



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**Coordinación para la Innovación y la Aplicación de la
Ciencia y la Tecnología**

*“Determinación de la concentración de ácido siálico como
biomarcador para diagnóstico de cáncer en población
femenina”.*

Tesis para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias Aplicadas

Presenta:

M. C. Aida Catalina Hernández Arteaga

Asesor:

Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras





Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias

Posgrado en Ciencias Aplicadas



“Determinación de la concentración de ácido siálico como biomarcador para diagnóstico de cáncer en población femenina”.

Asesor

Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras

Sinodales

Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez
UASLP

Dr. Esteban Cruz Hernández
UASLP

Dr. Ricardo Guirado López
UASLP

Dr. Miguel José Yacaman
UTSA
Sinodal Externo

Índice

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS.....	10
AGRADECIMIENTOS	11
RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Espectroscopia Raman	23
2.1.2 Espectroscopia Raman amplificada en superficies “SERS”	25
2.2 El Ácido Siálico	35
2.3 Cáncer de mama	38
3. METAS Y OBJETIVOS	41
3.1 Hipótesis.....	42
3.2 Objetivo General	42
3.3 Objetivos Específicos	42
4. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	43
4.1 Espectroscopia Raman-SERS	44
4.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas	45
4.2.1 Síntesis de nanopartículas.....	45
4.2.2 Caracterización de nanopartículas	46
4.3 Calibración de ácido siálico	47

4.4 Procesamiento de muestras de saliva	52
5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	53
5.1 Primera etapa de resultados	54
5.1.1 Análisis Estadístico	57
5.2 Reproducibilidad de la metodología con diferentes distribuciones de NPs ...	62
5.3 Segunda etapa de resultados	74
6. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO EN OTRO TIPO DE CÁNCER	81
7. CONCLUSIONES.....	89
DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS ESTADÍSTICAS	93
REFERENCIAS.....	100
PRODUCTOS ACADÉMICOS	109
ESTANCIAS Y CONGRESOS	110

Lista de figuras

Figura 2.1 Diagrama de niveles de energía con la representación de las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética. En su decaimiento se emiten tres fotones dando lugar al esparcimiento Rayleigh, y la dispersión Raman (Stokes y anti-Stokes)

Figura 2.2 Proceso de dispersión Raman en ausencia (a) y presencia (b) de nanopartículas metálicas

Figura 2.3 Esquema del mecanismo de transferencia de carga que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS. TC: metal a molécula $E_f \rightarrow$ LUMO (a) y TC: molécula a metal

HOMO \rightarrow E_f (b).

Figura 2.4 Estructura química del Neu5Ac o ácido siálico; a) Modelo químico esquemático; b) Modelo estereográfico con esferas de colores, gris: carbono, rojo: oxígeno, azul: nitrógeno, blanco: hidrógeno.

Figura 2.5 Comparativa del tejido mamario menos denso (A) al más denso (D).

Figura 4.1 Diagrama de medición del equipo Raman XploRA One, Horiba.

Figura 4.2 NPs-Ag en agua desionizada sintetizadas por el método de Turkevich.

Figura 4.3 Esquema de un microscopio electrónico de barrido, mostrando algunos de los componentes más importantes.

Figura 4.4 Imágenes SEM de NPS-Ag reducidas con citrato de sodio mediante el método de Turkevich.

Figura 4.5 Espectros de referencia donde se puede observar el contraste de señales tanto Raman (AS-Sólido) como SERS (AS 200mg/dl-AgNPs) del AS.

Figura 4.6 Substrato de aluminio utilizado para depositar las muestras a medir con capacidad aproximada de 75-80 μ L por cada pozo, en el cual se utilizó la proporción 50 μ L de coloide de NPs-Ag con 25 μ L de AS.

Figura 4.7 Stack de las disoluciones propuestas de AS (a) y comparativa del contraste en intensidades (b).

Figura 4.8 Representación gráfica de la intensidad máxima de 1391 cm^{-1} en función de la concentración de ácido siálico. La línea roja representa la función logarítmica de mejor ajuste para los datos obtenidos. En pequeño se muestran los gráficos de las intensidades de los picos de 1237 y 1002 cm^{-1} en función de la concentración de ácido siálico.

Figura 5.1 Comparación entre el SERS adquirido a partir de soluciones acuosas de ácido siálico a concentraciones de 1, 5 y 10 mg / dl y espectros de ácido siálico medidos en saliva de ocho mujeres sanas.

Figura 5.2 Comparación entre los espectros de SERS del AS a concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg / dl y espectros de ácido siálico medidos en saliva de seis pacientes con cáncer de mama.

Figura 5.3 Gráfica de frecuencia de las concentraciones de ácido siálico con un ancho de intervalo de 1 mg / dl para los controles sanos (barras rojas) y los pacientes con cáncer de mama, independientemente de la etapa del cáncer (barras verdes).

Figura 5.4 Diagrama de caja de la concentración de ácido siálico en grupos de pacientes sanos y afectados. Recuadro: gráfico de nubes de la concentración de ácido siálico de cada participante.

Figura 5.5 Diagramas de caja de las concentraciones promedio y mediana en función del estadio clínico.

Figura 5.6 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 1 (80 ± 30 nm)

Figura 5.7 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 1 (80 ± 30 nm)

Figura 5.8 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

Figura 5.9 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 1.

Figura 5.10 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 2 (65 ± 20 nm)

Figura 5.11 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 2 (65 ± 20 nm)

Figura 5.12 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

Figura 5.13 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 2.

Figura 5.14 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 3 (110 ± 30 nm)

Figura 5.15 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 3 (110 ± 30 nm)

Figura 5.16 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

Figura 5.17 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 3.

Figura 5.18 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 4. Tamaño de distribución de 20 a 150 nm.

Figura 5.19 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 4. Tamaño de distribución de 20 a 150 nm.

Figura 5.20 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

Figura 5.21 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 4.

Figura 5.22 Diagrama de caja de las concentraciones de ácido siálico. Otra vez en rojo: resultados malignos de la biopsia; negro: resultados benignos de la biopsia de los participantes.

Figura 5.23. Análisis de la curva ROC para AS para optimizar el umbral de las concentraciones de ácido siálico para distinguir entre los resultados de los pacientes con biopsia benigna (negativos) y los resultados de la biopsia de cáncer de mama (positivo).

Figura 6.1 Gráfico de nubes de la concentración de ácido siálico de cada grupo de pacientes. Rojo: cáncer de ovario; negro: masa anexial benigna. Insertar: diagrama de caja de la concentración de ácido siálico, nuevamente rojo: cáncer de ovario; negro: masa anexial benigna.

Figura 6.2. Análisis de la curva ROC para AS (y CA-125), para optimizar el umbral de concentraciones de ácido siálico para distinguir entre pacientes con masa anexial benigna y pacientes con cáncer de ovario.

Figura 6.3. Gráfico de AS y CA-125, para ilustrar cómo los valores de corte de las concentraciones de AS y CA-125 distinguen entre pacientes con masa anexial benigna (negro) y pacientes con cáncer de ovario (rojo).

Figura 6.4. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada prueba. La Figura incluye valores de corte e intervalos de confianza para cada biomarcador, así como también para el índice de riesgo de malignidad (IRM).

Lista de tablas

Tabla 1. Comparativa de la concentración de AS mostrada en tres trabajos diferentes en fluidos corporales mediante diferentes técnicas.

Tabla 2. Posibilidad de sobrevivencia por estadio de cáncer de mama en mujeres.

Tabla 3. Asignación experimental de los modos vibracionales en SERS del AS.

Tabla 4. Características de los pacientes que participan en el proyecto. Los datos se presentan como mediana (cuartil inferior a cuartil superior). La prueba U de Mann Whitney se utilizó para las comparaciones.

Tabla 5. Valores de concentración AS: mediana, primer cuartil Q1 y tercer cuartil Q3 de los datos, para cada paciente diagnosticado en una etapa de cáncer.

Tabla 6. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 1.

Tabla 7. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 2.

Tabla 8. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 3.

Tabla 9. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 4.

Tabla 10. Comparativa de los resúmenes de calibración con la medición original de las muestras de saliva.

Tabla 11: Pacientes que participaron en pruebas de detección de cáncer de mama que se sometieron a una biopsia para determinar el cáncer de mama incluido en el estudio. La p representa la significación obtenida para los resultados benignos de NCP (pacientes con casos negativos) y BCP para los resultados de cáncer de mama (positivo), según las pruebas U de Mann Whitney.

Tabla 12. Resultado del análisis ROC para sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos. Las pacientes que participaron en las pruebas de detección de cáncer de mama se agruparon de acuerdo con los resultados de la biopsia para determinar el cáncer de mama

Tabla 13. Pacientes diagnosticados con características de masas anexiales incluidas en el estudio. La p representa la significación obtenida para la masa anexial benigna de BAMP y los pacientes afectados de cáncer de ovario OCP, según las pruebas U de Mann Whitney.

Agradecimientos

Agradecimientos por apoyo económico

Al apoyo financiero de CONACYT a través de la beca # 446208

A la “University of Texas at San Antonio”, San Antonio, Tx, EUA, por el apoyo en la estancia de diciembre de 2014.

