncer de mama positivo para HER2/neu se utilizan principalmente dos métodos, el primero es el ensayo de inmunohistoquímica (IHC), el cual es capaz de detectar la sobreexpresión del receptor en las células cancerígenas mediante la visualización de la tinción de las membranas celulares al incubar el tejido tratado con anticuerpos marcados con cromógenos dirigidos a HER2/neu, siendo una técnica rápida, sencilla y de bajo costo. Los resultados de esta técnica se basan en una ponderación del 0 al 3+, siendo el 0 y 1+ un resultado negativo, 2+ inconcluyente y el 3+ un resultado positivo. El segundo método es el ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), un método considerado de alta precisión, sensibilidad y especificidad, este se basa en detectar la amplificación del gen *HER2* mediante el uso de sondas marcadas con fluorocromos, considerando una célula normal al contener 2 copias o hasta 4 copias del gen si se encuentra en división celular. A pesar de ser técnicas consideradas como los métodos estándar para la detección del cáncer de mama HER2/neu positivo y de poseer ciertas ventajas, cada una de estas técnicas presentan a su vez desventajas para su uso, entre las cuales destacan el poseer baja precisión, en el caso del ensayo de IHC y el ser una técnica costosa y requerir un mayor tiempo para la obtención de resultados, hablando específicamente del ensayo de FISH, así

mismo, ambas técnicas requieren de una muestra de tejido que puede ser de difícil acceso, como lo es una muestra obtenida a través de biopsia, clasificándolos como métodos invasivos (Lv et al., 2011; Colonia et al., 2015; Lee et al., 2016).

2.3 Nanopartículas

Las nanopartículas presentan un tamaño pequeño que oscila entre 1 a 100 nm, esta escala nanométrica les permite interactuar con distintas moléculas biológicas como son los anticuerpos, receptores de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, por mencionar algunos (Sanvicens and Marco, 2008).

Existen nanopartículas elaboradas a base de distintos materiales, orgánicos o inorgánicos, otorgándoles distintas propiedades físicas y químicas específicas que además son dependientes del tamaño que poseen. Estas nanopartículas pueden poseer propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas, termodinámicas y electroquímicas (Sanvicens and Marco, 2008). Entre las nanopartículas orgánicas se encuentran los dendrímeros que son definidos como polímeros sintéticos ramificados, liposomas y nanotubos de carbono son también ejemplos de esta clasificación, siendo vesículas de fosfolípidos y láminas de grafito enrolladas en forma de cilindro respectivamente, por último, se encuentran las micelas poliméricas. Los puntos cuánticos, poliestireno, nanopartículas magnéticas, cerámicas y metálicas (Au, Ni, Pt y TiO₂) son ejemplos de nanopartículas inorgánicas, estas pueden presentar propiedades como fluorescencia, magnetismo, electrónicas y ópticas según sea el material inorgánico con el que se encuentra conformado su núcleo central (Sanvicens and Marco, 2008).

Las nanopartículas se han implementado en el área de la nanomedicina, siendo empleadas en el diagnóstico y terapia de enfermedades. Dentro de sus aplicaciones se encuentra la administración de agentes terapéuticos, actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica, terapia fotoacústica, fototérmica, fotodinámica e hipertérmica, desarrollo de biosensores, bioimagen, bioseparación, monitoreo de células y tejidos, entre otras (Latorre and Rinaldi, 2009; Ramos and Castillo, 2011; Zhao et al., 2015).

En el desarrollo de biosensores, las nanopartículas ofrecen una alta relación superficie-volumen, incrementando la carga de elementos de reconocimiento en los electrodos y una mayor eficiencia en la transferencia de electrones, además permite la miniaturización del dispositivo, así como la amplificación y mejoramiento de la señal aumentando de esta manera

la sensibilidad de los biosensores (Tothill, 2009; Chatterjee et al., 2014; Mohamed, 2016; Lai et al., 2017).

2.3.1 Nanopartículas de carbono (CNPs)

Las nanopartículas de carbono (CNPs) proveen características particulares que las vuelven un elemento favorecedor para ser implementadas en el área de la medicina, puesto a que mientras otros tipos de nanopartículas requieren de procesos robustos y del uso de agentes que pueden representar un riesgo para la salud y para el medio ambiente, las CNPs cuentan con procedimientos simples para su elaboración, entre los cuales se encuentran la síntesis hidrotermal y el método por coprecipitación, utilizando solventes orgánicos, dejando de lado el uso de métodos complejos y elementos tóxicos. También se ha demostrado que el acomplejamiento de CNPs con un núcleo magnético como el óxido de hierro (Fe_3O_4), le otorga estabilidad en la energía superficial, además al ser magnéticas también pueden ser empleadas en sistemas inducibles de detección o sistemas de liberación de agentes terapéuticos mediante la estimulación por campos magnéticos externos (Chen et al., 2014).

Las nanopartículas al estar compuestas a base de carbono ofrecen ciertas características entre las cuales se encuentran propiedades ópticas como fluorescencia y fotoluminiscencia, biocompatibilidad, baja toxicidad, presentan excelentes propiedades electroquímicas y una buena estabilidad química, son químicamente inertes y requieren un bajo costo de producción. Estas características les permite ser empleadas en distintas aplicaciones médicas como en bioimagen, administración de fármacos, terapia génica, terapia fotodinámica y en el desarrollo de dispositivos relacionados con la energía, así como sensores y biosensores (Lai et al., 2017; Asadian et al., 2019).

2.3.2 Nanopartículas y anticuerpos

Los anticuerpos le proveen propiedades que le benefician a las nanopartículas al ser conjugadas, como especificidad, unión de alta afinidad, ser un componente biológico y es capaz de reclutar componentes del sistema inmune, sin embargo, a su vez las nanopartículas también brindan diversas ventajas como presentar diferentes propiedades químicas o físicas, presentar control en la liberación de agentes terapéuticos, una alta área superficial, biocompatibilidad y una amplia gama de grupos funcionales en su superficie, además, ambos elementos presentan un tamaño nanométrico, son utilizados como acarreadores y pueden

activar el sistema inmune, desarrollando un sistema con múltiples características (Arruebo et al., 2009; Asadian et al., 2019).

Los conjugados de nanopartículas y anticuerpos han sido implementados en el campo de la medicina, en terapia para la liberación de agentes terapéuticos de interés, reparación de tejidos y radioterapia, así como en el diagnóstico con agentes de contraste para imágenes por resonancia magnética (IRM), detección, clasificación de células, bioseparación, inmovilización de enzimas, inmunoensayos, transfección, purificación y desarrollo de biosensores (Arruebo et al., 2009; Emami et al., 2014).

2.4 Electrodo serigrafiados (SPEs)

Los electrodos serigrafiados (SPEs) son sensores que se caracterizan por presentar la tecnología de serigrafía, la cual es fabricada mediante la impresión de diversos tipos de tintas como el grafito, carbono, oro, plata, platino, aglutinantes, polímeros, plastificantes, solventes, aditivos como metales, óxidos metálicos, enzimas, intercambiadores de iones, etc., utilizando mallas que definen el tamaño y forma del electrodo en diferentes sustratos, como cerámica o plástico. En la actualidad, existe una vasta cantidad de diversos tipos de estos dispositivos, los cuales ya se encuentran comercializados, debido a que es posible modificar fácilmente su superficie con diferentes elementos como polímeros, metales, agentes acomplejantes, enzimas, nanopartículas, etc., dependiendo el tipo de análisis que se desea realizar (Mohamed, 2016).

Las ventajas que brinda el utilizar esta tecnología es su fácil manejo, son desechables lo cual evitaría la contaminación cruzada, presentan confiabilidad, son reproducibles, presentan un bajo costo, una portabilidad potencial logrando acceder a zonas rurales o de difícil acceso y es un sistema que requiere de microvolúmenes de muestra para llevar a cabo el análisis (Mohamed, 2016).

2.4.1 Electrodo de Carbono Serigrafiados (SPCE)

Los electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) ya han sido implementados como biosensores en distintas áreas como la ambiental, clínica y agroalimentaria. Estos electrodos están compuestos por tinta de carbono la cual presenta ciertas ventajas sobre la tinta de oro, al ser económica, químicamente inerte, adaptable y de fácil modificación (Mohamed, 2016; Lai et al., 2017).

Los SPCE son un circuito eléctrico que consta de tres electrodos, el primero es un electrodo de trabajo compuesto a base de carbono, sirve como matriz en el cual ocurre la reacción de interés puesto a que es el área en donde se deposita la muestra teniendo contacto directo con el analito, así como también es el área donde se realiza la modificación, el segundo es un contraelectrodo compuesto a base de carbono que se encarga de proveer la corriente necesaria para equilibrar la corriente observada en el electrodo de trabajo, por último el tercer electrodo es conocido como el electrodo de referencia el cual está compuesto a base de plata, este se encarga de mantener un potencial de equilibrio estable y conocido (Wujcik et al., 2014; Lai et al., 2017).

Se han reportado diversos trabajos en los cuales utilizan los SPCE para el desarrollo de biosensores con el objetivo de detectar moléculas de interés.

En el 2010, Kara et al., desarrollaron un biosensor electroquímico basado en aptámeros para la detección de α -trombina humana mediante la modificación de electrodos de carbono serigrafiado (SPCE) con nanotubos de carbono multicapa (MWCNT) y la inmovilización de aptámeros.

En el 2017, Lai et al., presentaron una tira de biosensor electroquímico basado en CNPs elaboradas a partir del quitosán conjugándolas con anticuerpos dirigidos contra el virus de la encefalitis japonesa (JEV), modificando un SPCE con dichos nanoconjugados. Además de ser sensible, el biosensor era capaz de ser descartable para evitar contaminaciones cruzadas, así como proporcionar un método de detección rápido y sensible a dicha enfermedad.

2.5 Biosensores

El término sensor proviene del latín “*sensire*” cuyo significado se encuentra relacionado con la detección de un elemento de interés en el medio. En un sentido moderno el término sensor se define como un dispositivo capaz de responder ante un estímulo o señal proveniente del medio permitiendo cuantificarla (Buenguer et al., 2012).

Aunque no existe una clasificación universal para los tipos de sensores debido a que la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) no ha establecido parámetros que permitan lograrlo, un primer esfuerzo por estandarizar su clasificación se remite a establecer la existencia de dos tipos de sensores: 1) sensores físicos, siendo aquellos que proporcionan una

respuesta hacia alguna propiedad física del medio, 2) sensores químicos, los cuales son definidos como sensores capaces de transformar una señal química en datos analizables y cuantificables (Gordeliy VI, 2002).

Los sensores se componen de dos elementos principales: receptor y transductor. El receptor es el componente que recibe la señal física o química del medio y el cual transmite esa información en forma de energía eléctrica hacia el transductor, el cual se encarga de traducir dicha energía a datos cuantificables permitiendo realizar análisis específicos acerca de esta respuesta (Gordeliy VI, 2002). La versatilidad de añadir elementos biológicos o químicos en el receptor tales como enzimas o nanomateriales con actividad catalítica por mencionar un ejemplo, ha permitido desarrollar una amplia gama de sensores derivando en la creciente investigación y desarrollo de estos dispositivos (Ali et al., 2017).

El término biosensor fue acuñado por Karl Cammann en el año de 1977; es definido y aceptado por la IUPAC como un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos, generalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas. Su desarrollo recae en relaciones multidisciplinarias debido a la hibridación de los sensores físicos y químicos, así como la fusión de distintas ciencias entre las cuales se encuentra la ingeniería, microbiología, física, biología, química, biotecnología y algunas otras ramas relacionadas (Ibraheem and Campbell, 2010).

Desde el desarrollo del primer biosensor en 1962 por Clark, los esfuerzos por reducir dimensiones y costos en la elaboración de biosensores, así como aumentar su sensibilidad, especificidad, portabilidad y estabilidad han llevado a la búsqueda e implementación de nanomateriales y elementos biológicos que permitan detectar algún analito de interés en el medio, reduciendo interferencias propiciadas por condiciones químicas y robusteciendo el sistema de transducción del dispositivo. Para cumplir las finalidades expuestas se han descrito diversas estrategias para el acoplamiento del elemento de reconocimiento biológico, entre las cuales se encuentra la encapsulación y adsorción física, la inmovilización de membrana, la amalgama covalente y el atrapamiento de membrana. La modificación realizada en el elemento receptor del biosensor que involucra un conjunto de fuerzas intramoleculares para permitir el anclaje del elemento biológico en el área del receptor se le conoce como encapsulación y adsorción. Por otra parte, si la porosidad del elemento que actúa como matriz

restringe la movilidad del elemento biológico se le conoce como encapsulación de matriz. En cambio, si el elemento biológico se encuentra directamente anclado al receptor del biosensor por interacciones covalente, se habla de un acoplamiento covalente. La última clase de acoplamiento es el atrapamiento de membrana, en donde el elemento orgánico se incrusta en la membrana particular semipermeable que se coloca directamente sobre el elemento sensor (Mehrotra, 2016).

2.5.1 Tipos de biosensores

La forma en que se organizan los biosensores no es clara aún, aunque existen diversos enfoques que buscan darle una organización a estos elementos. El primer criterio se basa en tipo de molécula biológica que se acopla al receptor (bioreceptor) pudiendo ser enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, por mencionar algunos (Thévenot et al., 2001; Mohanty and Kougiannos, 2006; Monošík, 2012).

Enzimas. Es un sistema de reconocimiento ampliamente utilizado, en donde se utilizan enzimas que son específicas para un analito de interés, las cuales catalizan una reacción produciendo un producto, que posteriormente, es determinado mediante el uso de un transductor (Thévenot et al., 2001; Monošík, 2012).

El primer tipo de biosensor en ser desarrollado se trató de la conjunción de un electrodo de oxígeno con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada, permitiendo relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. Tras este suceso, diversos biosensores enzimáticos se han ideado en métodos de inmovilización mediados por la interacción de fuerzas intermoleculares o por enlaces covalentes. Las enzimas comúnmente utilizadas para este propósito han sido las oxidorreductasas, polifenol oxidasas, peroxidasas y amino oxidasas (Wang, 2001).

Anticuerpos. Los biosensores basados en anticuerpos, también conocidos como inmunosensores, son capaces de detectar organismos patógenos o toxinas, así como con elementos propios del sistema inmune del hospedero mediante la interacción de un antígeno con un anticuerpo específico (Thévenot et al., 2001; Monošík, 2012; Lim and Ahmed, 2016).

Ácidos nucleicos. Conocidos como genosensores, se caracterizan por presentar una alta sensibilidad y selectividad, estos integran un ácido nucleico (ADN o ARN), sean formas

naturales o biomiméticas de oligo y polinucleótidos, en el elemento de reconocimiento. Su fundamento se basa en monitorear el cambio que ocurre en la señal cuando el par de bases del analito de interés es detectado por el elemento bioreceptor. Este tipo de biosensor es adecuado para la detección de organismos patógenos que son de interés clínico, así como de enfermedades genéticas o proteínas características de alguna enfermedad (Monošík, 2012).

Células. El uso de este tipo de bioreceptores se basan en el reconocimiento de un microorganismo por una célula o el reconocimiento de un componente celular específico que se une a ciertas especies. Son considerados sistemas que detectan límites muy bajos y pueden ser implementados en el análisis de compuestos farmacéuticos, así como en el área ambiental para la detección de patógenos, toxinas o también para clasificar agentes (Monošík, 2012).

El segundo criterio para organizar los biosensores se basa en el principio de transducción utilizado, clasificándolos en electroquímicos, eléctricos, ópticos, piezoeléctricos y termométricos (Monošík, 2012).

Eléctroquímicos. Se basan en la detección de una señal eléctrica derivada de las reacciones químicas que ocurren entre el bioreceptor y el analito de interés, al aplicar una corriente, resistencia o potencial eléctrico, midiendo propiedades eléctricas al producir o consumir electrones mediante métodos voltamétricos como voltamperometría cíclica (CV), voltametría de pulso diferencial (DPV), así como espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Estos tipos de biosensores se pueden clasificar a su vez como amperométricos, los cuales se encuentran involucrados en la determinación de corrientes eléctricas de los electrones en procesos redox, determinado que la magnitud de la corriente se ve relacionada con la cantidad del analito presente en la muestra, otro biosensor electroquímico es el potenciométrico, el cual mide la diferencia generada en el potencial, por último, se encuentran los biosensores voltamétricos, estos determinan la información del analito mediante la medición de la corriente resultante tras aplicar una variación en el potencial (Monošík, 2012; Touhami, 2014; Simões and Xavier, 2017).

Eléctricos. Son aquellos biosensores que se clasifican en conductométricos los cuales miden el cambio de la resistencia eléctrica o conductancia de la solución durante una reacción bioquímica al producir iones o electrones (Monošík, 2012).

Ópticos. Estos biosensores basan su fundamento en la detección de una luz como señal de salida traducida, esta puede ser fluorescencia o difracción óptica, mediante métodos ópticos como espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, interferometría y espectroscopía de modos guiados, siendo los métodos más utilizados (Monošík, 2012; Touhami, 2014).

Piezoeléctricos (sensible a masas). Se basan en el análisis del cambio de la frecuencia de oscilación mediante la aplicación de una frecuencia específica al material piezoeléctrico, como el cristal de cuarzo, turmalina, niobato de litio o tantalato de litio, óxido de zinc o nitruro de aluminio. Este cambio de frecuencia de oscilación del material piezoeléctrico, es debido al aumento de la masa por la unión de moléculas la cual es medida eléctricamente determinando la masa adicional del cristal. Se ha demostrado el uso potencial de este tipo de biosensores en el análisis de alimentos, ambientales y clínicos. Un ejemplo de los biosensores sensibles a masas son los microcantilever, con los cuales se puede determinar propiedades como viscosidad, densidad y tasa de flujo al detectar cambios en la frecuencia de vibración (Monošík, 2012).

Termométricos. Miden el calor de la reacción cuando el analito de interés interacciona con el bioreceptor, siendo proporcional la temperatura resultante con la concentración del analito inmerso en la muestra, debido a que el calor total absorbido o producido es directamente proporcional a la entalpía molar y al número de moléculas totales presentes en la reacción. Son biosensores que se utilizan en análisis de productos cosméticos, farmacéuticos y de alimentos (Monošík, 2012).

El tercer criterio para la clasificación de los biosensores tiene su base en el analito a ser detectado como glucosa, toxinas, micotoxinas, drogas, enzimas, antígenos, por mencionar algunos ejemplos (Thévenot et al., 2001).

El uso de cualidades como la fuerza magnética, resonancia o refracción de la luz han permitido la detección de analitos biológicos sin la necesidad del empleo de enzimas u otro elemento biológico, representando una ventaja sobre los otros tipos de biosensores, más sin embargo la dificultad en su manufactura y la infraestructura necesaria para el análisis de los resultados arrojados por estos dispositivos ha limitado su empleo en campo (Saidur and Basirum, 2017).

2.5.2 Biosensores y su aplicación

Dado el potencial que representan los biosensores como una herramienta portable, sensible y específica para la detección de diversos analitos, estos dispositivos se encuentran ampliamente involucrados en diversos campos pudiendo enlistar tres ámbitos principales: industria alimenticia, disciplinas ambientales y aplicaciones biomédicas.

Los biosensores en la industria alimentaria han permitido cumplir con las necesidades de los consumidores en términos de sanidad y calidad alimenticia para garantizar la seguridad de sus procesos mediante la detección e identificación de patógenos. Entre los patógenos que destacan de forma importante por sobre otro tipo de patógenos son: *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, así como *Campylobacter* y *Salmonella*. Distintos biosensores se han desarrollado con la intención de dar solución a la detección de estos patógenos de una forma simple y rápida (Lee et al., 2015; Valimaa et al., 2015).

El campo ambiental ha sido uno de los sectores en que mayor importancia se les ha otorgado a estos dispositivos. Mientras que en los espacios de convivencia humana sigan aumentando los depósitos de materiales perjudiciales para la salud, crecerá a su vez la necesidad e importancia de biosensores capaces no solo de detectar contaminantes del entorno sino de lograrlo a un costo asequible, con rapidez y precisión. Existen reportes de diversos tipos de biosensores basados en inhibición enzimática y ADN utilizados para la detección y eliminación de contaminantes como pesticidas, toxinas y metales pesados. Entre los contaminantes con los que los biosensores se han visto involucrados se encuentran los metales pesados como plomo, cadmio, mercurio, cobre, níquel y cobalto, bifenilos policlorados y pesticidas (Hayat and Marty, 2014; Zhou et al., 2016).

La incursión de los biosensores en el área médica ha facilitado desde hace años la detección de analitos de interés en pacientes con diversos padecimientos, tales como diabetes, cáncer, padecimientos cardiacos, entre otros. Los biosensores que basan su funcionamiento en la interacción enzima-sustrato son los que mayor presencia han tenido en este campo debido al aprovechamiento de la actividad catalítica de las enzimas, así como su especificidad para lograr una exitosa detección del analito de interés (Ali et al., 2017).

2.5.2.1 Biosensores y cáncer

Los biosensores también han sido ampliamente usados en esta área, puesto que su empleo para la identificación de marcadores tumorales ha representado una alternativa viable para la detección temprana de diversos tipos de cáncer (Ali et al., 2017). La detección de células cancerígenas puede suscitarse tras la identificación de compuestos o antígenos tumorales que sirven como marcadores usados por estos dispositivos pudiendo cumplir con esta finalidad.

Uno de los trabajos realizados con el uso de nanomateriales es el de Zhang et al., quienes en el 2009 desarrollaron un biosensor basado en nanocables para la detección de micro-ARN (miRNAs). Los miRNA son reguladores importantes de la expresión génica y están asociados con el desarrollo del cáncer, mejorando los sistemas de detección de miRNAs generalmente basados en técnicas como northern blot, las cuales tienen baja sensibilidad y consumen grandes cantidades de tiempo.

En el 2016, Lee et al. reportó el desarrollo de un biosensor para el diagnóstico y la susceptibilidad a cáncer de vejiga mediante la elaboración de un dispositivo electroquímico basado en polímeros impresos molecularmente (MIPs) para el reconocimiento de moléculas de la proteína de matriz nuclear 22 (NMP22) la cual es usada en el diagnóstico del cáncer de vejiga. Este biosensor basaba su funcionamiento en el uso de nanoalambres de zinc para recubrir con MIP y ser anclados a un electrodo de carbón siendo capaz de detectar la proteína MMP en el rango de 128 a 588 ng/mL.

Otro trabajo es el de Gianetto et al. en el 2017, en el cual desarrollaron un dispositivo para la detección amperométrica de la proteína p53, basado en la inmovilización de conjugados de anticuerpos monoclonales y nanopartículas de oro en la superficie de electrodos de carbono serigrafiados, siendo capaz de detectarla en niveles nanomolares.

2.5.2.2 Biosensores para HER2/neu

En el área médica ya se han reportado el desarrollo de diversos tipos de biosensores para la detección del antígeno tumoral HER2/neu.

En el 2011, Loo et al., desarrollaron un biosensor microcantilever piezoeléctrico (PEMS) funcionalizado con anticuerpos para la detección del ECD del receptor HER2 en muestras de sueros de pacientes que presentaban cáncer de mama.

En el 2014, Emami et al., desarrollaron un inmunosensor electroquímico basado en bioconjugados de nanopartículas de Fe_3O_4 y anticuerpos anclados en la superficie de un electrodo de oro, utilizando voltametría de pulso diferencial (DPV) para la detección del cáncer de mama utilizando como marcador tumoral HER2/neu.

En el 2014, Liu et al., realizaron una detección fotoelectroquímica sensible a las células SK-BR-3 de cáncer de mama mediante la aplicación de compuestos de ZnO/grafeno y el aptámero S6 en un microdispositivo portátil y desechable de óxido de indio y estaño.

En el 2017, Tallapragada et al., desarrollaron un inmunosensor para la detección del antígeno tumoral HER2 en muestras de suero humano mediante la inmovilización de anticuerpos en la superficie de un SPE y un anticuerpo de detección biotinilado, el cual se unió a la HRP conjugada con estreptavidina.

En el 2018, Hartati et al., desarrollaron un inmunosensor voltamétrico para la detección de HER2 utilizando un SPCE modificado con oro mediante electrodeposición de ácido cloroaúrico e inmovilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína HER2 a la superficie de oro mediante la formación de enlaces amida.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existen distintas técnicas estándar que son utilizadas para la detección del cáncer de mama HER2/neu positivo, sin embargo, a pesar de que presentan una eficiencia de un 80-90%, estas a su vez presentan algunas limitantes como el ser técnicas costosas, invasivas, no poseer portabilidad, así como requerir de mayor tiempo para la obtención de resultados y de personal altamente capacitado o una infraestructura específica. Dicho lo anterior, la nanotecnología ha permitido el desarrollo de dispositivos capaces de detectar distintas enfermedades, como el desarrollo de biosensores a partir del uso de nanopartículas conjugadas con moléculas biológicas logrando detectar de manera específica un analito de interés inmerso en el medio, tal como los son los marcadores tumorales, puesto a que es posible detectarlos en muestras que son de fácil acceso, un ejemplo es el antígeno tumoral HER2/neu, debido a que es posible encontrarlo en el suero sanguíneo, dejando de lado la obtención de una muestras de tejido que pueden ser de difícil acceso. Es por esto que el desarrollo de un prototipo de biosensor basado en los nanoconjugados CNPs y anticuerpos anti-HER2/neu acoplados a un SPCE sería un método que podría complementar dichas técnicas estándar detectando de manera específica el antígeno tumoral HER2/neu.

4. HIPÓTESIS

Un biosensor inmunoelectroquímico basado en el nanoconjugado CNP/anticuerpo integrado al SPCE permite la detección del antígeno tumoral HER2/neu.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar un prototipo de biosensor integrando nanoconjugados de CNPs/anticuerpos para la detección del antígeno tumoral HER2/neu.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar y sintetizar CNPs y nanoconjugados CNPs/anti-HER2.
2. Desarrollar el prototipo de biosensor utilizando los nanoconjugados CNPs/anti-HER2 y el electrodo SPCE como matriz portátil.
3. Analizar la efectividad del prototipo de biosensor para la detección del antígeno tumoral HER2/neu.
4. Determinar la especificidad y sensibilidad del prototipo de biosensor para el antígeno tumoral HER2/neu.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Estrategia experimental general

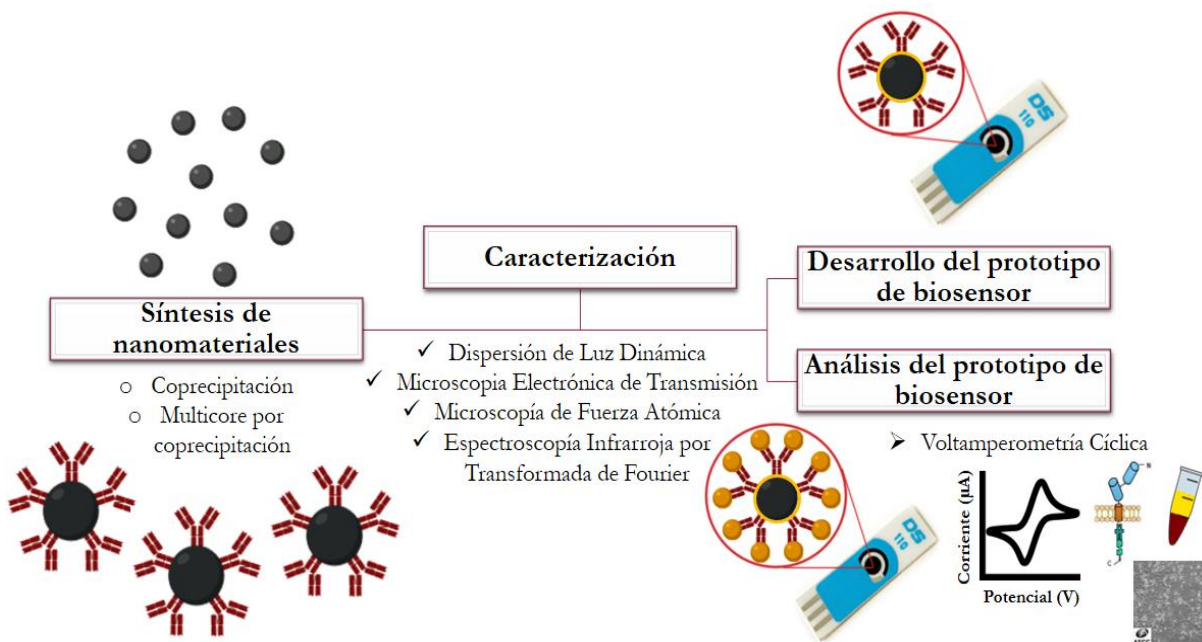


Figura 1. Diagrama de la estrategia experimental general del proyecto.

6.1 Síntesis de CNPs

6.1.1 Método de coprecipitación

Las nanopartículas fueron obtenidas mediante el método de coprecipitación por Bae et al., (2012), con el cual se obtienen las nanopartículas en dos fases, la primera es la obtención del núcleo magnético seguido del recubrimiento de la cubierta de carbono. Brevemente, se disolvieron 202.6 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 546.1 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de ddH₂O, posteriormente, se agregaron 15 mL de NH_4OH por goteo (Productos Químicos Monterrey) y se incubó durante 2 h bajo agitación magnética a 60 °C con un flujo continuo de nitrógeno. Posteriormente, la suspensión del núcleo magnético se lavó con ddH₂O, etanol y acetona diez veces y se secó durante 12 h a 25 °C. Las nanopartículas secas se dispersaron en una solución de glucosa (0.5 M) y se sonicaron durante 5 horas a 25 °C para obtener la cubierta de carbono.

6.1.2 Método multicore por coprecipitación

Se siguió el método desarrollado en el apartado 6.1.1, sin embargo, se agregaron dos fases de incubación. Brevemente, se disolvieron 202.6 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 546.1 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de ddH_2O , posteriormente, se agregaron 15 mL de NH_4OH y se incubó durante 30 min bajo agitación magnética a 50 °C con un flujo continuo de nitrógeno. Posteriormente, se sonicó la muestra durante 30 min, luego se incubaron a 80 °C por 1 h, al término de la incubación, la suspensión del núcleo magnético se lavó diez veces con ddH_2O , etanol y acetona y se dejó secar durante 12 h a 25 °C, por último, las nanopartículas fueron dispersadas en una solución de glucosa (0.5 M) y se sonicaron por 5 h a 25 °C para obtener la cubierta de carbono.

6.2 Activación de las CNPs e inmovilización del anticuerpo en su superficie

Las nanopartículas se activaron siguiendo el método de Lai et al. (2017). En resumen, 75 μL de CNPs se trataron con 25 μL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 20 mM) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 20 mM) (Sigma-Aldrich) y se incubaron por 1 h a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 150 μL del anticuerpo anti-HER2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) en la solución de CNPs y se incubaron durante 24 h a 4 °C, para permitir la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilo de las CNPs y los grupos amino de los anticuerpos.

6.3 Caracterización de los nanomateriales

La morfología y composición de las CNPs se observó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). El tamaño de las CNPs y de los nanoconjugados se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). La formación de enlaces amida de los nanoconjugados y la confirmación de la cubierta de carbono se determinó y se corroboró mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) en el rango de frecuencia 400–4000 cm^{-1} .

6.4 Inmovilización de los nanoconjugados al SPCE

Se agregaron 5 μL de las CNPs (2 mg/mL) sobre el electrodo de trabajo del SPCE (Ref: C110) y se incubaron durante 24 h a 37 °C, posterior a la incubación se agregaron 5 μL de los agentes EDC y NHS (20 mM), se incubó durante 1 h a 4 °C, después se agregaron 3 μL

del anticuerpo anti-HER2 (50 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó 24 h a 4 °C, por último, se depositaron 2 μL de BSA (1%) y se incubó durante 24 h a 4 °C para el bloqueo de los sitios de unión insaturados y no específicos de los anticuerpos.