Al proyecto de CONACyT, a través del Proyecto Problemas Nacionales 2015-01-986,

Al FAI-UASLP, acceso al Laboratorio Nacional de Análisis Físicos, Químicos y Biológicos-UASLP

A las instalaciones brindadas en el Hospital Central de San Luis Potosí para entrevistar a pacientes con cáncer durante el curso de esta investigación.

A las instalaciones proporcionadas en UNEME DEDICAM en Soledad de Graciano Sánchez SLP, por ayudarnos a seleccionar y entrevistar a los pacientes durante el curso de esta investigación.

Al subsidio del National Center for Research Resources (G12RR013646-12) y del National institute of Minority Health and Health Disparities (G12MD00759) del the National Institute of Health.

Agradecimientos por asistencia técnica

Ing. Alondra Hernández Cedillo

Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván

Dra. Ma. Guadalupe García Valdivieso

Dra. Leticia Carrizales

Dr. José Nieto Navarro

Mtra. Ilse Nayeli Ávila Hernández

Dr. J. Jesús Velázquez Salazar

Dra. Ana Ramírez

Dr. José de Jesús Zermeño

Dr. Marco Ulises Martínez

Mtra. Psic. Judith García de Alba Verduzco

Agradecimientos Personales

Ha llegado el momento de concluir este capítulo de mi vida, lleno de aprendizaje y por el cual estoy infinitamente agradecida:

Ante todo y primero que a nadie le doy gracias a Dios por haberme permitido estar aquí, llena de vida, por haber puesto en mi camino a tantas personas, que sin su apoyo estas palabras no estarían plasmadas aquí.

A mis padres, que los amo con todo mi corazón y quien les debo mi vida, mi formación, mis valores, en resumen, todo lo que soy. Porque con su ejemplo y dedicación me han enseñado a superarme en la vida y a no dejarme vencer ni porque algo esta “chueco”, porque aun y con mis defectos e imperfecciones me han mostrado su infinito apoyo y amor cuando más los he necesitado. Simplemente todos y cada uno de mis logros se los debo a ellos.

A mi esposo Joazet, que siempre me ha llevado de la mano, y aun y cuando quiero darme por vencida encuentra las palabras de aliento que me hacen levantarme porque simplemente es mi complemento, mi pareja ideal, el amor de mi vida, el pilar que me ayuda a que nada alrededor de mí se derrumbe.

A mi hija Julieta que me incita a superarme cada día para poder otorgarle un ejemplo de mujer, a ella que alegra mis tardes de cansancio después de un día de trabajo y que con su sonrisa e inocencia me inyecta de vida para continuar. Y de igual manera a ese par que están por llegar.

A mis hermanos Coco, Luis, Miguel, Rober y Fabi por aguantarme con todo y mi carácter y siempre estar ahí para apoyarme en las buenas y en las malas. Por ser mis amigos y cómplices (cada quien a su manera) y hacer tan amena esta vida con sus risas, corajes y ocurrencias.

A mis tíos y tías que siempre han estado para mí, que me apoyan de todo corazón y no se apartan de mi aun y cuando las situaciones son difíciles.

A mis primos que han sabido ser como unos hermanos más en la vida y siempre apoyando ante todo.

A mis suegros, que desde siempre me recibieron en su familia y me han hecho sentirme parte de ella, porque con su preocupación y cuidados hacia su nieta yo podía trabajar con la serenidad más grande del mundo. Y a mis cuñados que han sido complemento fundamental para sentirme como en familia.

A mis mejores amigos de toda la vida que aun y cuando no logro verlos tan seguido, sé que siempre están ahí para alentarme en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros del cubículo/laboratorio por su apoyo y comprensión durante estos años.

Al Dr. Hugo Navarro por la paciencia que me ha tenido durante estos años y porque creyó en mí, tanto que me dio la oportunidad de formar parte de este gran proyecto y por lo cual le estaré infinitamente agradecida.

Al Dr. Miguel Jose Yacaman, por brindarme el apoyo y la oportunidad de realizar una estancia en la UTSA, y de igual manera hacerme parte de este proyecto.

A mis sinodales que han sido pieza fundamental semestre con semestre para que este trabajo prosperara y pudiera así terminar con éxito.

A los chicos de los veranos de la ciencia (2015, 2016, 2017 y 2018), que fueron de gran apoyo para mi trabajo.

A todos los que de una u otra forma han sido parte de este trabajo y de mi formación.

A todos infinitas Gracias.

Resumen

En el trabajo reciente de Vinogradova et al. han analizado la adsorción de ácido siálico (AS) en nanopartículas de plata cubiertas con citrato mediante espectroscopia Raman con superficie mejorada (SERS). Estos autores han encontrado que la unión de AS conduce a intensidades Raman fuertemente mejoradas que permiten su fácil detección en pequeñas cantidades. Motivados por estos informes previos, hemos decidido examinar los espectros SERS del AS, proporcionando así un enfoque diferente para medir la respuesta Raman de las muestras y una forma alternativa de llevar el AS al SERS. La propuesta es medir las muestras de AS en fase líquida y así se evitarán las contribuciones de posibles entornos atómicos locales complejos que nos permitan distinguir las propiedades de partículas individuales. Al mismo tiempo, la calibración en líquido del AS, nos permite poder comparar con concentraciones de este AS en fluidos biológicos.

En este estudio, también evaluamos la viabilidad del uso de la espectroscopia Raman SERS como un método para la detección de niveles de AS en saliva usando nanopartículas de plata (NPs-Ag) con citrato. Se cuantificaron niveles de AS en saliva mediante SERS y comparándola con una curva de calibración de AS previamente establecida de manera experimental. Establecida esta curva de calibración y su reproducibilidad, se concibió aplicar la metodología desarrollada para medir las concentraciones del AS en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama (BC por sus siglas en inglés) y contrastar con los niveles medidos en mujeres sanas (pacientes control, en la terminología clínica). En una primera etapa del trabajo la concentración media de AS en la saliva de 100 pacientes con cáncer de mama fue significativamente mayor (18.3 ± 9.4 mg / dl) en comparación con 106

controles sanos (3.5 ± 1.0 mg / dl). La prueba SERS mostró una sensibilidad del 94% y 98% de especificidad para diferenciar a los sujetos diagnosticados con cáncer vs las sanas. Nuestros resultados demuestran el potencial de esta técnica de SERS como un método simple, conveniente y altamente sensible para determinar cuantitativamente los niveles de AS en la saliva. La simplicidad de esta prueba nanotecnológica puede ayudar a reducir sustancialmente la mortalidad por cáncer de mama, proporcionando a las mujeres una prueba de detección no invasiva y simple que se puede aplicar independientemente de la edad o la densidad del tejido mamario.

En una segunda etapa se evaluó nuevamente el potencial de la determinación de AS en mujeres que participan en el proceso de detección estándar basado en mamografía y / o ultrasonido para detectar la presencia de cáncer maligno, mediante la misma metodología que en la primera etapa.

Esta segunda prueba se realizó a ciegas, es decir, sin conocimiento previo si las pacientes sujetas a la pruebas en cuestión resultaron positivas (enferma) o negativamente (sanas) afectadas por la enfermedad. Este procedimiento de “chequeo” para diagnosticar una lesión en desarrollo cancerosa, se denomina en la terminología clínica como “prueba de tamizaje”, la cual es más exigente porque se aplica en población abierta, que acude a los exámenes por presentar alguna sintomatología que justifique las pruebas conducentes a una biopsia (mamografía, que son rayos X de la mama, o ultrasonido). La condición de cáncer se determinó después de una biopsia para confirmar la existencia de un proceso maligno en la mama.

La prueba SERS mostró una sensibilidad del 80% y una especificidad del 93% con una concentración de AS de corte para distinguir entre los casos benignos y los casos de cáncer. La concentración de “corte” para distinguir malignidad de benignidad entre tumores

detectados por Rayos X o ultrasonido resultó en 12,5 mg / dL según se estableció a partir de un análisis de curva ROC. Nuestros resultados sugieren que la prueba de la medición de la concentración de AS tiene el potencial de ser un biomarcador útil para detectar cáncer de mama en la población femenina.

Nuestros resultados sugieren que los niveles de AS medidos a partir de la saliva pueden ser buenos predictores de la presencia de cáncer de mama en sensibilidad y en especificidad.