6.5 Determinación de la efectividad del prototipo de biosensor

Se realizó la caracterización del prototipo de biosensor agregando cada elemento en el SPCE (CNP, anticuerpo, nanoconjugados, BSA y antígeno) y la obtención de la curva de calibración para la detección del antígeno tumoral en concentraciones de la proteína HER2/neu pura (Sigma-Aldrich) en un rango de 0 a 100 ng/mL mediante CV utilizando un potencial con 5 ciclos entre 0.7 V y -0.7 V, a una tasa de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , mediante el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM) (J.T. Baker) y un potenciostato 910 PSTAT mini Metrohm.

6.6 Determinación de la especificidad y sensibilidad del prototipo de biosensor para el antígeno tumoral HER2/neu

6.6.1 Detección del antígeno tumoral en muestras de suero humano

Se agregaron 25 μL de la muestra de suero suplementado con la proteína pura HER2/neu en un rango de concentraciones de 0 a 100 ng/mL en el SPCE modificado con nanoconjugados y bloqueado con BSA, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La interacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante CV, utilizando los mismos parámetros mencionados en el apartado 6.5.

6.6.2 Detección del antígeno tumoral en líneas celulares

6.6.2.1 Cultivo celular

Se extrajo el antígeno HER2/neu a partir de la línea celular SK-BR-3 (Línea celular procedente de un adenocarcinoma humano de mama que sobreexpresa el receptor HER2/neu, obtenida a partir del Banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas). Esta línea celular se mantuvo y se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F12), suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10%) y antibiótico-antimicótico (anti-anti, 1%, 100X) (Gibco Life Technologies) bajo condiciones de cultivo celular en una incubadora a 5% de CO_2 , 50% de RH y 37°C

(Incubadora de CO₂ Forma™ Steri-Cult™, Thermo Fisher Scientific). Se realizaron subcultivos semanales en cajas de 25 cm², así mismo las células se disgregaron mediante el uso de 500 µL de Tripsina-EDTA (0.25%) rojo fenol (Gibco Life Technologies) incubando de 1 a 3 min con un lavado previo de 1 mL de buffer fosfato salino pH 7.4 (1X) (PBS, Thermo Fisher Scientific), posteriormente, se centrifugaron las células recuperadas a 1,000 g por 5 min, al término de la centrifugación se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo nuevo para su posterior uso.

6.6.2.2 Medición de voltametría en líneas celulares para la detección del antígeno tumoral

Se agregaron 25 µL de distintas concentraciones (0, 1x10¹, 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶) de la línea celular SK-BR-3 y de la línea celular MCF-7 (línea celular que presenta baja expresión del receptor HER2/neu) en el SPCE modificado con nanoconjugados y bloqueado con BSA, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y la interacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante CV, utilizando los mismos parámetros mencionados en el apartado 6.5.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las CNPs

7.1.2 CNPs obtenidas por el método de coprecipitación

Se obtuvieron distintas muestras de magnetita a partir del método de coprecipitación realizando modificaciones en el protocolo. En la figura 2a, se observa el tamaño promedio de la población de las CNPs siendo de 1,459 nm con un Pdl de 0.240 y una buena calidad de la muestra; en la figura 2b, el tamaño promedio de la población de las CNPs que se sonicaron posterior a la síntesis durante 1.30 horas y diluidas 1:100 fue de 155.1 nm con un Pdl de 0.415 y una buena calidad de la muestra, por último, las CNPs de la figura 2c fueron sonicadas por 1.30 horas y filtradas 6 veces mostrando un tamaño promedio de 1.375×10^4 nm, con un Pdl de 0.761 y una mala calidad de la muestra.

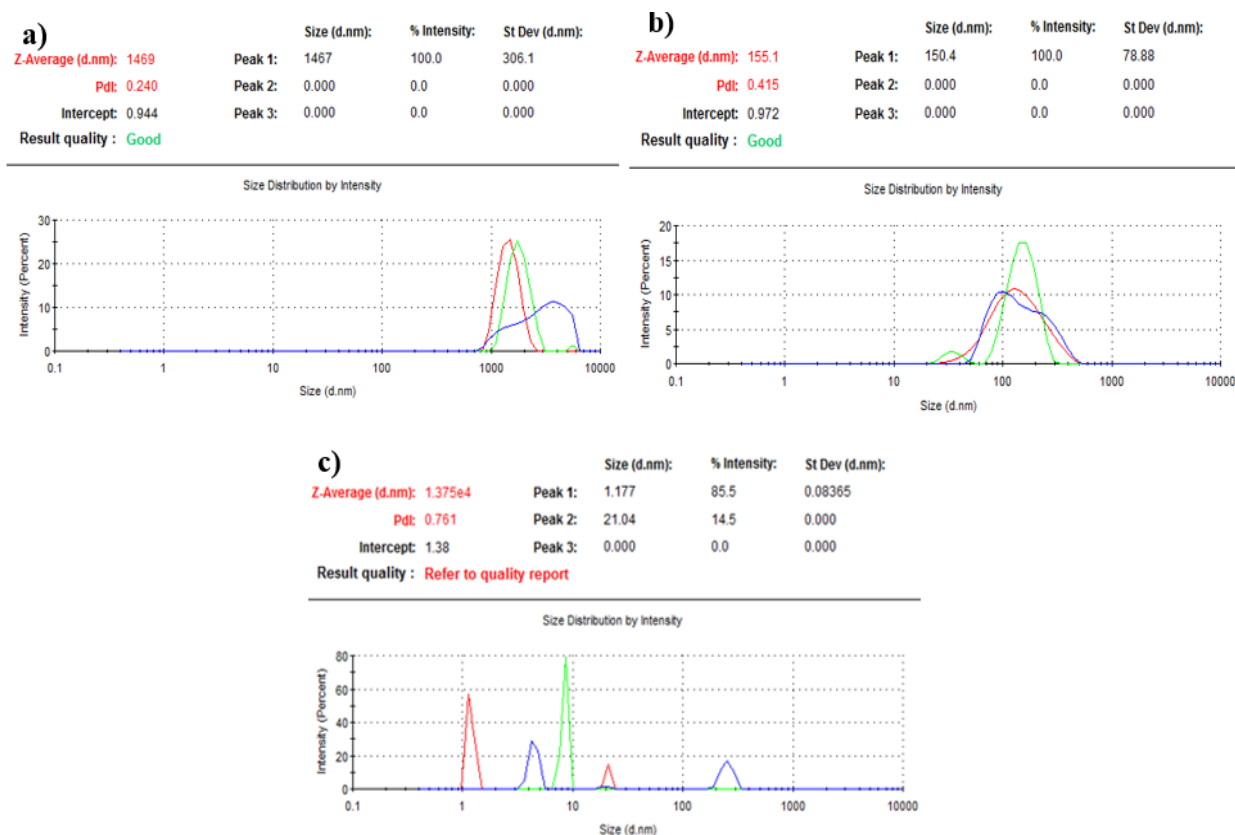


Figura 2. DLS del tamaño población de magnetita obtenida a partir del método de coprecipitación. a) magnetita disuelta en H₂OmQ, b) magnetita diluida 1:100 y sonicada 1.30 h, c) magnetita diluida 1:100, sonicada 1.30 h y filtrada 6 veces con un filtro de 220 nm.

En la figura 3a y 3b, se muestra la caracterización de la magnetita obtenida con una modificación en el método de adición del hidróxido de amonio y disueltas en H₂OmQ a pH 3. Estas muestras de magnetita obtuvieron un tamaño promedio de población de 173.1 nm y 150.8 nm y un Pdl de 0.259 y 0.440 respectivamente, así como una buena calidad para ambas muestras.

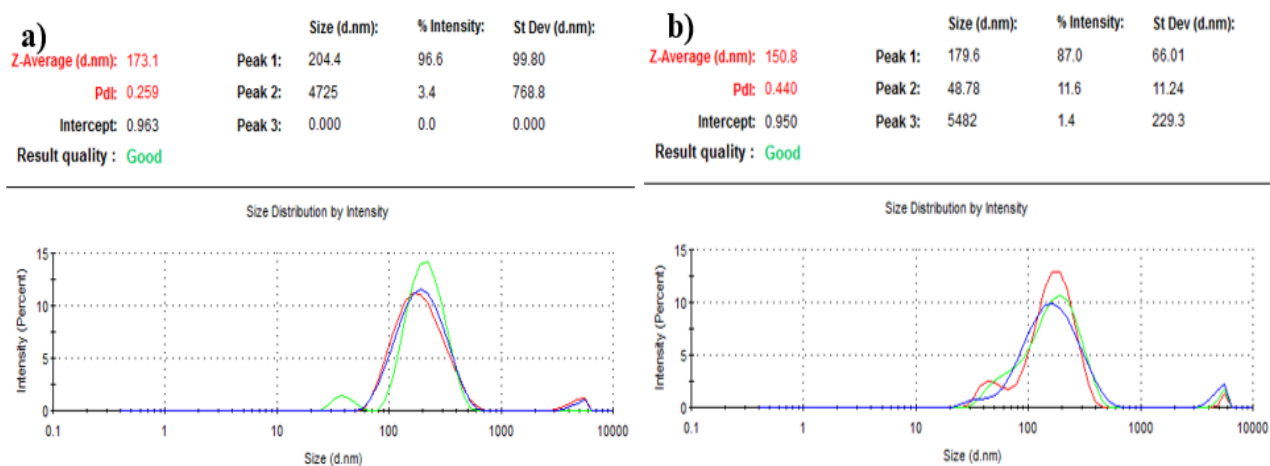


Figura 3. DLS del tamaño población de magnetita obtenida a partir del método de coprecipitación. a) muestra de magnetita 1 diluida 1:100 en H₂OmQ a pH 3 y tratada 90 min por sonicación, b) muestra de magnetita 2 diluida 1:100 en H₂OmQ a pH 3 y sonicada 1.30 h.

Posterior a la obtención del núcleo magnético con un tamaño menor a 200 nm, se continuó con el recubrimiento de este con una capa de carbono a partir de glucosa a dos distintas concentraciones esto mediante sonicación, mostrándose los resultados en la figura 4a y 4b. El tamaño promedio de población de las CNPs con 2% de glucosa fue de 203.5 nm con un valor de Pdl de 0.217 y la muestra con 3% de glucosa obtuvo un tamaño promedio de 170.1 nm y un Pdl de 0.216, además ambas muestras presentaron una buena calidad.

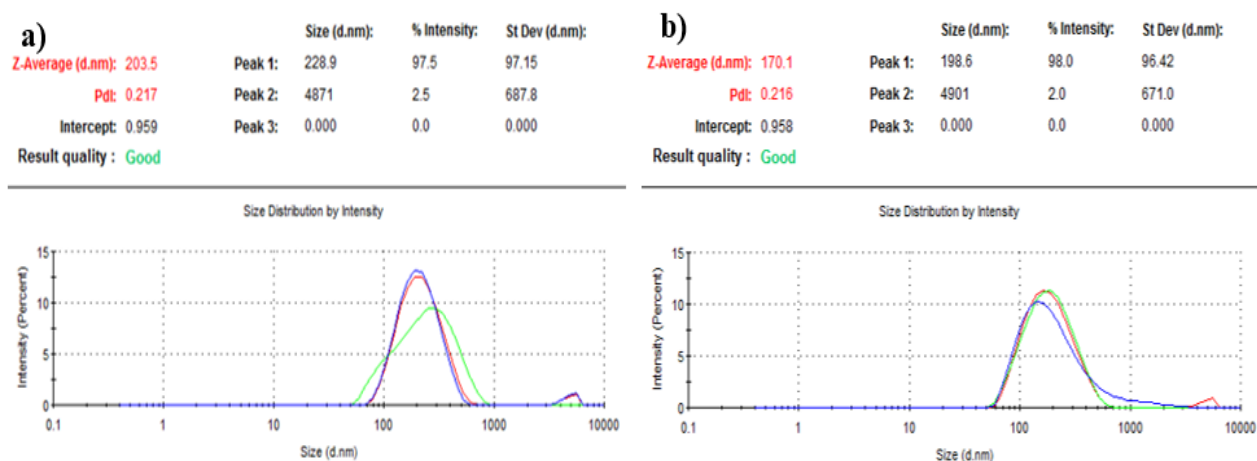


Figura 4. DLS del tamaño población de las CNPs obtenidas por el método de coprecipitación. a) CNPs con 2% de glucosa diluida 1:10 y sonicadas 2 h, b) CNPs con 3% de glucosa diluida 1:10 y sonicadas 2 h.

No se observó un cambio significativo en el tamaño de las nanopartículas al adicionar la glucosa (figura 4a y 4b), por lo que se realizaron ensayos con distintas variantes en concentración de glucosa y tiempo de sonicación (tabla 1), sin embargo, estos no fueron satisfactorios.

Tabla 1. Análisis mediante DLS (dispersión de luz dinámica) de las nanopartículas con cubierta de carbono obtenidas a partir de distintas condiciones.

| Tiempo de sonicación | Muestra | Z-average (nm) | PDI | Calidad | Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 1 | Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 2 | Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 3 |
|----------------------|-----------------------|----------------|-------|---------|--|--|--|
| Sin sonicación | Magnetita Stock | 2137 | 0.338 | Mala | 3090 (92.1%) | 311.1 (7.9%) | 0 (0%) |
| | Magnetita | 1899 | 0.786 | Mala | 4257 (74.5%) | 426.3 (25.5%) | 0 (0%) |
| Sonicación 1 h | Magnetita Glucosa 1 M | 396.7 | 0.567 | Buena | 208.5 (50.9%) | 636.6 (46.4%) | 5493 (2.7%) |
| | Magnetita Glucosa 2 M | 111.9 | 0.305 | Buena | 122.1 (98.4%) | 5399 (1.6%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Sin glucosa | 136.5 | 0.239 | Buena | 146.8 (96.7%) | 4997 (3.3%) | 0 (0%) |
| Sonicación 2 h | Magnetita Glucosa 1 M | 445.5 | 0.650 | Mala | 346.6 (75.4%) | 113.2 (24.6%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Glucosa 2 M | 99.06 | 0.347 | Buena | 98.09 (98.6%) | 5545 (1.4%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Sin glucosa | 97.81 | 0.323 | Buena | 96.74 (97.9%) | 5416 (2.1%) | 0 (0%) |
| Sonicación 3 h | Magnetita Glucosa 1 M | 114.8 | 0.292 | Buena | 128.8 (98.1%) | 5301 (1.9%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Glucosa 2 M | 98.97 | 0.385 | Buena | 113.0 (98.1%) | 5423 (1.9%) | 0 (0%) |

| | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|-------|-------|-------|------------------|----------------|-----------|
| | Magnetita Sin glucosa | 98.14 | 0.339 | Buena | 113.6 (95.2%) | 4977 (4.8%) | 0 (0%) |
| Sonicación 4 h | Magnetita Glucosa 1 M | 118.6 | 0.323 | Buena | 113.4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Glucosa 2 M | 101.0 | 0.375 | Buena | 110.2 (96.6%) | 5301 (3.4%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Sin glucosa | 99.31 | 0.339 | Buena | 100.5 (98.8%) | 5560 (1.2%) | 0 (0%) |
| Sonicación 5 h | Magnetita Glucosa 1 M | 113.8 | 0.364 | Buena | 114.4 (98.1%) | 5406 (1.9%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Glucosa 2 M | 100.8 | 0.398 | Buena | 111.2 (97.4%) | 5373 (2.6%) | 0 (0%) |
| | Magnetita Sin glucosa | 96.78 | 0.374 | Buena | 103.9 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

En la figura 5a y 5b, se muestra el tamaño de población de las CNPs obtenidas por el método de coprecipitación, adicionando un flujo constante de N₂ como gas inerte y un proceso de sonicación con una relación de glucosa de 1:25, estas presentaban un tamaño promedio de 109.5 nm y 119.3 nm con un valor de Pdl de 0.247 y 0.251 respectivamente, así como una buena calidad de las muestras.

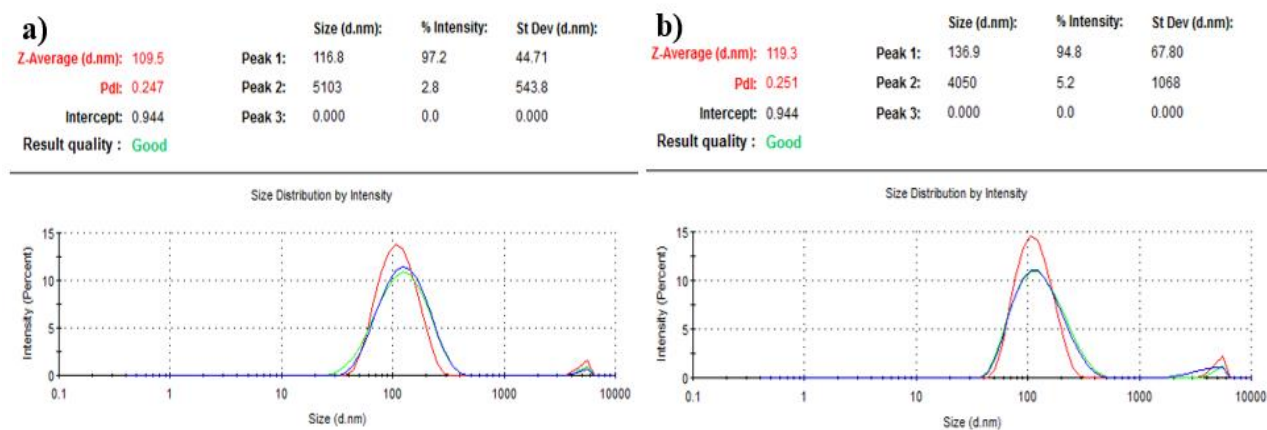


Figura 5. DLS del tamaño población de las CNPs obtenidas por el método de coprecipitación, con un flujo constante de Nitrógeno y glucosa 1:25. a) CNPs muestra 1, b) CNPs muestra 2.

En la figura 6, se observa la propiedad magnética de las CNPs al ser capaces de responder a un campo magnético externo de 12,000 G.

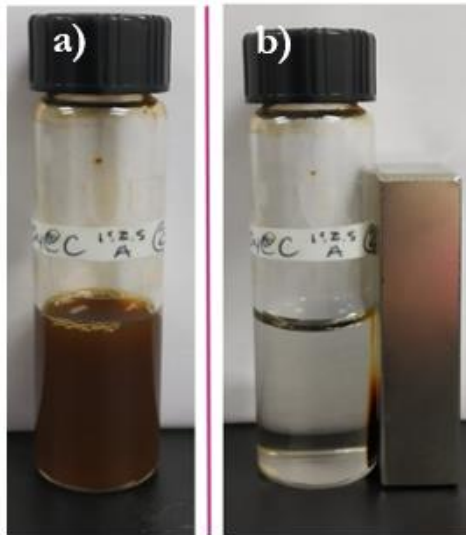


Figura 6. Determinación de la propiedad magnética de las CNPs muestra 2. a) suspensión de CNPs disueltas en ddH₂O, b) respuesta de las CNPs ante un campo magnético externo de 12,000 G.

En las figuras 7a y 7b, se puede observar el tamaño de la muestra de CNPs 2 mediante TEM siendo estas de 20 nm, también podemos observar que se encuentran agregadas.

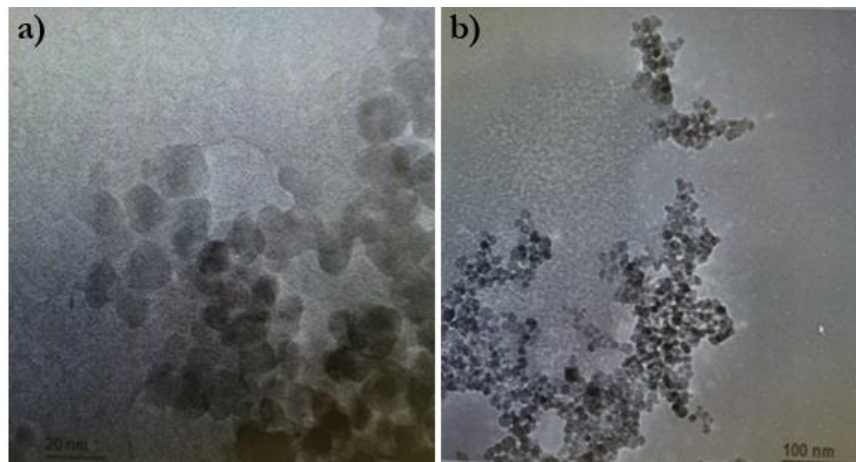


Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de las CNPs muestra 2. a) y b) CNPs muestra 2. Barra de escala= 20 nm (a), 100 nm (b).

En la figura 8 podemos observar una microscopía de fuerza atómica de la población de CNPs demostrando ser una muestra homogénea y con una morfología esférica.

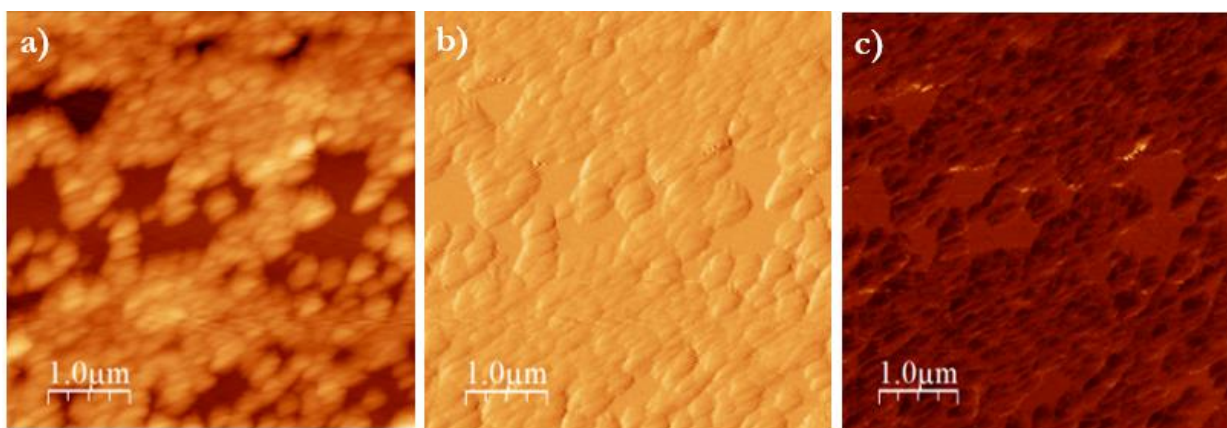


Figura 8. Microscopía de fuerza atómica de las CNPs muestra 2. a) imagen de altura, b) imagen de fase, c) imagen de magnitud de CNPs muestra 2. Barra de escala 1.0 μm (a-c).

Tras la caracterización de las CNPs muestra 2 mediante FTIR, podemos observar en la figura 9 la ausencia de grupos carboxilo en la superficie de las CNPs.

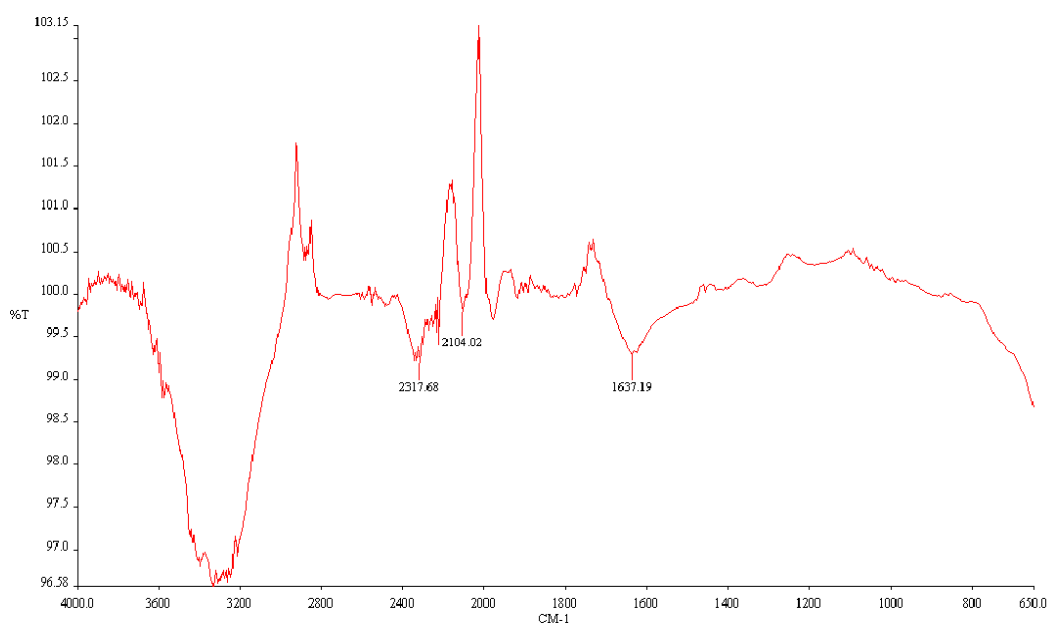


Figura 9. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los nanomateriales. a) CNPs muestra 2, obtenida a partir del método de coprecipitación. Longitud de onda 400-4000 cm^{-1} .

7.1.3 CNPs obtenidas por el método multicore por coprecipitación

En la figura 10, se observa la propiedad magnética de las CNPs multicore al ser capaces de responder a un campo magnético externo de 12,000 G.



Figura 10. Determinación de la propiedad magnética de las CNPs multicore. a) suspensión de CNPs disueltas en ddH₂O, b) respuesta de las CNPs ante un campo magnético externo de 12,000 G.

Se obtuvieron CNPs a partir del método multicore por coprecipitación. En la figura 11, se observa el tamaño de las CNPs multicore siendo este cercano a 50 nm, así como una cubierta de carbón amorfo.

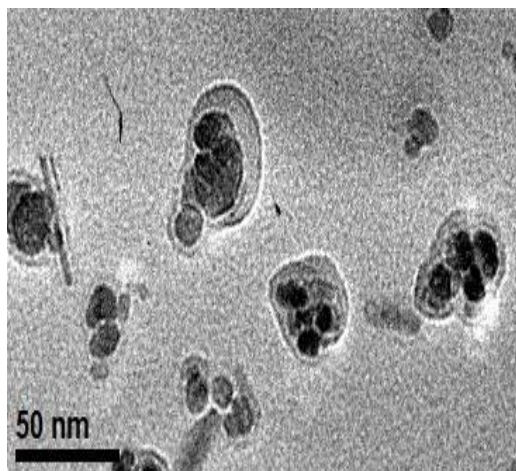


Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión. Muestra de CNPs multicore, obtenidas a partir del método multicore por coprecipitación. Barra de escala= 50 nm.

7.2 Caracterización de los nanoconjugados CNPs/anti-HER2

En la figura 12, se observa el DLS de la población de nanoconjugados obtenidos, presentando un tamaño promedio de 229.2 nm, con un Pdl de 0.410 y una buena calidad de la muestra.

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 229.2 | Peak 1: 280.3 | 97.8 | 171.2 |
| Pdl: 0.410 | Peak 2: 5385 | 2.2 | 319.7 |
| Intercept: 0.957 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Result quality : Good | | | |

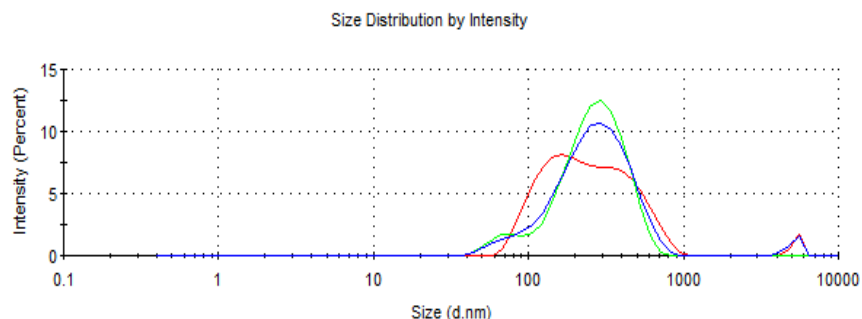


Figura 12. DLS del tamaño de los nanoconjugados CNPs/anti-HER2. Los nanoconjugados presentan un tamaño de 229.2 nm con Pdl 0.410.

En la figura 13a y 13b, podemos observar la caracterización de las CNPs multicore y de los nanoconjugados mediante FTIR, donde se determinó la presencia de los grupos OH característicos de los grupos carboxilo de enlace sencillo (C-OH) para la muestra de CNPs multicore (3439.27 cm^{-1}) y de enlace sencillo (C-OH) o doble (O=C-OH) para los nanoconjugados (3427.60 cm^{-1} y 2922.82 cm^{-1}), así mismo se reporta la formación de los enlaces amida al encontrarse la presencia del grupo carbonilo (C=O) en la muestra de CNPs (1654.04 cm^{-1}), pero con mayor medida en la muestra correspondiente a los nanoconjugados (1654.30 cm^{-1}).

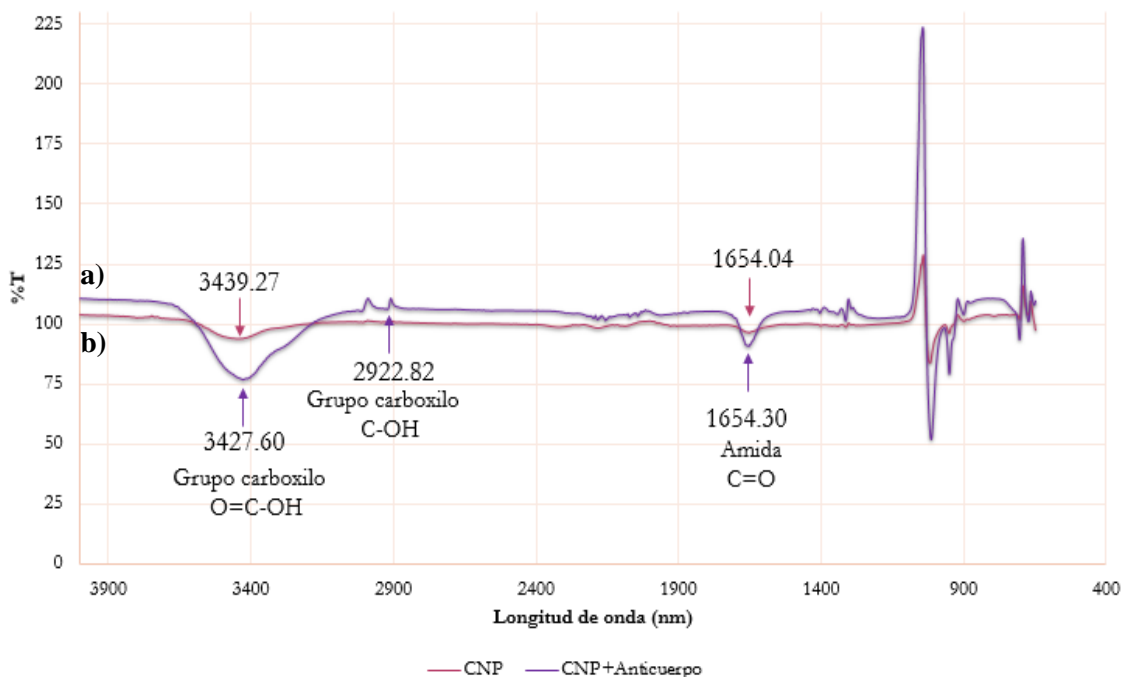


Figura 13. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los nanomateriales. a) CNPs multicore, b) nanoconjugados CNPs multicore/anti-HER2 [50 $\mu\text{g/mL}$]. Longitud de onda 400-4000 cm^{-1} .