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Actualmente el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muertes por enfermedad a nivel internacional. Desde hace varias décadas, el cáncer de mama se ha incrementado en grado notable alrededor del mundo sobre todo en países occidentales y este crecimiento permanece, a pesar de que existen mejores instrumentos de diagnóstico, diversos programas de detección temprana y mejores tratamientos. [1]

Con un millón de casos nuevos en el mundo cada año, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres y comprende el 18% de todos los cánceres femeninos y es la causa más común de muerte entre las mujeres de 40-50 años. Representa aproximadamente una quinta parte de todas las muertes en este grupo de edad. Hay más de 14 000 muertes cada año, y la incidencia está aumentando. [2]

La Nanotecnología ha proporcionado a la sociedad una serie de nuevos productos capaces de auxiliarnos en la resolución de problemas propios del actual estilo de vida. La incorporación de la nanotecnología a los esfuerzos por luchar contra esta enfermedad se debe a la preocupación internacional por el incremento de la incidencia del cáncer. [3]

La nanotecnología en las ciencias de la salud, se perfila como la de mayor proyección debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. La detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y un preciso seguimiento posterior de su evolución serán posibles en los próximos años gracias a la aplicación de las herramientas nanotecnológicas. [4]

Por otra parte el Ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (AS) ha ganado recientemente el interés como un marcador potencial para una variedad de procesos fisiopatológicos,

aunque en la actualidad no hay suficientes estudios Raman donde se informe sobre esta importante biomolécula [5]. El AS es la forma predominante de la diversidad de ácidos siálicos presentes en los seres vertebrados y casi la única que se encuentra en los seres humanos, y se caracteriza como un ácido orgánico fuerte. [6]

Los niveles elevados de AS, han demostrado ser un rasgo característico en la saliva de pacientes con cáncer de mama y, por lo tanto, se han sugerido como un marcador predictivo no invasivo para los pacientes con este tipo de cáncer. [7] Considerando la importancia de las funciones biológicas y fisiopatológicas del ácido siálico, el desarrollo de métodos simples y sensibles para la detección de este biomarcador está a punto de tener un impacto significativo en una variedad de aplicaciones científicas. [5]

El efecto SERS (Dispersión Raman amplificada por plasmones superficiales) del inglés (Surface-Enhanced Raman Scattering) se descubrió en los años setenta y consiste en un aumento de la dispersión inelástica (señal Raman) de luz, procedente de determinadas moléculas en presencia de una nanoestructura metálica, lisa o rugosa especialmente preparada. [8] La espectroscopia Raman Resonante SERS es una técnica que tiene un gran potencial para la detección altamente sensible de la señal Raman que normalmente es muy débil si se produce por analitos en concentraciones bajas. Para amplificar estas señales se recurre al SERS, en presencia de suspensiones coloidales metálicas, constituidos por partículas en suspensión de tamaño nanométrico. Éstas proporcionan los sustratos más comunes en la técnica SERS debido a su facilidad de preparación y larga vida útil. [9]

Las suspensiones coloidales de plata de tamaño nanométrico son los sustratos SERS más comunes debido a su facilidad de preparación, larga vida útil y al gran factor de mejora de la señal Raman que puede ser excitado desde el UV a la región espectral infrarroja. Uno de

los coloides de plata más utilizados ampliamente se prepara mediante la reducción de nitrato de plata con citrato trisódico. [10][11]

En la literatura existen ya resultados de aplicaciones prometedoras de la espectroscopia Raman en temas biológicos y/o de detección de compuestos contaminantes, y del uso del SERS [12]. En estos temas, es necesario conocer bien la espectroscopia Raman, y tener un buen entendimiento de las propiedades físicas de una nanopartícula (NP), para establecer las condiciones para analizar problemas de carácter biológicos-ambientales, para hacerlos cuantitativos.

CAPITULO 2

2. ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Espectroscopia Raman

En el año de 1928 el físico Hindú Chandrasekhara Venkata Raman describió un fenómeno sobre la dispersión inelástica de la luz que permitió el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares, este fenómeno fue denominado como **efecto Raman**. [13]

La caracterización realizada por espectroscopia Raman básicamente se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 a la muestra sobre la que se desea determinar las características moleculares. Mucho más del 99 % de radiación esparcida presenta la misma frecuencia que la radiación inicial y una proporción muy menor al 1% presenta una diferencia en la frecuencia, lo cual es resultado de la interacción de la radiación electromagnética con la muestra. La luz que al interactuar con la muestra es esparcida con la misma frecuencia ν_0 que la de la radiación incidente se conoce como esparcimiento Rayleigh y no genera información sobre la composición de la muestra. La luz dispersa que presenta diferentes frecuencias a la de la luz incidente, es la que nos brinda información molecular sobre la muestra. Este fenómeno es lo que se conoce como dispersión inelástica de la luz o efecto Raman. Al efectuarse el efecto Raman se generan nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$ (frecuencias Raman) las cuales son características de la naturaleza físico-química del material pero independientes de la radiación incidente[14]. Los cambios de frecuencia que originan las bandas Raman son correspondientes a variaciones de energía. Las moléculas están sometidas a constantes movimientos tanto vibracionales como rotacionales, por lo que se puede determinar la frecuencia de oscilación en función de la masa y la carga de las moléculas, ya que a cada uno de los movimientos

vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular[15]. El efecto Raman es el resultado de la interacción fotón-molécula que es dispersado a diferente frecuencia que la incidente y este a su vez puede dividirse en dos fenómenos:

- 1.- Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente ($\nu_0 - \nu_r$), se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula, este fenómeno es conocido como Raman Stokes.
- 2.- Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente ($\nu_0 + \nu_r$), se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón, este fenómeno es conocido como Raman anti-Stokes.

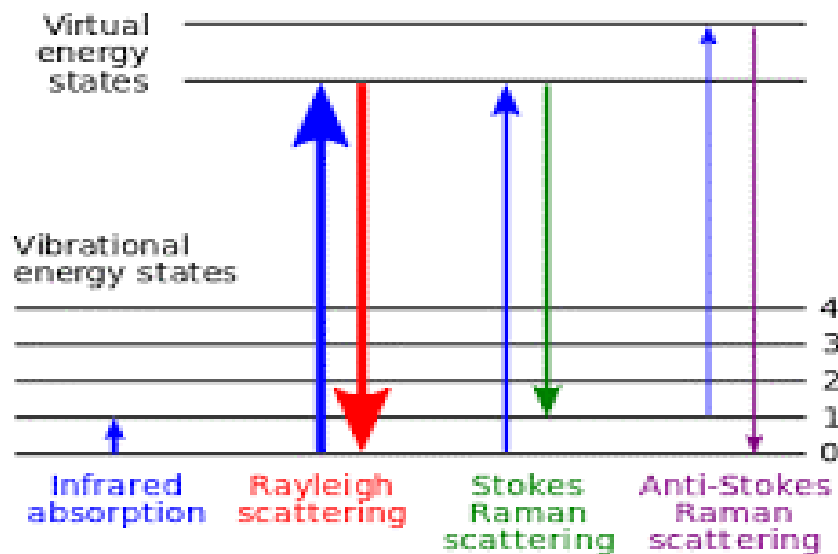


Figura 2.1 Diagrama de niveles de energía con la representación de las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética. En su decaimiento se emiten tres fotones dando lugar al esparcimiento Rayleigh, y la dispersión Raman (Stokes y anti-Stokes) [16].

La técnica de Raman es muy utilizada en áreas como ingeniería de semiconductores para la identificación de los materiales y en química para la identificación de moléculas. Esta técnica se basa en hacer incidir sobre la muestra un haz de radiación monocromática para producir esparcimiento elástico e inelástico de la luz provocado por dicha muestra. El análisis realizado mediante esta técnica es no invasivo y no destructivo además de que la muestra no necesita alguna preparación previa y por ende la muestra no sufre ninguna alteración al ser analizada. La radiación incidente interactúa con la materia y genera cambio de energía en los orbitales de los átomos de la muestra, esta radiación crea un nuevo estado llamado “estado virtual”. Como este nivel de energía no es un estado estable, se reemite un fotón rápidamente. En este procedimiento se presentan dos tipos de esparcimiento, esparcimiento elástico conocida como esparcimiento Rayleigh y esparcimiento inelástico conocido como esparcimiento Raman. El suceso con mayor probabilidad es el esparcimiento Rayleigh, éste no cambia la longitud de onda de la radiación reemitida. Una pequeña parte de la radiación reemitida a diferente longitud de onda es debido al esparcimiento inelástico, dicha radiación es conocida como esparcimiento Raman. En este caso, el proceso de esparcimiento induce movimiento molecular y, consecuentemente, se puede presentar un intercambio de energía de fotón-molécula y viceversa. El esparcimiento Raman es un proceso muy poco probable ya que solo una millonésima parte de los fotones incidentes son esparcidos de manera inelástica [17].

2.1.1 Espectroscopia Raman amplificada en superficies “SERS”

El efecto SERS fue descubierto por Martin Fleischmann, Patrick J. Hendra y A. James McQuillan en el Departamento de Química de la Universidad de Southampton en Reino Unido en 1974 [18], al intentar registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo

de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción. Aunque en un primer momento se creyó que la intensificación Raman era debida al incremento del área superficial producida por el proceso redox, posteriormente se pudo demostrar que éste no podía ser el único efecto presente, y que estaba actuando un fenómeno nuevo y desconocido que dio lugar al nacimiento en 1977 de la espectroscopia SERS [19][20]. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios teóricos y experimentales para explicar este fenómeno.

El efecto SERS consiste en un aumento de la dispersión inelástica (señal Raman) de luz, procedente de determinadas moléculas en presencia de una nanoestructura metálica, lisa o rugosa especialmente preparada.[21] Sin embargo, a lo largo de los años se ha establecido claramente que la dispersión Raman de una molécula se puede potenciar cuando se coloca cerca de una nanopartícula metálica (plasmónica), lo que conduce al llamado efecto SERS. Las mediciones SERS de sistemas moleculares pequeños conducen a mejoras de señal que van desde 10^6 a 10^{12} debido al fuerte campo local que surge de la excitación de plasmón, llamado mecanismo electromagnético (EM), combinado con la interacción química directa entre la molécula y la superficie metálica. [22][23]

Los plasmones poseen energías discretas de manera que las transiciones electrónicas entre las mismas, dan lugar a la extinción (absorción + dispersión) de la luz incidente.[24] La resonancia plasmónica necesaria para que el efecto SERS se lleve a cabo depende de gran medida de la función dieléctrica del metal y de la forma y tamaño de las nanopartículas; los substratos SERS activos para tener un buen factor de amplificación deben estar en un intervalo dimensional de entre 5 y 10 nm. [25].