7.3 Desarrollo y análisis del sistema SPCE

7.3.1 Caracterización del prototipo de biosensor

En la figura 14, se puede observar la caracterización del prototipo de biosensor mediante CV al aplicar un barrido cíclico de potencial entre 0.7 V y -0.7 V a una tasa de escaneo de 10.0 mVs^{-1} mediante el uso del ferrocianuro de potasio como indicador redox. Se puede observar que la corriente resultante (I) catódica del SPCE modificado únicamente con las CNPs refleja un valor I de $-72.4236 \mu\text{A}$ presentando una mayor corriente que la proporcionada por el SPCE sin modificar siendo esta de $-57.3461 \mu\text{A}$. Al modificar el SPCE solamente con el anticuerpo siendo el elemento receptor junto con BSA como agente de bloqueo el valor de I es menor siendo de $-47.7320 \mu\text{A}$. Por último, al modificar el SPCE con los nanoconjugados y BSA el valor de I catódica presenta un resultado de $-71.6014 \mu\text{A}$ siendo mayor que el SPCE modificado únicamente con el elemento receptor y el agente de bloqueo.

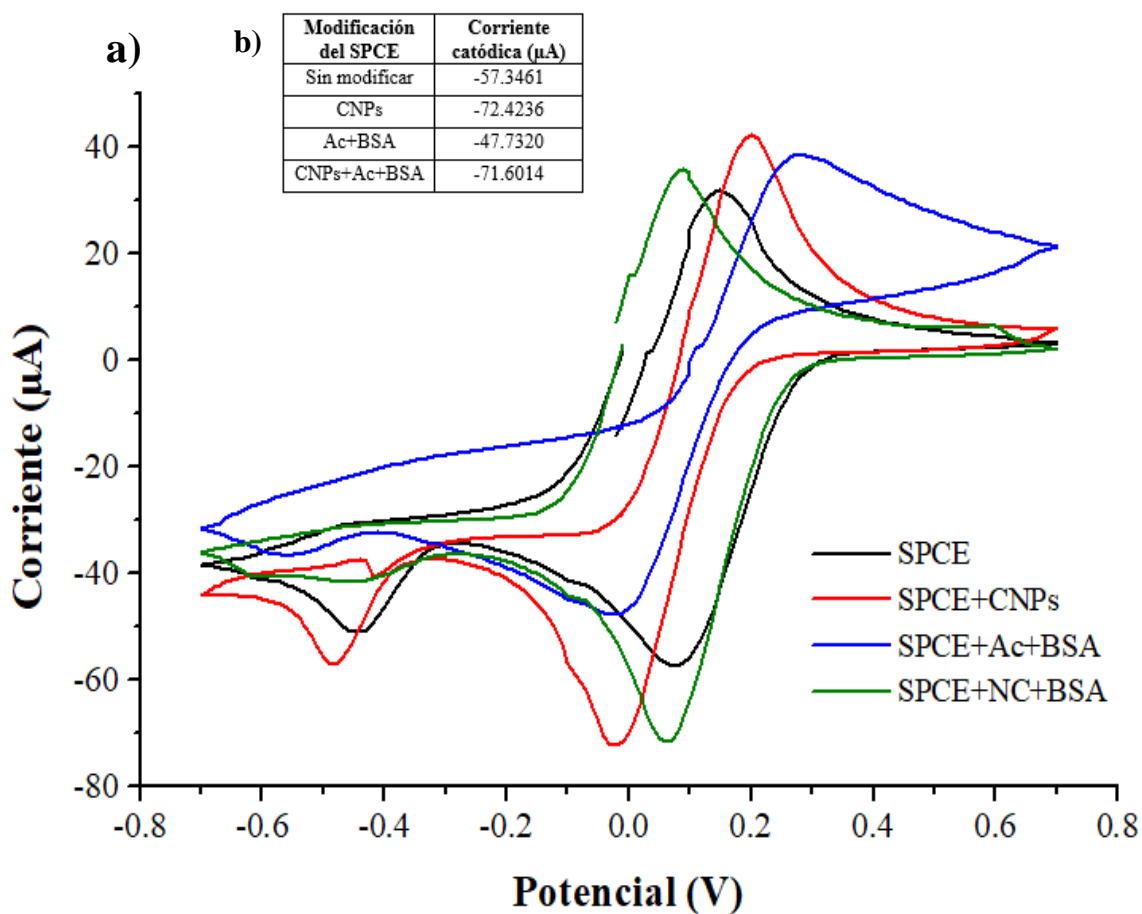


Figura 14. Voltamograma cíclico de la caracterización del prototipo de biosensor. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con CNPs (rojo). SPCE modificado con anticuerpo y bloqueado con BSA (azul). SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (verde). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*v/s* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

En la figura 15a, podemos observar el análisis de repetibilidad del sistema SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA mediante voltamperometría cíclica. La figura 15b corresponde al histograma de los valores de la I catódica de cada repetición, siendo estos -80.0204 µA , -80.5225 µA y -80.7259 µA respectivamente.

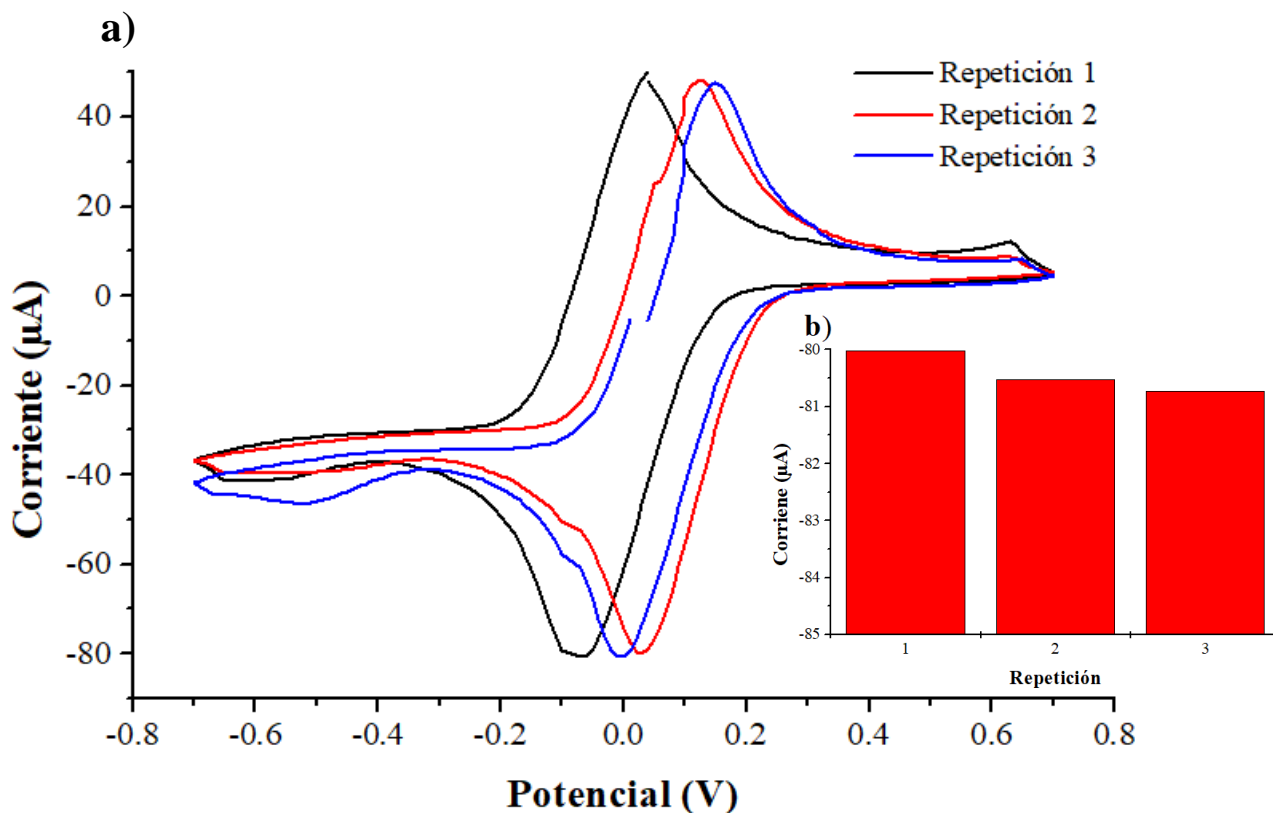


Figura 15. Voltamograma cíclico de la caracterización de la repetibilidad del prototipo de biosensor. a) SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA repetición 1 (negro). SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA repetición 2 (rojo). SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA repetición 3 (azul). b) Histograma de la corriente resultante de las repeticiones del SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA. Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM).

En la figura 16, se puede observar el análisis de la vida de anaquel del prototipo de biosensor a distintos tiempos, 1 día, 2 semanas y 2 meses después de su elaboración, donde presentan valores de la I catódica de $-71.6014 \mu\text{A}$, $-72.8802 \mu\text{A}$ y $-72.0834 \mu\text{A}$.

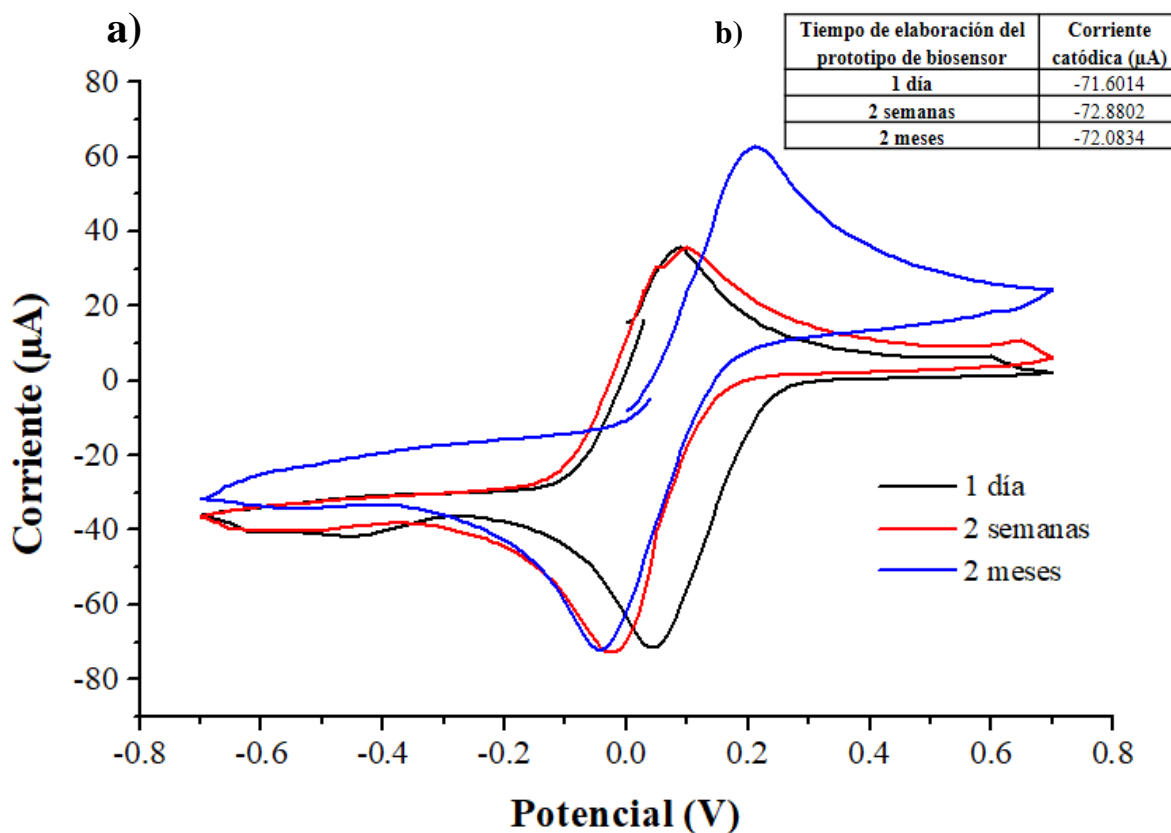


Figura 16. Voltamograma cíclico del tiempo de anaquel del prototipo de biosensor. a) SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA 1 día (negro). SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA 2 semanas (rojo). SPCE funcionalizado con nanoconjugados y bloqueado con BSA 2 meses (azul). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración. Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM).

7.3.2 Análisis de la efectividad del prototipo de biosensor para la detección del antígeno tumoral HER2/neu

En la figura 17a, se puede observar la curva de calibración del antígeno tumoral HER2/neu en un rango de 0 a 100 ng/mL mediante CV. Se puede observar que la I catódica al ir aumentando la concentración del antígeno tumoral HER2/neu esta va disminuyendo pasando de -71.6014 µA a -60.8314 µA. En la figura 17b, se puede observar un análisis de regresión de los potenciales obtenidos de los puntos máximos de reducción en el proceso redox, obteniendo valores similares entre el sistema completo (-71.6014 µA) y la concentración de 5 ng/mL (-71.7258 µA) y una disminución al ir incrementado las

concentraciones del antígeno tumoral HER2/neu de 10, 15, 50 y 100 ng/mL (-65.1649 μA , -62.9993 μA , -61.6525 μA , -60.8314 μA respectivamente).

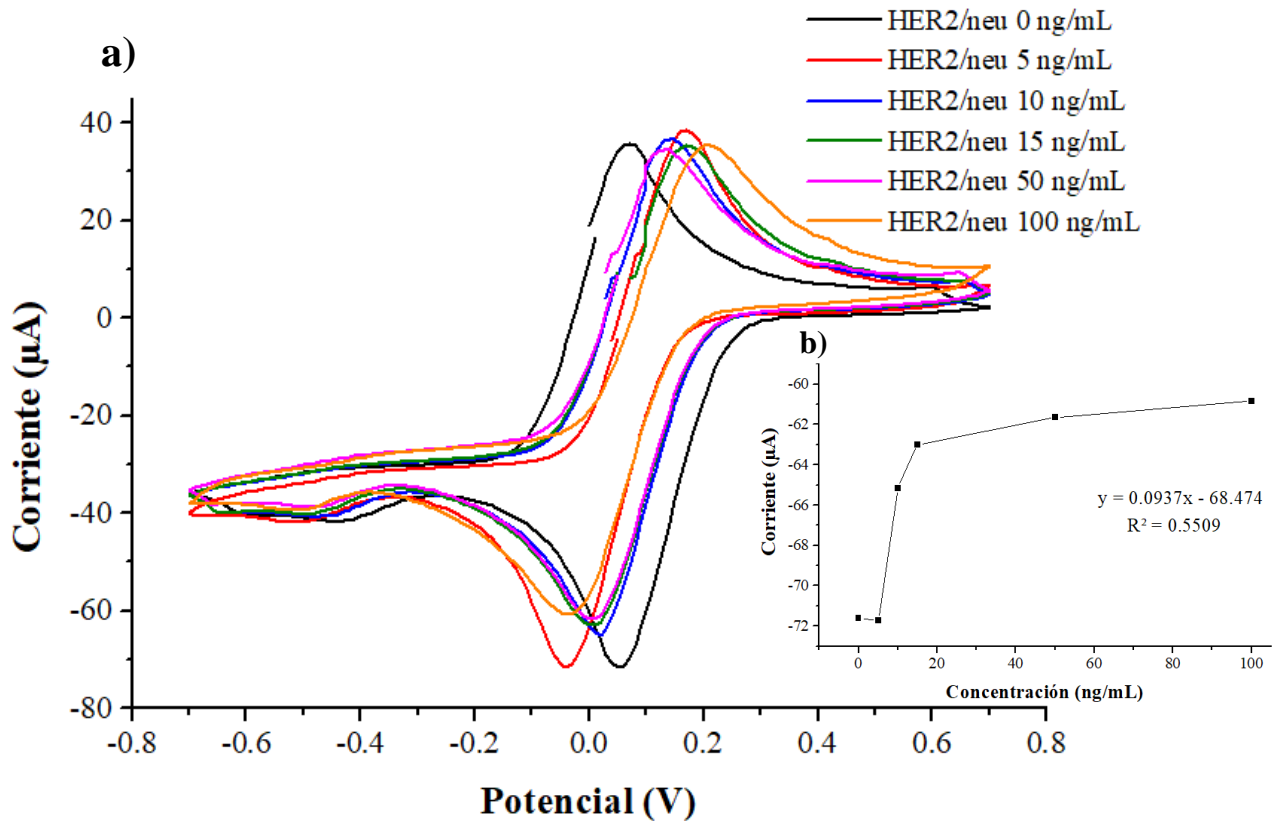


Figura 17. Voltamograma cíclico de la curva de calibración del antígeno tumoral HER2/neu. a) SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA, HER2/neu 0 ng/mL (negro). HER2/neu 5 ng/mL (rojo). HER2/neu 10 ng/mL (azul). HER2/neu 15 ng/mL (verde). HER2/neu 50 ng/mL (rosa). HER2/neu 100 ng/mL (amarillo). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Regresión del potencial de cada concentración del antígeno tumoral HER2/neu en un rango de 0.7 a -0.7 V.