Para explicar el efecto SERS se han propuesto un gran número de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, actualmente se acepta la existencia principalmente de dos

contribuciones al fenómeno SERS: mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (TC) [15]. Así, se considera que el mecanismo EM debe estar presente en toda la experiencia SERS suficientemente intensa, mientras que el mecanismo TC puede o no participar, dependiendo de las condiciones. Sin embargo, no existe un acuerdo definitivo acerca de la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total. [25]

Mecanismo de Intensificación Electromagnética (EM)

El efecto SERS está determinado por tres componentes principales: la molécula, la nanoestructura metálica y la radiación electromagnética [26]. La absorción y dispersión de la luz por las nanopartículas metálicas (cuyo tamaño debe de ser menor que longitud de onda de la luz) se considera la propiedad más importante que da lugar al efecto SERS. La posición de la frecuencia de oscilación plasmónica en el espectro electromagnético está determinada por la función dieléctrica del metal, o permitividad, y por la forma y el tamaño de la NP. Para una NP suficientemente pequeña, todas las transiciones electrónicas interbandas se consideran insignificantes excepto el plasmón asociado al dipolo (aproximación dipolar). Estos sistemas con electrones libres o casi libres presentan un tipo determinado de excitación, correspondiente al plasmón de superficie. La resonancia plasmónica es de tal naturaleza que cuanto más libres se encuentran los electrones, más estrecha e intensa es la resonancia plasmónica dipolar. [25]

La radiación dipolar emitida por la NP consigue llegar a un estado estacionario unos femtosegundos después de la iluminación del láser y es caracterizada por una distribución espacial de las magnitudes del campo, donde la intensidad de la radiación es nula en

algunas regiones del espacio circundante de la NP, mientras que en otras regiones cerca del metal se amplifica [27] [28]. Puesto que el efecto SERS está relacionado con la existencia de una geometría rugosa en la superficie metálica, el modelo EM puede simplificarse considerando la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_0 incide sobre una nanopartícula. En la fig. 2.2 se muestra un esquema del fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y presencia de NPs metálicas.

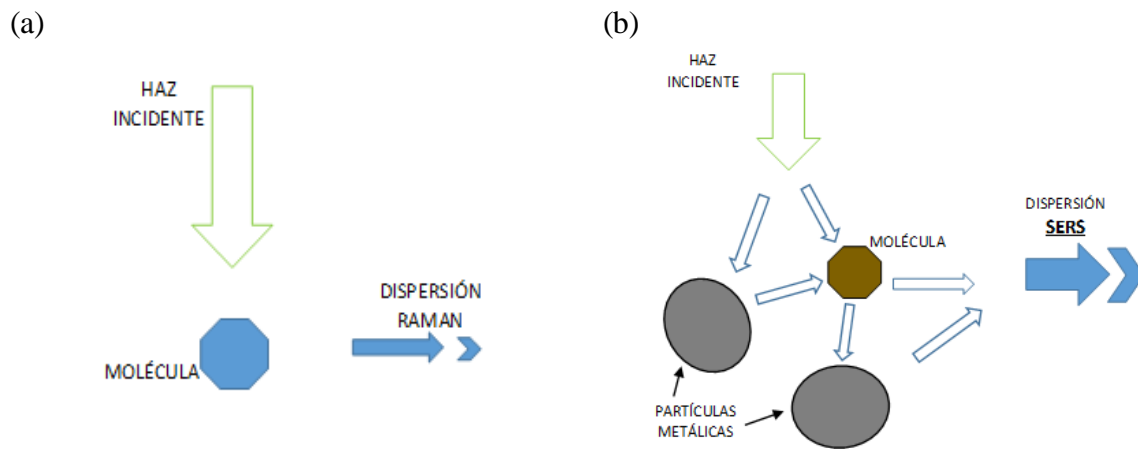


Figura 2.2 Proceso de dispersión Raman en ausencia (a) y presencia (b) de nanopartículas metálicas

La gran intensificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales:

1) Intensificación del campo EM incidente sobre la molécula: la intensidad del campo EM que incide sobre la molécula situada en la posición r' está compuesta por la intensidad del campo E_0 de la radiación láser a la frecuencia ω_0 y la del campo a la misma frecuencia dispersado por el propio metal E_s . Por lo tanto, el campo eléctrico total que incide sobre la molécula en r' será:

$$E_{tot} r', \omega_0 = E_0 r', \omega_0 + E_s r', \omega_0 \quad (2.1)$$

Cuando la frecuencia ω_0 se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, el campo dispersado E_s resulta ser mucho mayor y la expresión anterior se puede aproximar a:

$$E_{tot} r', \omega_0 \approx E_s r', \omega_0 = gE_0 r', \omega_0 \quad (2.2)$$

donde g es la amplificación del campo EM por parte de la NP metálica. Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $p r', \omega_0$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . El momento dipolar puede ser expresado en función de la polarizabilidad de la molécula:

$$p r', \omega_0 = \alpha_R E_{tot} r', \omega_0 \quad (2.3)$$

La radiación Raman dispersada por la molécula tendrá así un campo eléctrico de intensidad E_R proporcional a $\alpha_R E_s$.

2) Intensificación de la Radiación Raman: la radiación Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada a su vez por la NP, de la misma forma que la radiación láser, con un factor g' (que indica la intensificación del campo a la longitud de onda Raman, ω_R , la cual puede diferir del valor a la longitud de onda incidente ω_0). De este modo el campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición r (detector), es una composición del campo dispersado directamente por la molécula de intensidad $E_R(\omega_R)$ mientras que el campo dispersado por la NP cuando son excitados los plasmones superficiales su intensidad es $E_{RS}(\omega_R)$:

$$E_{SERS}(\mathbf{r}, \omega_R) = E_R(\mathbf{r}, \omega_R) + E_{RS}(\mathbf{r}, \omega_R) \quad (2.4)$$

En condiciones de resonancia plasmónica, la amplitud total del campo dispersado será:

$$E_{SERS} \approx E_{RS} \propto g' E_R \propto g' \alpha_R E_S \propto g g' \alpha_R E_0 \quad (2.5)$$

Y la intensidad SERS será proporcional al cuadrado del módulo de E_{SERS} :

$$I_{SERS} \approx g g'^2 \alpha_R^2 I_0 \quad (2.6)$$

Donde I_0 es la intensidad del campo incidente. Para bandas de bajo número de ondas, es decir, cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, $g \sim g'$ y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente g^4 .

Se puede definir un factor de intensificación G o también asignado como F_I de la siguiente manera:

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} = \frac{\alpha_R^2}{\alpha_{R0}^2} g g'^2 \quad (2.7)$$

Donde I_{Raman} es el valor de la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente en ausencia del metal y α_{R0} la polarizabilidad Raman en ausencia del metal [21][23] [29].

Resumiendo el significado de la ecuación 2.6 se puede decir que:

- La mayor contribución al efecto SERS procede de la dispersión por parte del metal, más que por parte de la molécula, cuyo espectro Raman se ve de todos modos reflejado en el espectro SERS de la luz dispersada por el metal.
- La intensidad SERS depende de g^4 . Esta dependencia es clave para entender las poderosas amplificaciones que el SERS produce. Es por ello que para NPs de plata con un máximo del plasmón a 400 nm, g es ~ 30 , pero se produce una amplificación $G \sim 8 \times 10^5$, suponiendo que la polarizabilidad Raman no cambia respecto a la de la molécula aislada [30].
- La polarizabilidad Raman de la molécula puede alterarse drásticamente con respecto a la de la molécula aislada (variando su magnitud, simetría y propiedades de resonancia) cuando interacciona directamente con el metal. Esto resulta particularmente evidente en sistemas molécula/metal donde se realizan procesos de TC.

El valor de G depende de varios factores: i) de la morfología de la partícula metálica, ii) de la distancia a la superficie r y iii) de la permitividad dieléctrica del metal (ε) y del medio que lo rodea (ε_0). El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de 10^6 , que coincide en gran medida con los valores de G obtenidos experimentalmente. Es por ello que se puede concluir que el factor de intensificación debido al efecto SERS depende de: la forma y tamaño de las nanopartículas y de la distancia a la que se encuentra la molécula sobre la superficie metálica (1-10 nm de distancia) ya que es una técnica de corto alcance [26] [31]

En el caso de la esfera, el campo eléctrico externo disminuye con la distancia según

$\frac{R}{(R + d)^2}$, donde R es el radio externo de la NP y d es la distancia al centro de la NP.

Los resultados experimentales indican que la intensificación resulta detectable para distancias menores de $\sim 100 \text{ \AA}$ [21] [26]. El enorme gradiente del campo EM existente sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales con los relacionados con los grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal.

El efecto SERS posee unas reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopia Raman convencional y pueden ser explicadas dentro del marco del modelo EM. Estas reglas operan sobre los modos vibracionales permitidos en Raman, de manera que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos y menos intensos. En el exterior de la partícula metálica responsable del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralela o longitudinalmente (E_t) y perpendicular o transversalmente (E_n) a la superficie metálica, no poseen el mismo valor relativo. La relación que guardan ambas magnitudes depende de la longitud de onda de excitación; así, a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple que $Re(\varepsilon) \approx -2$, de donde se deduce que $E_n \approx 4E_t$. Esta característica constituye una herramienta de una gran utilidad en la determinación de la orientación de la molécula sobre la superficie, ya que los modos vibracionales perpendiculares a la superficie se ven más intensificados que los modos orientados en dirección paralela [32], [33].