7.3.3 Determinación de la especificidad y sensibilidad del prototipo de biosensor para el antígeno tumoral HER2/neu

7.3.3.1 Análisis del antígeno tumoral HER2/neu en muestras de suero humano

En las figuras 18-21, se puede observar la detección del antígeno tumoral HER2/neu en muestras de suero provenientes de donadores sin antecedentes de cáncer de mama HER2/neu positivo, las cuales fueron adicionadas con concentraciones de la proteína pura de 0 a 100 ng/mL. En las muestras de suero 1, 2 y 3 (Figuras 18-20) se puede observar una tendencia en la disminución de los valores de la I catódica al ir aumentando la concentración del antígeno

tumoral en la muestra de suero. En la figura 21, a pesar de también presentar esta tendencia, los valores de la I catódica son menores que los presentados por las muestras de suero 1, 2 y 3.

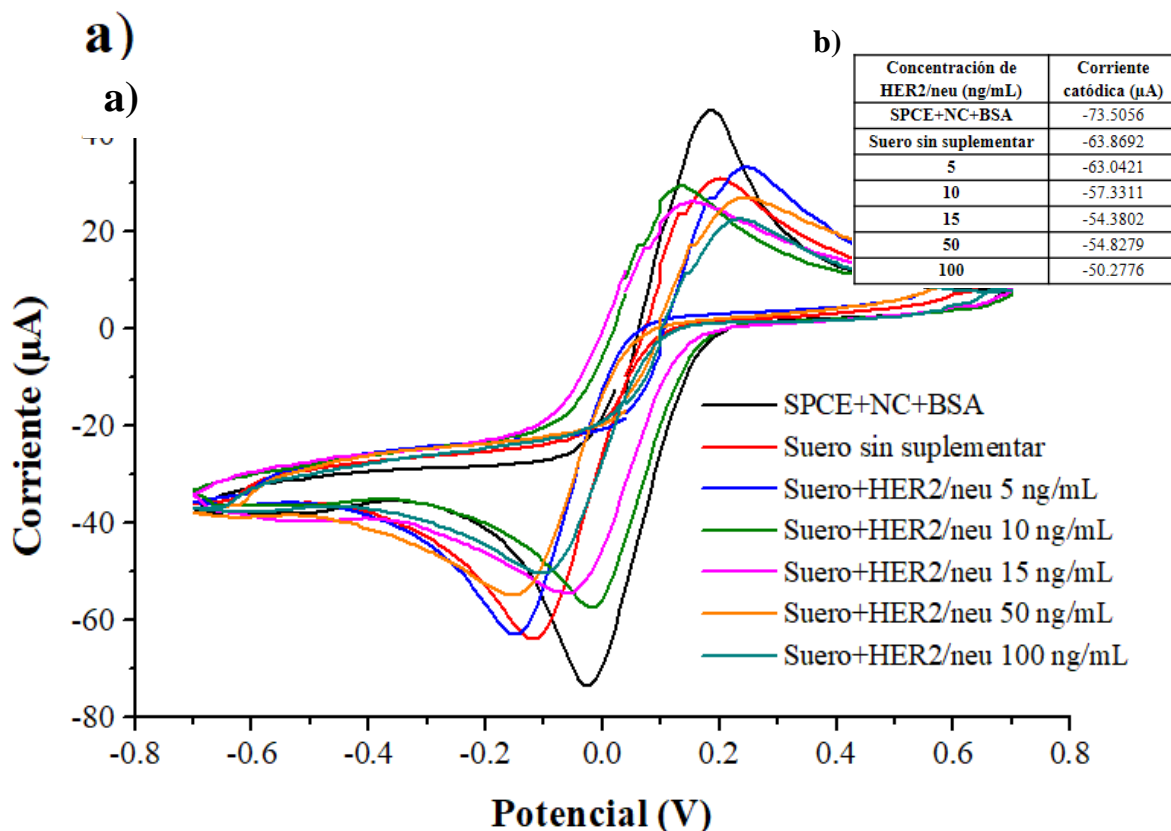


Figura 18. Voltamograma cíclico del análisis del suero 1. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de suero 1 sin suplementar (rojo). Muestra de suero 1 suplementado con el antígeno tumoral HER2/neu: 5 ng/mL (azul), 10 ng/mL (verde), 15 ng/mL (rosa), 50 ng/mL (amarillo) y 100 ng/mL (celeste). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

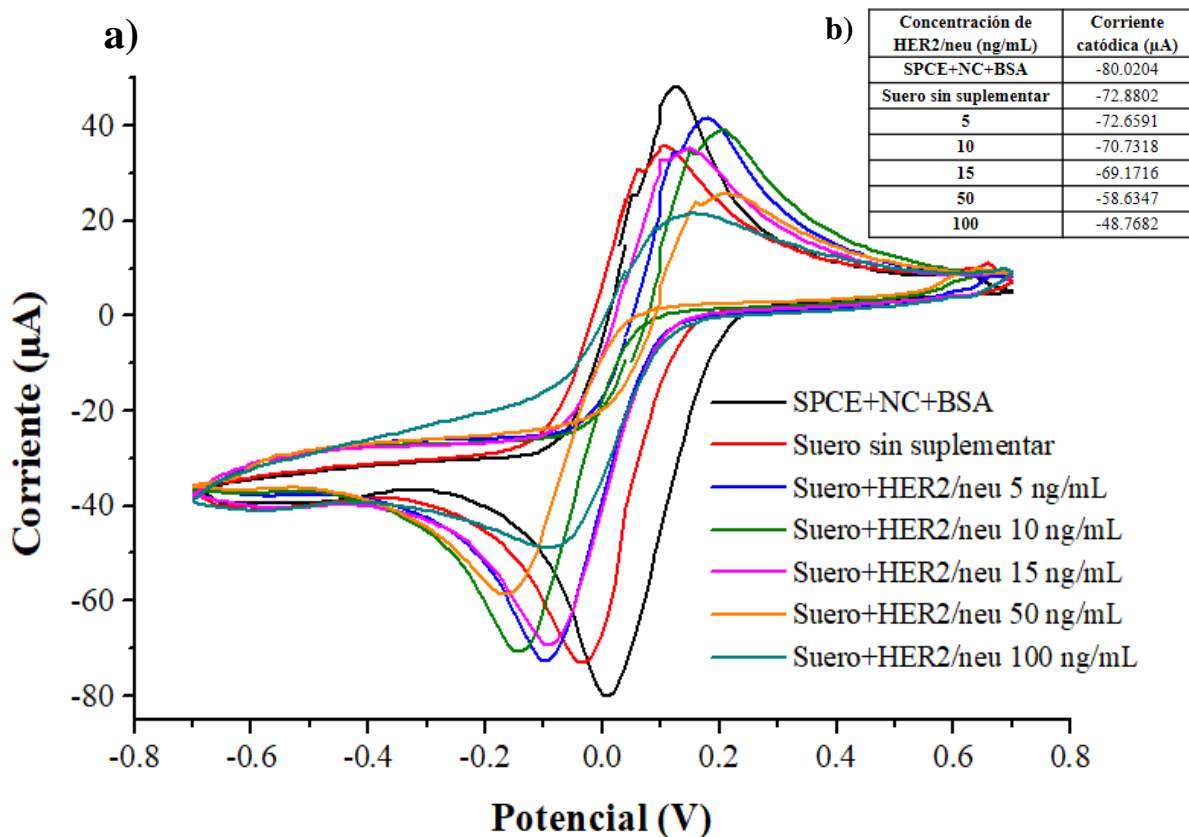


Figura 19. Voltamograma cíclico del análisis del suero 2. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de suero 2 sin suplementar (rojo). Muestra de suero 1 suplementado con el antígeno tumoral HER2/neu: 5 ng/mL (azul), 10 ng/mL (verde), 15 ng/mL (rosa), 50 ng/mL (amarillo) y 100 ng/mL (celeste). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

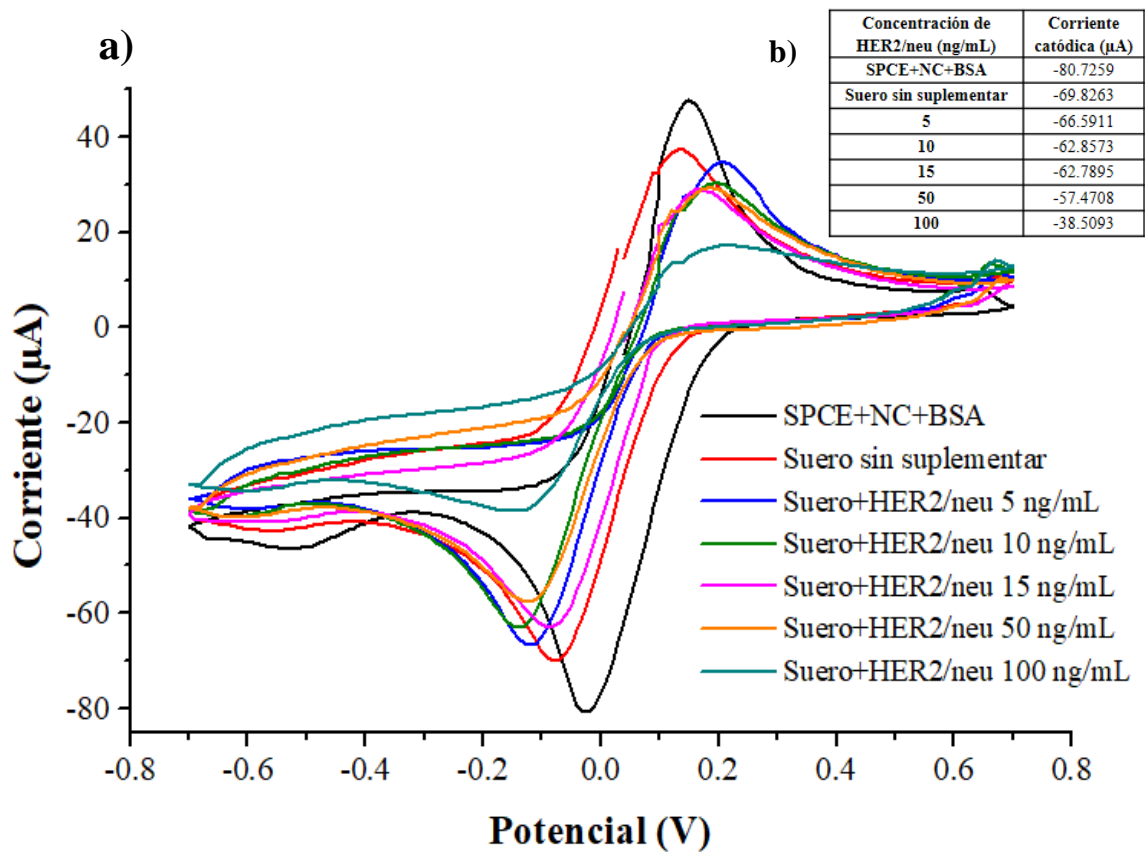


Figura 20. Voltamograma cíclico del análisis del suero 3. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de suero 3 sin suplementar (rojo). Muestra de suero 1 suplementado con el antígeno tumoral HER2/neu: 5 ng/mL (azul), 10 ng/mL (verde), 15 ng/mL (rosa), 50 ng/mL (amarillo) y 100 ng/mL (celeste). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

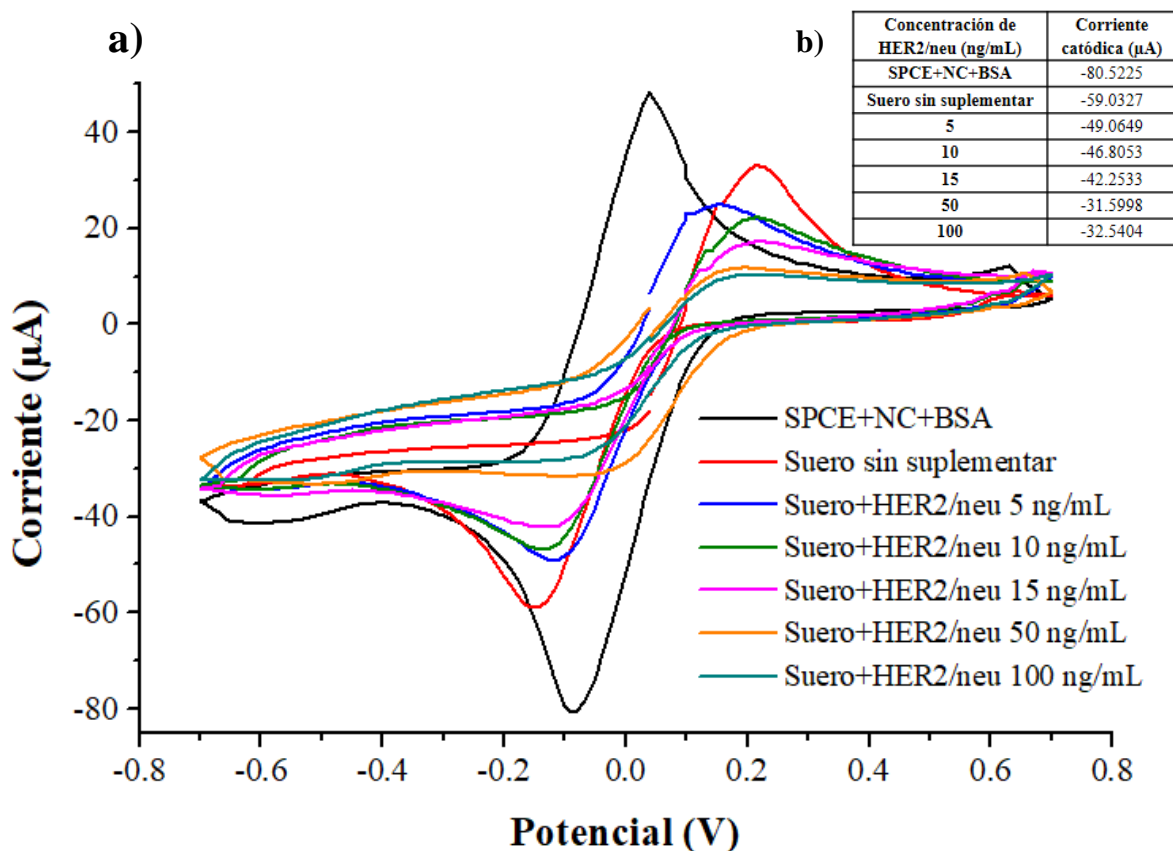


Figura 21. Voltamograma cíclico del análisis del suero 4. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de suero 4 sin suplementar (rojo). Muestra de suero 1 suplementado con el antígeno tumoral HER2/neu: 5 ng/mL (azul), 10 ng/mL (verde), 15 ng/mL (rosa), 50 ng/mL (amarillo) y 100 ng/mL (celeste). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

7.3.3.2 Análisis del antígeno tumoral HER2/neu en líneas celulares

En la figura 22, se observa el análisis de la línea celular SK-BR-3, siendo una línea celular que sobreexpresa el receptor HER2/neu, con el prototipo de biosensor electroquímico. Se obtuvo una tendencia en la disminución de los valores de la I catódica al ir incrementando la concentración de células de 1×10^2 a 1×10^6 , siendo estos de -50.7484 µA a -39.6168 µA respectivamente. En la figura 23, se puede observar el análisis de especificidad del prototipo de biosensor utilizando la línea celular MCF-7 que presenta baja expresión del receptor.

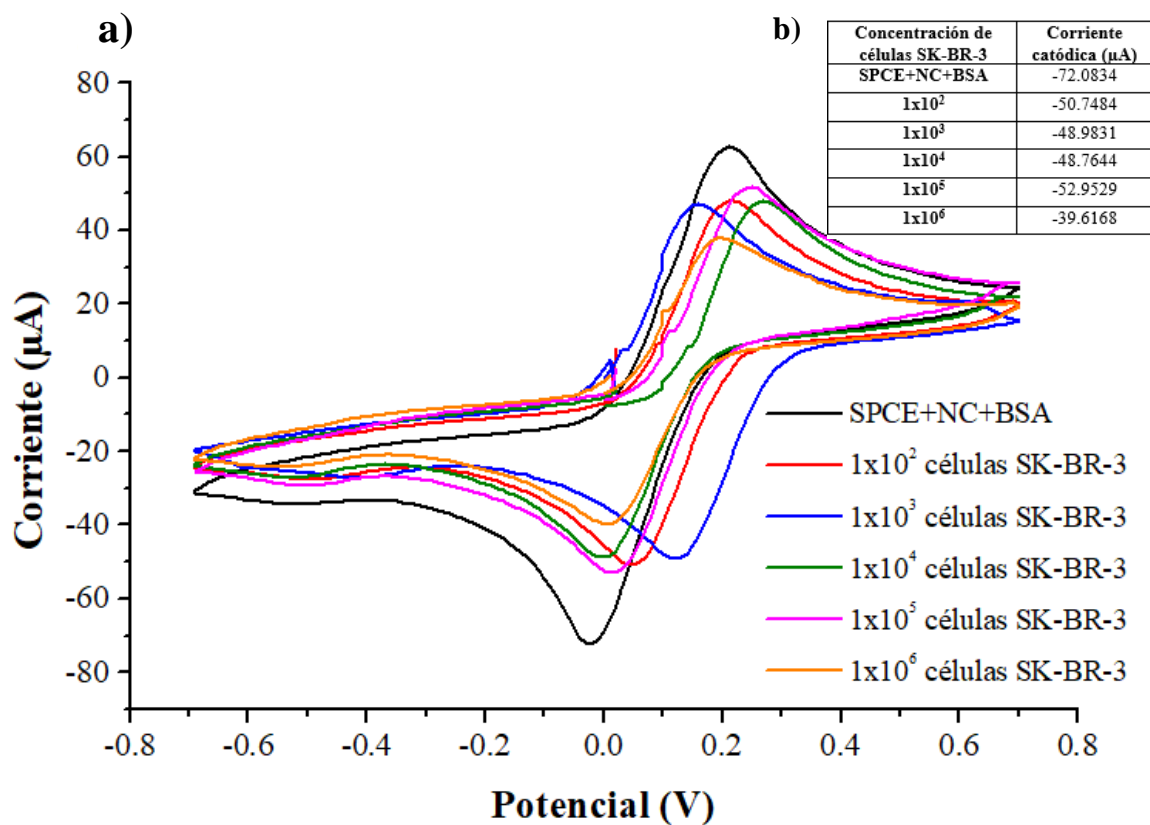


Figura 22. Voltamograma cíclico del análisis de la línea celular SK-BR-3. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de la línea celular SK-BR-3 1×10^2 (rojo). 1×10^3 (azul), 1×10^4 (verde), 1×10^5 (rosa) y 1×10^6 (amarillo). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

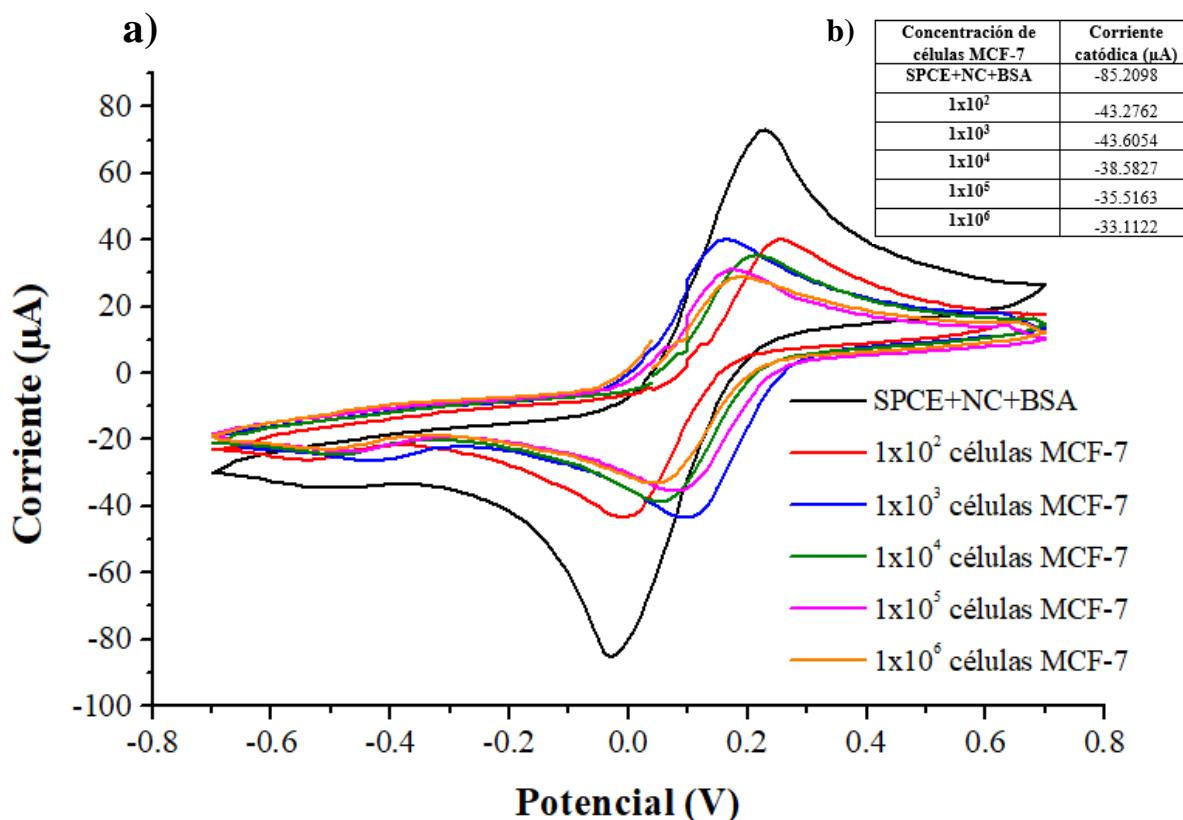


Figura 23. Voltamograma cíclico del análisis de la línea celular MCF-7. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de la línea celular MCF-7 1×10^2 (rojo). 1×10^3 (azul), 1×10^4 (verde), 1×10^5 (rosa) y 1×10^6 (amarillo). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

En la figura 24, se puede observar la concentración mínima de células a la que responde el prototipo de biosensor electroquímico siendo esta de 10 células, obteniendo un valor de la I catódica de $-41.9849 \mu\text{A}$, a diferencia del sistema completo que presenta un valor de corriente catódica de $-85.2098 \mu\text{A}$.

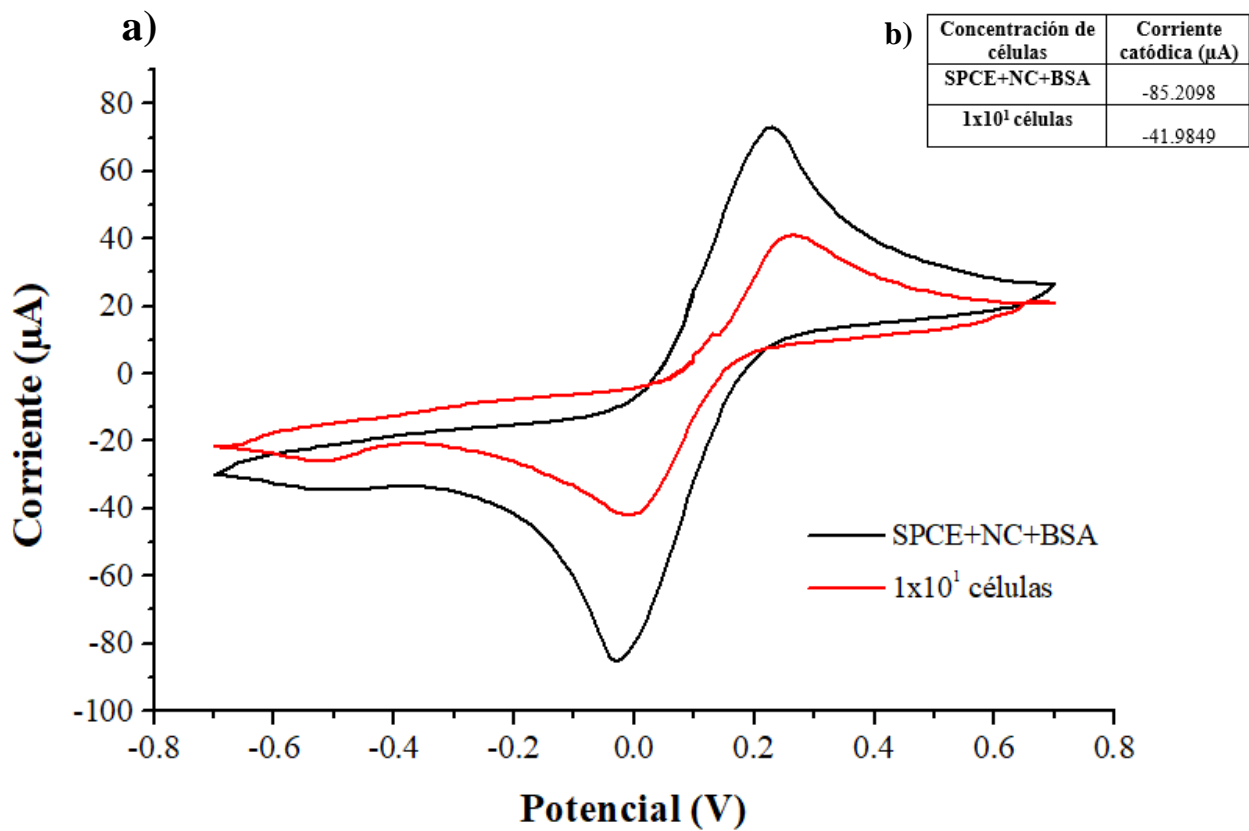


Figura 24. Voltamograma cíclico de la concentración mínima detectable de células. SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA (negro). Muestra de la línea celular a 1×10^1 (rojo). Potencial con ciclos entre 0.7 V y -0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 10.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM). b) Valores máximos de la corriente catódica.

8. DISCUSIÓN

El desarrollo de biosensores para la detección de biomarcadores asociado con la aparición del cáncer ha tenido un auge reciente debido a la integración de elementos bioreceptores en conjunto con nanomateriales en un electrodo de trabajo presente en sistemas SPCE, potenciando sus capacidades y otorgando nuevas propiedades tales como portabilidad, practicidad y bajo costo. Es por esto que en este trabajo se ha implementado el desarrollo de un prototipo de biosensor basado en el acoplamiento de nanoconjugados de anticuerpos y CNPs a la superficie del SPCE con el objetivo de detectar el antígeno tumoral HER2/neu.

Las CNPs con núcleo magnético se obtuvieron en dos pasos, en primera instancia la obtención del núcleo magnético, también conocido como magnetita, y posteriormente la cubierta de carbono, esto siguiendo el método de coprecipitación. Los primeros resultados demostraron obtener una muestra de magnetita homogénea al obtener un valor de Pdl de 0.240, pero con un tamaño elevado de 1,459 nm, según la literatura una muestra es clasificada como homogénea y sin agregados al presentar un valor de índice de Pdl cercano a 0.1 (Nobmann and Morfesis, 2009). Con el fin de disminuir el tamaño promedio de la población de magnetita, se realizaron dos ensayos, el primero fue una incubación por sonicación, puesto a que se sabe que las vibraciones al sonicar una muestra permite la disociación entre las partículas, logrando observar una disminución en el tamaño de las mismas menores a 200 nm, pero con un Pdl de 0.440. El segundo ensayo fue filtrar la magnetita para eliminar aquellas que presentan un gran tamaño, sin embargo, esto ocasionó obtener una población de magnetita muy pequeña, demostrando baja estabilidad, por lo cual los procesos de precipitación no obtuvieron los resultados esperados (Bae et al., 2012).

Con el fin de mejorar el tamaño del núcleo magnético además de realizar una incubación por sonicación, se realizaron distintas modificaciones en el método de coprecipitación, la primera fue la manera en que se adicionó el hidróxido de amonio, el cual es un elemento esencial en la síntesis de nanopartículas por este método, ya que es considerado como el agente precipitante debido a que al agregarse en una solución de iones metálicos este precipita en hidróxido de metal insoluble formando así las nanopartículas (Bae et al., 2012), por otro lado, al disolver las nanopartículas en una solución que presenta un pH 3 también beneficia en su disociación, esto es debido a las altas fuerzas de repulsión al estar altamente cargadas evitando de esta forma la aglomeración (Baalousha, 2009; Rac et al., 2014), al

realizar estas variantes se obtuvieron muestras homogéneas con tamaños menores a 200 nm y con una buena calidad.

Con respecto a la cubierta de carbono, se obtuvieron muestras que presentaba una buena calidad y una alta homogeneidad, sin embargo, estas no presentaban un cambio significativo en el tamaño de la nanopartícula, por lo que se puede determinar que estas no habían sido recubiertas por la glucosa la cual fue utilizada como fuente de carbono. Del mismo modo, los ensayos posteriores presentados en la tabla 1 no fueron satisfactorios.

Con el fin de obtener CNPs con núcleo magnético, se llevaron a cabo las modificaciones anteriores junto con la adición de nitrógeno como gas inerte y una relación de glucosa de 1:25, esto debido a que se ha reportado que la presencia constante de un gas inerte durante la síntesis de nanopartículas ayuda en la condensación de los gases, lo cual beneficia en la esfericidad y homogeneidad de la muestra (Singh et al., 2018), concordando con los resultados obtenidos, del mismo modo, al observar mediante TEM y AFM se logró corroborar la homogeneidad y morfología que presenta la muestra, además se determinó que en partícula unitaria estas presentan un tamaño cercano a 20 nm, a diferencia del trabajo de Bae et al., en el 2012, donde obtuvieron nanopartículas con un tamaño de 90 nm. El valor obtenido del tamaño de las nanopartículas mediante DLS fue mayor que el obtenido mediante TEM, esto es debido al recubrimiento de la superficie de la nanopartícula y a la solvatación del diluyente (Bae et al., 2012). A pesar de los resultados satisfactorios anteriores, no se logró apreciar la cubierta de carbono de las nanopartículas mediante TEM.

Al realizar el análisis por FTIR, podemos observar la ausencia de grupos carboxilo en las nanopartículas los cuales se encuentran en $2,900\text{ cm}^{-1}$ y $3,400\text{ cm}^{-1}$, corroborando de esta manera la ausencia de la cubierta de carbono en su superficie (Lai et al., 2017).

Al no obtener la cubierta de carbono se decidió obtener las nanopartículas a partir del método de síntesis multicore por coprecipitación, esto buscando aumentar la eficiencia de recubrimiento, además un múltiple núcleo de magnetita aumentaría las cualidades paramagnéticas de las nanopartículas. Mediante TEM se logró observar la presencia de una capa de carbón amorfo, asegurando así la presencia de carbono en la superficie, del mismo modo el tamaño y morfología de las nanopartículas obtenidas corresponden con los resultados

reportados por Yuanbi et al., en 2008 presentando un tamaño cercano a los 50 nm con morfología casi esférica.