Mecanismo de Transferencia de Carga

El mecanismo de transferencia de carga (TC) contribuye también en la producción del efecto SERS a través de un proceso semejante al que produce la Resonancia Raman.

El mecanismo TC transcurre mediante un proceso fotoinducido que implica la transferencia de un electrón del nivel de Fermi (E_f) hacia el orbital LUMO (de sus siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) orbital molecular no ocupado de más baja energía de la molécula adsorbida sobre la superficie del metal, ver la fig. 2.3(a).

También puede ocurrir el proceso contrario, en el que el electrón va del orbital HOMO (del inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) orbital molecular ocupado de más alta energía hacia el nivel de Fermi del metal, fig. 2.3(b) [34].

La nube electrónica del analito puede distorsionarse cuando se produce una adsorción directa sobre el metal. Cuando la energía de esta interacción es débil (fisorción), la modificación de la polarizabilidad del analito α es pequeña y podemos esperar que el espectro SERS se parezca al espectro Raman normal. La fisorción puede inducir una orientación molecular fija que, teniendo en cuenta la fuerte polarización del campo local, implica una diferente intensificación de los modos vibracionales dependiendo de su simetría. Por el contrario, cuando la entalpía de absorción es muy negativa y comparable a las energías de un enlace químico (quimisorción), la alteración del volumen de la nube electrónica del adsorbato es significativa, sobre todo en el caso de moléculas pequeñas, y lo que obtenemos es una “nueva” molécula o complejo superficial, con diferente simetría y nuevos estados electrónicos. Además, desde el punto de vista de la intensificación de la señal, la absorción directa sobre la superficie proporciona el máximo factor de intensificación SERS, dando origen al “efecto de la primera capa”. Se trata de un fenómeno limitado a especies situadas en la primera capa de absorción, la que involucra moléculas en

contacto directo con la superficie metálica. En estas condiciones la intensificación SERS global se debe tanto al efecto multiplicativo del mecanismo EM como a la intensificación generada por una transición de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, o viceversa [25], [35].

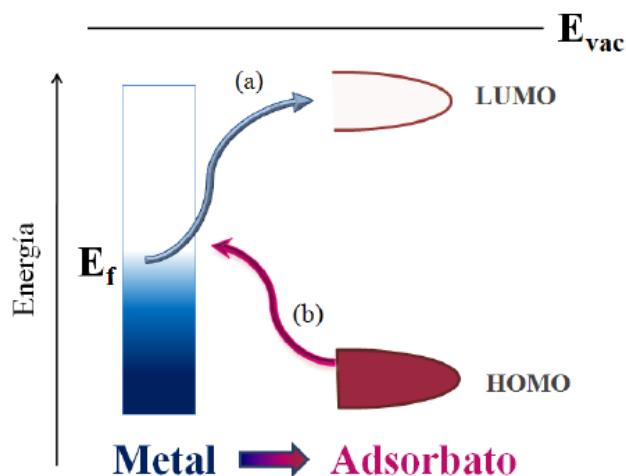


Figura 2.3 Esquema del mecanismo de transferencia de carga que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS. TC: metal a molécula $E_f \rightarrow$ LUMO (a) y TC: molécula a metal $HOMO \rightarrow E_f$ (b). [34]

La existencia de transferencia de carga es función de la naturaleza del adsorbato y del metal. La morfología de la superficie metálica influye notablemente en la contribución del mecanismo TC a la intensificación global SERS, ya que este mecanismo tiene lugar mayoritariamente en puntos de la superficie en los que existen rugosidades superficiales a escala atómica, llamadas “*adatoms*”[36]. Estos sitios activos constituyen el lugar donde ocurre con más probabilidad la transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, por lo que se supone que la fracción de moléculas adsorbidas que contribuyen a la intensificación SERS mediante transferencia de carga es relativamente pequeña [25].

Así, a medida que se ha estudiado y conocido el funcionamiento del efecto SERS, se ha comprendido que el SERS es una intensificación de la radiación Raman llevada a cabo por la presencia de nanoestructuras, más que una intensificación superficial. Este conocimiento se ha puesto de manifiesto gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la Ciencia de Materiales. Por tal motivo, las superficies metálicas empleadas en espectroscopia SERS deben cumplir ciertos requisitos con respecto a su morfología como anteriormente se ha mencionado[37].

2.2 El Ácido Siálico

Los ácidos siálicos están presentes en todos los vertebrados como componentes terminales de cadenas de oligosacáridos de mucinas, glicoproteínas y glicolípidos y han sido reconocidos como involucrados en la regulación de una gran variedad de fenómenos biológicos. En los seres humanos que se producen en los fluidos corporales (plasma sanguíneo, la leche materna, el líquido sinovial, el sudor, secreciones de la vesícula biliar, los jugos gástricos y orina) y tejidos (eritrocitos, leucocitos, plaquetas, glándulas salivales, garganta, estómago, cuello del útero, el cartílago, colon, etc.) [38]. Las concentraciones de ácido siálico en los fluidos corporales pueden reflejar el estado metabólico y se han reconocido como un marcador biológico para una variedad de procesos fisiopatológicos. Por ejemplo, la concentración de ácido siálico de plasma está fuertemente relacionada con la presencia de complicaciones microvasculares en la diabetes tipo I [39] y un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. [40]. Los componentes de ácido siálico normalmente ocupan posiciones terminales de carbohidratos complejos tanto dentro como fuera de las áreas de las membranas celulares particularmente en las Mucinas, Glicoproteínas y Glicolípidos[6].

La familia del ácido siálico incluye 43 derivados del azúcar (o carbohidrato) de 9 carbonos el ácido neuramínico $C_9H_{17}NO_8$, normalmente se encuentra como componente de cadenas oligosacáridos de mucinas, glicoproteínas y glicolípidos [41].

El ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) es la forma predominante de ácido siálico (AS) y casi la única forma que se encuentra en los fluidos corporales y tejidos humanos [42]. La fórmula química $C_{11}H_{19}NO_9$ y la estructura de ácido siálico se presentan en la Figura 2.4. La molécula de AS está compuesta por un anillo de piranosa que consta de cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno, un N-acetil (N- CH_3CO), un grupo carboxilo (CO-OH) y una "cola" de glicerol (- $C_3H_7O_3$) [43].

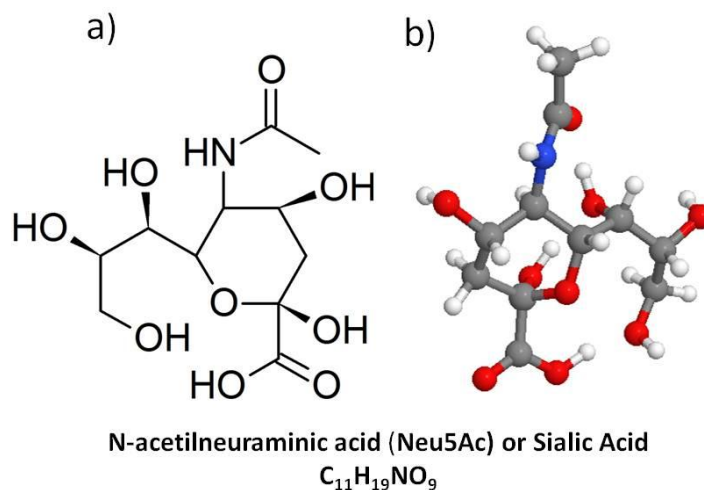


Figura 2.4 Estructura química del Neu5Ac o ácido siálico; a) Modelo químico esquemático; b) Modelo estereográfico con esferas de colores, gris: carbono, rojo: oxígeno, azul: nitrógeno, blanco: hidrógeno.

Existe en la literatura investigaciones que muestran afecciones detectadas mediante el incremento de Ácido siálico en fluidos corporales. En la tabla 1, se muestra una comparativa de las concentraciones de AS con respecto a varias afecciones tanto en suero como en saliva.

N. Stefenelli. J. Cancer Res. Clin. Oncol (1985) 109 55. EN SUERO				
Afección	Concentración mmol/ml =mM	±	Concentración mg/dl	±
Normal	1.89	0.23	58.5	7.1
Cirrosis hepática	2.18	0.47	67.4	14.5
Neumonía	3.02	0.66	93.4	20.4
Otras Enfermedades Inflammatorias	2.83	0.57	87.5	17.6
Artritis Reumatoide	3.05	0.71	94.3	22.0
Otras Enfermedades	2.24	0.39	69.3	12.1
Diferentes Neoplasias				
Mama	2.58	0.61	79.8	18.9
Útero	3.22	0.69	99.6	21.3
Pulmón	3.29	0.73	101.7	22.6
Colon/Recto	3.08	0.69	95.3	21.3
Estómago	2.93	0.67	90.6	20.7
Próstata	2.85	0.7	88.1	21.6
A. Hogan-Ryan. Br. J. Cáncer (1980) 41, 587. EN SUERO				
Normal	1.65	0.1	51.0	3.1
Mama	2.86	0.5	88.5	15.5
Leyla Koc Öztürk. Medicinal Chemistry (2011) 7, 443. EN SALIVA				
Normal	0.15	0.03	4.7	1.0
Cáncer de Mama	0.37	0.15	11.4	4.5

Tabla 1. Comparativa de la concentración de AS mostrada en tres trabajos diferentes en fluidos corporales mediante diferentes técnicas[44], [45], [7].

Los métodos más ampliamente utilizados para la determinación del ácido siálico en la saliva son el método ácido de la ninhidrina descrito por Yao K. [46] y el ensayo del ácido tiobarbitúrico modificado por Skoza L [47], que han pasado la prueba del tiempo. En estudios publicados en los últimos años, la determinación de ácido siálico en la saliva continúa siendo realizada con estos métodos [48] [49]. Sin embargo, la determinación de ácido siálico por SERS es una tecnología de enfoque novedosa que requiere menos reactivos y podría ser útil en el diagnóstico clínico ya que es altamente sensible, rápida y barata, el equipo puede ser portátil y los resultados pueden obtenerse en tiempo real [50]. Existen algunos estudios que utilizan SERS para la formación de imágenes de ácidos siálicos en células vivas [51], [52], pero, hasta donde sabemos, no hay informes comparativos entre SERS en aplicaciones relativas a su uso para detectar los niveles presentes de la molécula de AS en fluidos humanos o su aplicación sistemática para detectarlos en poblaciones humanas.

2.3 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la malignidad más frecuente para las mujeres en el mundo, y es la causa de más de 520,000 muertes por año; es la segunda causa principal de muerte por cáncer entre las mujeres, siendo superada únicamente por el cáncer de pulmón [53], [54]. La detección temprana del cáncer de mama, combinada con una intervención médica agresiva e inmediata, es esencial para reducir sustancialmente las tasas de mortalidad por cáncer de esta malignidad.

Los métodos de detección reales para el cáncer de mama, como la mamografía de rayos X, la ultrasonografía, la resonancia magnética (RM), la tomografía computarizada (TC) y la tomografía por emisión de positrones (PET), tienen limitaciones considerables que afectan

su efectividad diagnóstica. Por ejemplo, los escáneres por tomografía y tomografía computarizada exponen a las personas a una dosis relativamente alta de radiación en comparación con otros tipos de pruebas de diagnóstico y es probable que causen nuevos cánceres en algunos pacientes [55], [56]

La mamografía con rayos X, el método de detección disponible más común y relativamente costo-efectivo, está limitada por baja sensibilidad y especificidad. Hasta un 75% de los falsos positivos y el 34% de los falsos negativos se han informado en un estudio publicado en pruebas de detección de rayos X [57]. Uno de los principales inconvenientes de la mamografía es que confiere un riesgo ligeramente mayor de causar cáncer de mama inducido por radiación. Esto evita que las mamografías se apliquen universalmente a mujeres menores de 40 años. En el caso de mujeres que tienen un tejido mamario denso, la mamografía puede fallar porque el contraste del tumor es similar al tejido fibroso. Se ha encontrado que casi el 40% de las mujeres mayores de 40 años tienen tejido denso. Además, para las mujeres más jóvenes menores de 40 años, el tejido mamario adiposo denso enmascara la mayoría de los tumores en sus etapas iniciales, por lo que la mamografía con rayos X normalmente no es concluyente; cuando es imperativo detectarlos para proporcionar un tratamiento adecuado de manera oportuna.

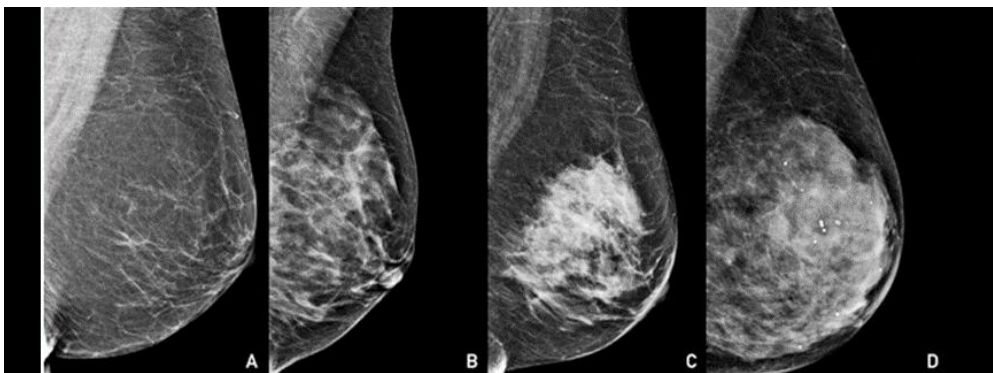


Figura 2.5 Comparativa del tejido mamario menos denso (A) al más denso (D). [58]

Como consecuencia, el cáncer de mama a menudo solo se detecta en etapas más avanzadas cuando las opciones de tratamiento son significativamente más limitadas.

La tasa de supervivencia relativa a 5 años del cáncer de mama en mujeres con cáncer de mama en estadio 0 o estadio I es cercana al 100%. Los cánceres de mama en estadio II y III tienen una tasa de supervivencia de aproximadamente 93% y 72%, respectivamente, y si el cáncer ha alcanzado el estadio IV, las perspectivas de supervivencia se reducen a solo 22% [59].

Etapa	Tasa relativa de supervivencia a 5 años
0	100%
I	100%
II (a,b)	93%
III (a,b,c)	72%
IV	22%

Tabla 2. Posibilidad de supervivencia por estadio de cáncer de mama en mujeres.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un método rápido, preciso y no invasivo para la detección temprana del cáncer de mama independientemente de la edad, la densidad del tejido mamario y que su costo sea relativamente bajo.

CAPITULO 3

3. METAS Y OBJETIVOS

3. Metas y Objetivos

3.1 Hipótesis

La espectroscopia SERS con NPAg, puede aplicarse en forma exitosa para detectar analitos indicadores de alguna afectación en seres humanos, pudiendo definirse condiciones para tener patrones de calibración de concentraciones de ácido siálico. Así mismo se estudiará el uso del SERS con NP en muestras de saliva para poder determinar si es mayor la concentración de ácido siálico en pacientes con cáncer de seno que en pacientes sanas.

3.2 Objetivo general

Comparar la concentración del ácido siálico 1) entre mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y mujeres sanas, 2) entre mujeres que se someten a procesos de tamizaje por mamografía y/o ultrasonido para descartar la existencia de procesos de neoplasias malignas en el seno, y determinar la predictibilidad de la prueba, para determinar si existe una condición de cáncer mediante la técnica SERS.

3.3 Objetivos específicos

Determina la concentración de ácido siálico en mujeres con cáncer de mama así como la concentración de ácido siálico en mujeres sanas mediante la técnica SERS.

Si los resultados son favorables, proponer un método alternativo mediante la técnica SERS que complemente a los métodos ya existentes para la rápida detección del cáncer de mama.

CAPITULO 4

4. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.2 Síntesis y Caracterización de Nanopartículas

Existen diversas técnicas de síntesis de nanopartículas, gracias a las cuales se ha conseguido generar un amplio espectro de distintos tamaños, formas y funcionalidades [61]. La síntesis descrita en este trabajo es conocida como “método de Turkevich”. El método iniciado por J. Turkevich en 1951 y modificado por el Sr. G. Frens en 1970, ~~es el más simple que hay~~, involucra la reducción de iones (pueden ser plata u oro) presentes en una disolución acuosa con citrato de sodio [62], [63]. La preparación por reducción química consta de dos partes fundamentales: La reducción y la estabilización. En relación a la estabilización, es importante mantener el estado monodisperso de las NPs. Debido a la naturaleza hidrofóbica, las NPs metálicas tienden a agregarse en complejos mayores mediante fuerzas de van der Waals. El agente estabilizante aporta cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las partículas [64]–[66].

4.2.1 Síntesis de nanopartículas

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, de grado analítico, y se usaron sin purificación adicional. Las nanopartículas de plata NPs-Ag citrato reducidas se obtuvieron utilizando el método de Turkevich, una solución de nitrato de plata (2,5 mM) en agua desionizada (DI) ~~de agua~~ se calentó a 95 ° C, y se añadió una solución de citrato trisódico (2,5 mM). Casi 15 minutos más tarde, el color de la solución se convirtió en amarillo grisáceo, lo que indica la formación de nanopartículas. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, las NPs-Ag obtenidas se lavaron por centrifugación a ciclos de redispersión con agua desionizada tres veces y se almacenaron en la oscuridad hasta su uso.[67], [68]



Figura 4.2 NPs-Ag en agua desionizada sintetizadas por el método de Turkevich.

4.2.2 Caracterización de nanopartículas

La microscopía electrónica de barrido SEM (Scanning Electron Microscopy). Es una técnica que permite la caracterización estructural y morfológica de materiales sólidos. [69].

En la figura 4.3 se observa el diagrama de los componentes de un SEM. Para el análisis de las NPs-Ag por microscopía electrónica, se depositó una sola gota de la solución de muestra en una rejilla de cobre comercial (lacey carbon formvar).