Al haber obtenido los resultados anteriores, se prosiguió conjugar el anticuerpo con las nanopartículas obtenidas. Se logró observar mediante DLS que el tamaño promedio de la población de los nanocojugados aumentó al adicionar el anticuerpo y se confirmó mediante FTIR la presencia de la cubierta de carbono al determinar la presencia de grupos carboxilos de simple y doble enlace, así como la obtención de los nanoconjugados al determinar la presencia de la formación de enlaces amida entre ambos elementos coincidiendo con lo reportado en la literatura (Desai et al., 2018; Lai et al., 2017).

Al realizar el análisis de la caracterización del sistema SPCE mediante CV, se observó un aumento en el valor de la I catódica al modificar el electrodo de trabajo del SPCE con las CNPs comparado con los resultados del SPCE sin modificar, sin embargo, al ser modificado únicamente con el anticuerpo y con el agente de bloqueo siendo este BSA el valor de la I catódica es menor, esto es atribuible a que el carbono que poseen las CNPs al ser un elemento electroquímico y de presentar mayor área superficial es capaz de aumentar la conductividad eléctrica del sistema facilitando la transferencia de electrones, siendo estos resultados satisfactorios. Al obtener el sistema SPCE modificado con los nanoconjugados y bloqueado con BSA este presenta un valor de la I catódica similar que el que presenta el SPCE modificado únicamente con las CNPs, pero mayor al presentado por el SPCE modificado con el anticuerpo y el BSA, esto es debido a que a pesar que los nanoconjugados presentan elementos como el anticuerpo y el BSA que disminuyen la transferencia de electrones, esta es potenciada por la presencia de las CNPs en los nanoconjugados (Emami et al., 2014; Lai et al., 2017).

Al realizar la curva de calibración del antígeno tumoral HER2/neu mediante CV se puede observar una tendencia a la disminución de la I catódica al ir aumentando la concentración del antígeno tumoral HER2/neu, esto es debido a que los electrones del indicador redox, el cual es el ferrocianuro de potasio, se encuentran retenidos en la inmunoreacción entre el antígeno y el anticuerpo, produciendo una resistencia, evitando la eficiente transferencia de electrones produciendo una disminución en el pico de reducción (Lai et al., 2017; Hartati et al., 2018), sin embargo, se puede apreciar que al añadir la primera concentración del antígeno tumoral de 5 ng/mL no se observa tal efecto pero si un

desplazamiento en el valor de potencial, esto es debido a que al ser una concentración muy baja no es posible observar una disminución en la corriente, por otro lado el desplazamiento observado en el potencial indica la presencia de un elemento añadido en el electrodo, por lo que se requiere de análisis posteriores con técnicas como espectroscopia de impedancia electroquímica para aumentar la sensibilidad del sistema (Desai et al., 2018).

Al determinar la efectividad del prototipo de biosensor en muestras de suero de pacientes que no presentaban antecedentes de cáncer de mama HER2/neu positivo, podemos observar en las cuatro muestras que el valor de la I catódica al adicionar el suero sin suplementar comparado con el valor del sistema completo disminuye en un promedio de $-12.2915 \mu\text{A}$, esto es atribuible a que en el suero se pueden encontrar distintas proteínas como la albúmina, inmunoglobulinas, transferrinas, haptoglobina y lipoproteínas, así como proteínas que son sintetizadas o secretadas de células y tejidos, otras moléculas pequeñas que también pueden ser encontradas en el suero son las sales, lípidos, aminoácidos y azúcares interfiriendo en la transferencia de electrones y de esta manera produce una disminución en la corriente (Adkins et al., 2002), del mismo modo conforme el suero es suplementado con la proteína pura HER2/neu, los valores de la I catódica disminuyen tal como se muestran en los resultados del análisis de la efectividad del prototipo de biosensor concordando con la literatura (Lai, 2017), sin embargo, cabe destacar que la muestra de suero 4 era la que presentaba valores menores en la corriente que los presentados por las primeras tres muestras, esto es debido a que el paciente del cual se le extrajo el suero, semanas posteriores se le detectó cáncer de ovario en etapa 3C con metástasis en vejiga, recto y peritoneo, cabe destacar que el marcador tumoral HER2/neu también puede sobreexpresarse en otros tipos de cáncer entre ellos el cáncer de ovario así como se ha visto relacionado con la metástasis, sin embargo, se requieren pruebas confirmatorias para determinar que la proteína HER2/neu se encuentra relacionada en el desarrollo del cáncer en este paciente (Spiridon et al., 2002; Bast, 2003).

En el análisis de la muestra de la línea celular SK-BR-3 se obtuvo una tendencia en la disminución de la I catódica al ir incrementado la concentración de células, esto es debido a que la línea celular utilizada en este ensayo sobreexpresa el receptor HER2/neu en su superficie, sin embargo, la concentración de 1×10^5 se sale de la tendencia esto pudo deberse a que existen factores que interviene en la reacción antígeno-anticuerpo al ser una unión reversible siendo fuerzas no covalentes, estos factores son la temperatura, proporción

antígeno-anticuerpo, pH, fuerza iónica y tiempo de incubación, por otro lado, la línea celular MCF-7 presentó una menor disminución entre los valores de I catódica al aumentar la concentración de las células debido a que es una línea celular que presenta baja expresión del receptor HER2/neu en su superficie (Bautista-Juárez, 2005; Reverberi and Reverberi, 2007; Liu et al., 2014). Por último, se determinó que la concentración mínima de detección por el prototipo de biosensor es de 10 células determinando ser un sistema sensible.

9. CONCLUSIONES

1. Se estableció un método para producir nanopartículas magnéticas multicore con cubierta de carbono con un tamaño de 50 nm para uso en biosensores SPCE.
2. Se creó un prototipo de biosensor inmunolectroquímico en una matriz SPCE depositando nanoconjugados compuestos de CNP/anticuerpo monoclonal contra HER2/neu.
3. Se caracterizó la reproducibilidad, estabilidad, sensibilidad y especificidad del prototipo de biosensor mediante condiciones controladas de detección de HER2/neu.
4. Se determinó que el biosensor inmunolectroquímico tiene la sensibilidad de detectar 10 ng del antígeno tumoral HER2/neu en muestra de suero humano suplementado con este biomarcador.
5. Se determinó que el biosensor inmunolectroquímico tiene la sensibilidad para detectar 10 células tumorales que expresan HER2/neu en líquido.

10. PERSPECTIVAS

El desarrollo y caracterización del prototipo de biosensor basado en los nanoconjugados de CNPs y anticuerpos anclados a la superficie de un SPCE permitirá la detección específica del antígeno tumoral HER2/neu mediante una prueba rápida y sencilla, sin embargo, hay que aumentar la sensibilidad del prototipo de biosensor para detectar concentraciones menores a 10 ng/mL del antígeno tumoral HER2/neu.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adams GP, Weiner LM. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology*, 23(9):1147–1157.

Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, ... Pounds JG. 2002. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics: MCP*, 1(12):947–955.

Ali J, Najeeb J, Asim Ali M, Farhan Aslam M, Raza A. 2017. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, 8(1):1–9.

Arruebo M, Valladares M, González-Fernández A. 2009. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, 1-24.

Asadian E, Ghalkhani M, Shahrokhian S. 2019. Electrochemical sensing based on carbon nanoparticles: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 293:183–209.

Baalousha, M. 2009. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Science of the Total Environment*, 407(6):2093–2101.

Bae H, Ahmad T, Rhee I, Chang Y, Jin SU, Hong S. 2012. Carbon-coated iron oxide nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging. *Nanoscale research letters*, 7(1):44.

Bast RC. 2003. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10):200–205.

Bautista-Juárez J. 2005. Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 43:9–12.

Buenger D, Topuz F, Groll J. 2012. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 37:1678-1719.

Carney WP, Leitzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A. 2007. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 9(3):207.

Chatterjee K, Sarkar S, Rao KJ, Paria S. 2014. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209:8–39.

Chen T, Zhang X, Qian J, Li S, Jia X, Song HJ. 2014. One-step hydrothermal synthesis of carbon-coated Fe₃O₄ nanoparticles with high adsorption capacity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 25(3):1381-1387.

Colonia A, Rivera J, Orozco J, Marín D. 2015. HER-2: Un marcador molecular usado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1):31–37.

Coronato S, Laguens GE, Spielli OM, Girolamo WD. 2002. Marcadores tumorales en cáncer de mama. *Medicina*, 62(1):73-82.

Desai D, Kumar A, Bose D, Datta M. 2018. Ultrasensitive sensor for detection of early stage chronic kidney disease in human. *Biosensors and Bioelectronics*, 105:90–94.

Emami M, Shamsipur M, Saber R., Irajirad R. 2014. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2–iron oxide nanoparticle bioconjugates. *Analyst*, 139(11):2858–2866.

Giannetto M, Bianchi MV, Mattarozzi M, Careri M. 2017. Competitive amperometric immunosensor for determination of p53 protein in urine with carbon nanotubes/gold nanoparticles screen-printed electrodes: A potential rapid and noninvasive screening tool for early diagnosis of urinary tract carcinoma. *Analytica chimica acta*, 991:133-141.

Global Cancer Observatory 2018. Cancer statistics Mexico. [Online]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

Gordeliy VI. 2002. Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex. *Nature*, 419:484-487.

Hartati YW, Beladona SU, Misonia, Wyantuti S, Gaffar S. 2018. A Voltammetric Immunosensor for Detection of HER2 Using Gold Modified-Screen Printed Carbon Electrode. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 22:294-301.

Hayat A, Marty JL 2014. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. *Sensors*, 14:10432-10453.

Hirsch FR, Franklin WA, Veve R, Varella-Garcia M, Bunn PA. 2002. HER2/neu Expression in Malignant Lung Tumors. In *Seminars in Oncology*, (Vol. 29, No. 1, pp. 51–58).

Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Comunicado de prensa núm. 61/18, “Estadísticas a propósito del Día mundial contra el Cáncer (4 de febrero)” Datos Nacionales, febrero de 2018, [Online]. Disponible en: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf

Ibraheem A, Campbell RE. 2010. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14:30-36.

Iqbal, N, Iqbal N. 2014. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 1-9.

Kara P, de la Escosura-Muñiz A, Maltez-da Costa M, Guix M, Ozsoz M, Merkoçi A. 2010. Aptamers based electrochemical biosensor for protein detection using carbon nanotubes platforms. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4):1715-1718.

Lai HC, Chin SF, Pang SC, Henry Sum MS, Perera D. 2017. Carbon Nanoparticles Based Electrochemical Biosensor Strip for Detection of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Nanomaterials*, 1–7.

Latorre M, Rinaldi C. 2009. Applications of Magnetic Nanoparticles in Medicine: Magnetic Fluid Hyperthermia. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 28(3):227–238.

Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. 2015. Review of Salmonella detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47:264-276.

Lee MH, Thomas JL, Chang YC, Tsai YS, Liu BD, Lin HY. 2016. Electrochemical sensing of nuclear matrix protein 22 in urine with molecularly imprinted poly (ethylene-co-

vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays for clinical studies of bladder cancer diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 79:789-795.

Lim SA, Ahmed MU. 2016. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. *RSC Advances*, 6(30):24995-25014.

Liu F, Zhang Y, Yu J, Wang S, Ge S, Song X. 2014. Application of ZnO/graphene and S6 aptamers for sensitive photoelectrochemical detection of SK-BR-3 breast cancer cells based on a disposable indium tin oxide device. *Biosensors and Bioelectronics*, 51:413–420.

Loo L, Capobianco JA, Wu W, Gao X, Shih WY, Shih WH, Jacks T. 2011. Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain (ECD) in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers (PEMS). *Analytical chemistry*, 83(9), 3392–3397.

Lv N, Kong Y, Liu W, Dai S, Xie X, Xiao X, Guo J. 2011. High serum HER2 extracellular domain levels: correlation with a worse disease-free survival and overall survival in primary operable breast cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(2):275–284.

Misek DE, Kim EH. 2011. Protein Biomarkers for the Early Detection of Breast Cancer. *International Journal of Proteomics*, 9.

Misra R, Acharya S, Sahoo SK. 2010. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 15(19–20):842–850.

Mittal S, Kaur H, Gautam N, Mantha AK. 2017. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and Bioelectronics*, 88:217–231.

Mohamed HM. 2016. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 82, 1–11.

Monošík R, Stred'anský M, Šturdík E. 2012. Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5:109-120.

Mehrotra P. 2016. Biosensors and their applications-A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2):153–159.

Mohanty SP, Kougiannos E. 2006. Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*, 25:35-40.

Molina R, Barak V, Van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Stieber P. 2005. Tumor markers in breast cancer–European group on tumor markers recommendations. *Tumor Biology*, 26(6):281–293.

Mumper RJ, Wang JJ, Claspell JM, Rolland AP. 1995. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. Proceedings International Symposium Control. *Release Bioact Mater's*, 22:178–179.

Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. 2016. Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 7(1):17–20.

Nobbmann U, Morfesis A. 2009. Light scattering and nanoparticles. *Materials Today*, 12(5), 52–54.

Park SG, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, Fu YX. 2010. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*, 18(2):160–170.

Rac O, Suchorska-Woźniak P, Fiedot M, Teterycz H. 2014. Influence of stabilising agents and pH on the size of SnO₂ nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5:2192–2201.

Ramos M, Castillo C. 2011. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *Ide@s CONCYTEG*, 6(72):629–646.

Reverberi R and Reverberi L. 2007. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4):227–240.

Saidur MR, Aziz AA, Basirun WJ. 2017. Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 90:125-139.

Sanvicens N, Marco MP. 2008. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 26(8):425–433.

Sharma S. 2009. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology: Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 30(1):1–8.

Simões FR, Xavier MG. 2017. Electrochemical Sensors. In *Nanoscience and its Applications*, pp. 155–178.

Singh S, Mahajan T, Kaur K. 2018. Synthesis, characterization and effect of increasing nitrogen concentration on the growth of ZnO nanoparticles. *Journal of Material Sciences*, 7(1): 141-151.

Spiridon CI, Ghetie M, Uhr J, Marches R, Li J, Shen G, Vitetta ES. 2002. Advances in brief targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo* 1. *Clinical Cáncer Research*, 8:1720–1730.

Tallapragada SD, Layek K, Mukherjee R, Mistry KK, Ghosh M. 2017. Development of screen-printed electrode based immunosensor for the detection of HER2 antigen in human serum samples. *Bioelectrochemistry*, 118:25–30.

Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. 2001. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:121-131.

Touhami A. 2014. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. In *Nanomedicine*, pp. 374–403.

Tothill IE. 2009. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(1):55–62.

Tsé C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. 2012. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(2):133–142.

Välilä AL, Tilsala-Timisjärvi A, Virtanen E. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. *Food Control*, 55:103-114.

Wang J. 2001. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, 13(12):983.

Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Langer K, Wartlick H, ... Strebhardt K. 2004. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *Journal of Drug Targeting*, 12(7):461–471.

World Health Organization. 2018. [Online]. Cancer. Disponible en: <https://www.who.int/cancer/en/>

Wujcik EK, Wei H, Zhang X, Guo J, Yan X, Sutrave N, ... Guo Z. 2014. Antibody nanosensors: A detailed review. *RSC Advances*, 4(82):43725–43745.

Yuanbi Z, Zumin Q, Huang J. 2008. Preparation and analysis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(3):451-455.

Zhang GJ, Chua JH, Chee RE, Agarwal A, Wong SM. 2009. Label-free direct detection of miRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens Bioelectron*, 24(8):2504–2508.

Zhao F, Yao D, Guo R, Deng L, Dong A, Zhang J. 2015. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Nanomaterials*, 5(4):2054–2130.

Zhou Y, Tang L, Zeng G, Zhang C, Zhang Y, Xie X. 2016. Current progress in biosensors for heavy metal ions based on DNazymes/DNA molecules functionalized nanostructures: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223:280-294.