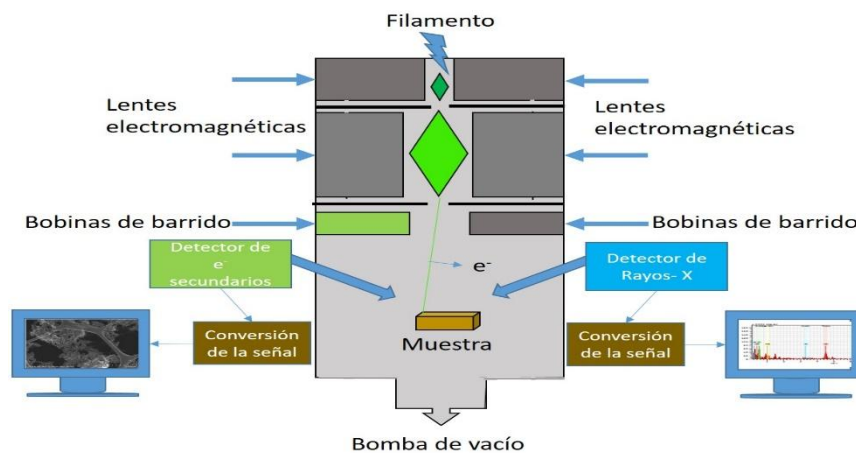


Figura 4.3 Esquema de un microscopio electrónico de barrido, mostrando algunos de los componentes más importantes.

Para caracterizar la morfología y composición química de las nanoestructuras por SEM se utilizó un microscopio Hitachi STEM-5500 equipado con campo brillante, modo STEM y detectores de campo oscuro. El microscopio SEM/STEM tiene un cañón de emisión de campo con una resolución espacial de 0.4 nm operada a 30 kV.

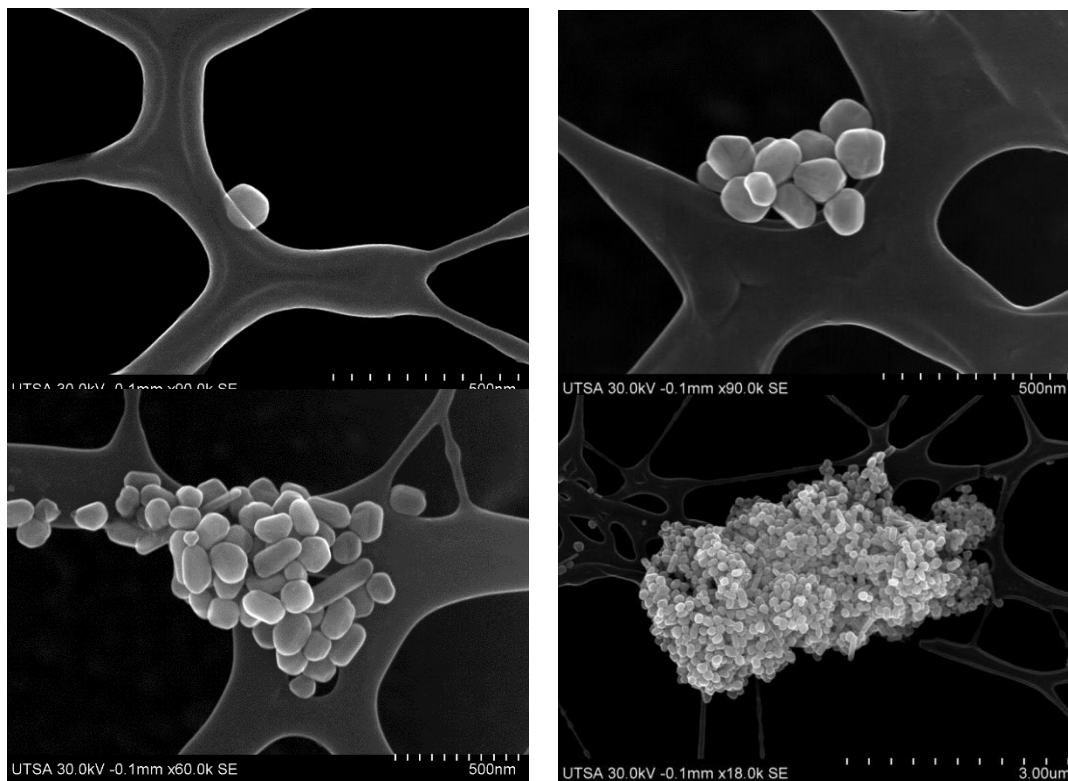


Figura 4.4 Imágenes SEM de NPS-Ag reducidas con citrato de sodio mediante el método de Turkevich.

4.3 Calibración de ácido siálico

En primer instancia se analizaron los espectros Raman de referencia utilizando AS en estado sólido, una disolución en agua desionizada de AS a 200 mg/dl, el Coloide de NPs-Ag y finalmente la combinación de nuestro sustrato SERS (NPs-Ag) con la Solución de AS a 200 mg/dl previamente medida. Analizando los espectros obtenidos se obtuvo un incremento en la intensidad de la señal al combinar nuestro sustrato junto con la disolución de AS. Como se muestra en la figura 4.5.

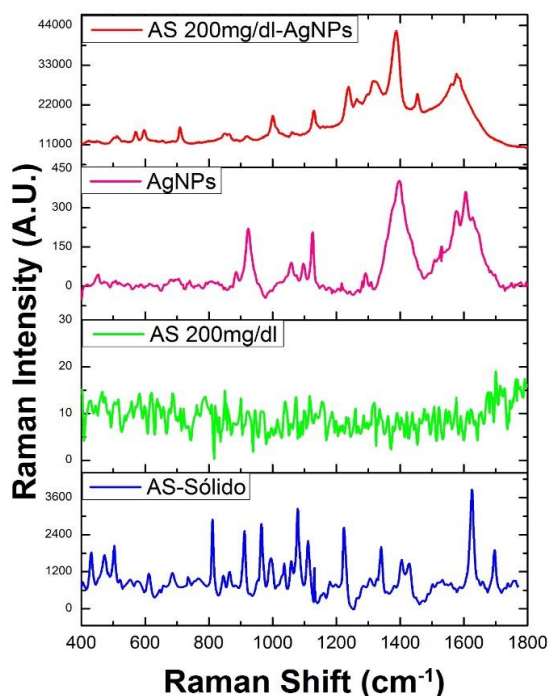


Figura 4.5 Espectros de referencia donde se puede observar el contraste de señales tanto Raman (AS-Sólido) como SERS (AS 200mg/dl-AgNPs) del AS.

Se prepararon soluciones de AS, a diferentes concentraciones en agua desionizada. El reactivo de AS fue adquirido en Sigma-Aldrich, de grado analítico, y se usó sin purificación adicional.

En las calibraciones del AS a diferentes concentraciones con NPs -Ag, se midieron concentraciones de ácido siálico comercial a 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 mg/dl.

Todas las muestras fueron depositadas en un porta portaobjetos de aluminio con 12 pozos, cuya capacidad de cada uno es de 75-80 μ l (Figura 4.6), de los cuales se utilizó una mezcla 2:1 de NPs-AG con AS respectivamente. Estas condiciones de calibración se determinaron de manera experimental.

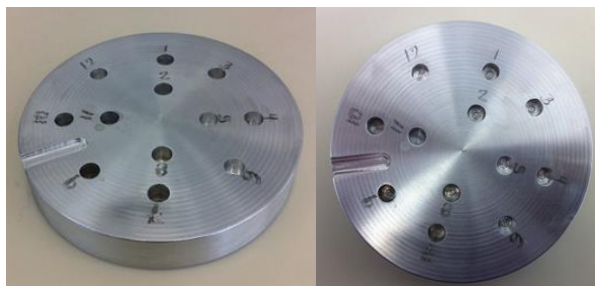


Figura 4.6 Substrato de aluminio utilizado para depositar las muestras a medir con capacidad aproximada de 75-80 μ L por cada pozo, en el cual se utilizó la proporción 50 μ L de coloide de NPs -Ag con 25 μ L de AS.

Se analizaron los espectros SERS obteniendo un incremento en la intensidad de la señal según la concentración de AS. Se realizaron tres pruebas con las mismas soluciones y los espectros fueron reproducibles, en la Figura 4.7, podemos observar un stack, o espectros por separado de cada una de las disoluciones de AS (a) y el contraste de realce en las concentraciones de AS (b).

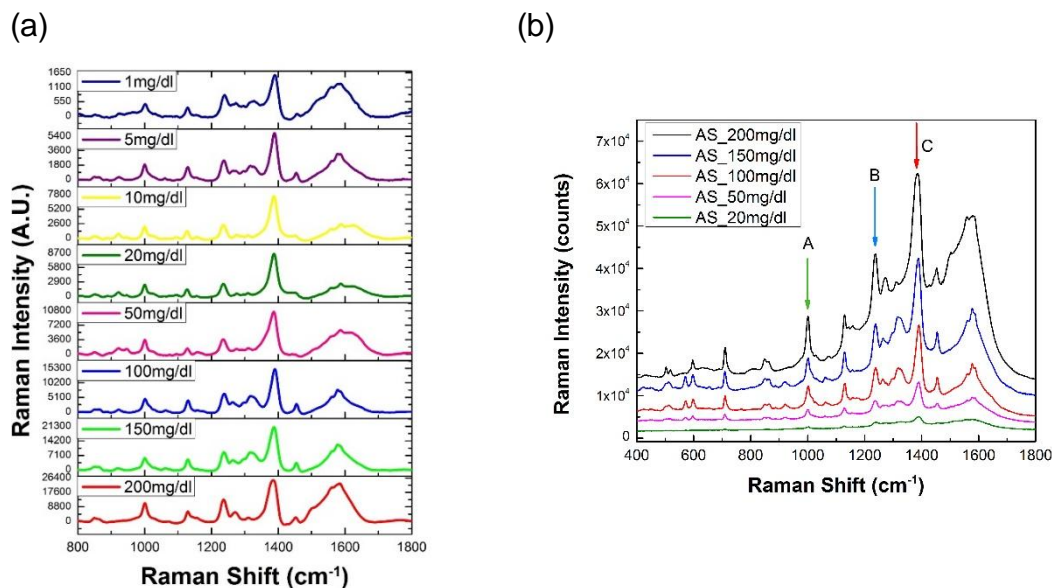


Figura 4.7 Stack de las disoluciones propuestas de AS (a) y comparativa del contraste en intensidades (b).

Los espectros SERS se recogieron en el rango espectral de 400 a 1800 cm^{-1} como un promedio de cuatro exposiciones consecutivas de láser de 20 segundos como anteriormente se mencionó. El fondo de fluorescencia se eliminó usando el algoritmo de Vancouver.

Teniendo presente el buen resultado en los espectros y observando el contraste de las intensidades con respecto a la concentración de AS. Se procedió a asignar las bandas encontrando así los modos vibracionales mostrados en la tabla 4.1.

SERS experimental mode/ cm^{-1}	200mg/dl	150mg/dl	100mg/dl	50mg/dl	20mg/dl	Assignment
598m	X	X	X	X	-	$\delta(CO_2) + \delta(OH)^*$
640w	-	-	-	-	-	$\delta(\text{ring}) + \rho(CH_2)$, ring*
709s	X	X	X	X	X	$\delta(CO_2) + \gamma(C)^* + \gamma(H)$ of hydroxil*
850s	X	X	X	X	-	$\delta(C-H)$, equatorial + $\rho(CH_2)$ in glicerol chain*
942w	-	-	-	-	-	$\nu(C-O-C) + \nu(C-O)$ in glicerol chain*
1002vs	X	X	X	X	X	$\nu(C-C)$ in ring, $\nu(C-N)^*$
1072w	-	-	-	-	-	$\delta(C-H)$, $\delta(C-O-H) + \nu(C-O-C)$ in ring, asym*
1127s	X	X	X	X	X	$\nu(C-C)$, $\nu(C-O)$ asym
1156w					-	$\tau(CH_2)^*$
1237vs	X	X	X	X	X	$\nu(C-N)$, Amide III
1339m	-	-	-	-	-	$\gamma(CH_2)^* + \delta(C-O-H)$
1391vs	X	X	X	X	X	$\nu(CO_2)$
1423m	-	-	-	-	-	$\delta(C-H)^*$
1454m	X	X	X	X	-	$\delta(CH_2)$

Tabla 3 Asignación experimental de los modos vibracionales en SERS del AS.

Una vez obtenidas las asignaciones, se tomaron las tres bandas más representativas que mostraron una respuesta de intensidad SERS muy fuerte en función de la concentración de AS. Los puntos experimentales se ajustaron mediante una función logarítmica $y = a - b \ln x + c$, con un grado de correlación superior a 0,98, indicando posibilidad de una determinación precisa de la concentración de AS a partir de la curva de calibración.

Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación logarítmica donde a, b y c son los parámetros de ajuste. Como la intensidad Raman de los tres picos más fuertes aumenta a diferentes razones a medida que aumenta la concentración de SA, la curva de calibración se calculó usando los valores promedio de los picos A, B y C. La incertidumbre final asociada con la determinación de la concentración de AS fue ± 0.5 mg / dl.

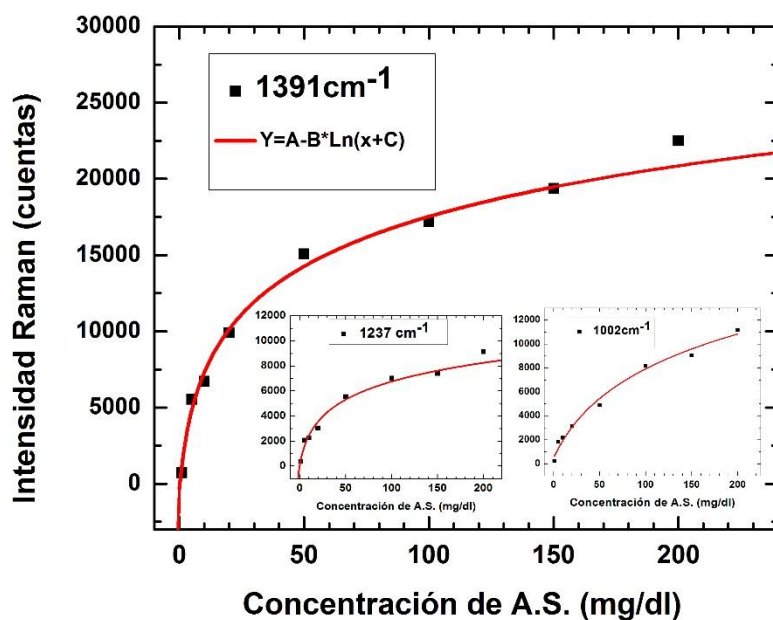


Figura 4.8 Representación gráfica de la intensidad máxima de 1391 cm^{-1} en función de la concentración de ácido siálico. La línea roja representa la función logarítmica de mejor ajuste para los datos obtenidos. En pequeño se muestran los gráficos de las intensidades de los picos de 1237 y 1002 cm^{-1} en función de la concentración de ácido siálico.

4.4 Procesamiento de muestras de saliva

Teniendo los parámetros establecidos para medir AS se prosiguió a la recolección de muestras de saliva, teniendo tres grupos de participantes. El primero de mujeres voluntarias que osciló entre 19 y 60 años de edad sin ningún problema de salud reciente. El segundo grupo fueron mujeres con diagnóstico de cáncer de mama en sus diferentes etapas las cuales se obtuvieron en colaboración con personal del Hospital Central a través de su División de Ginecología. Para la recolección de saliva, a cada voluntaria, se le pidió hacerse una limpieza oral, que consiste en dos pasos, en primer lugar, un vigoroso cepillado de dientes, seguido de un enjuague con un lavador bucal sin alcohol comercial. Posteriormente, el paciente recibió instrucciones de esperar varios minutos, antes de depositar 1-1,5 ml de saliva en un pequeño frasco de plástico estéril. La saliva recolectada se centrifugó a 6000 rpm. Las muestras para examinar se extraen de los sobrenadantes y se mezclan con NPs-Ag para después llevarlas al Raman y así determinar la concentración de AS. Las porciones de muestra no utilizados se almacenan en refrigeración a 4 ° C. Para la obtención de las concentraciones de AS en la saliva se hace una recalibración diaria del AS en concentraciones para poder comparar en las mismas condiciones instrumentales las estimaciones de niveles del AS en muestras de saliva.

CAPITULO 5

5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

5. Presentación y discusión de los resultados.

5.1 Primera etapa de resultados.

Para esta primera etapa de resultados se cuenta con el análisis de 206 muestras de saliva de mujeres, 106 de mujeres sanas y 100 de pacientes con previo diagnóstico de CA de mama, la recolección de muestras de saliva de mujeres previamente diagnosticadas con CA de mama lo fue en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Para cada muestra se llevó a cabo el procedimiento descrito con anterioridad determinando la concentración de AS en la saliva mediante la SERS producida por las nanopartícula de plata reducidas con citrato, de cada una de las participantes, y se presenta el contraste entre ambos grupos de mujeres.

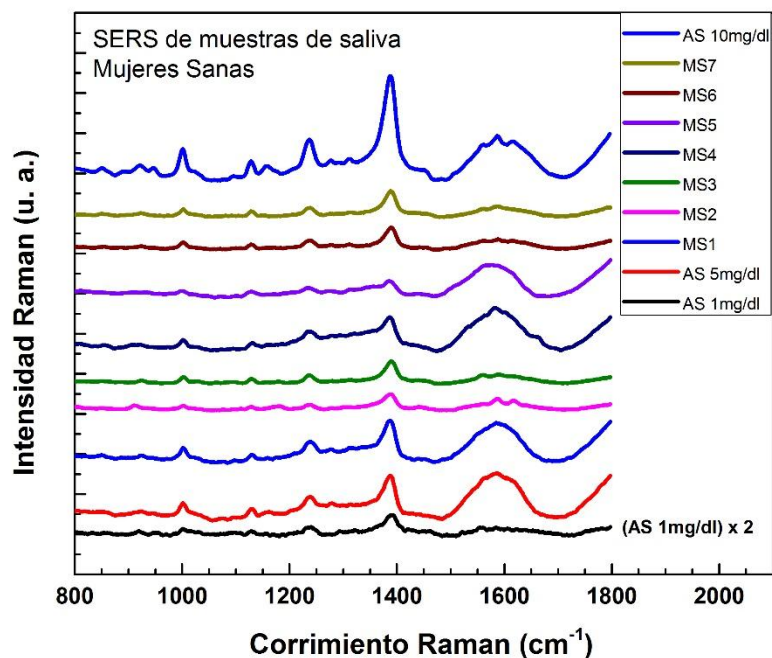


Figura 5.1 Comparación entre el SERS adquirido a partir de soluciones acuosas de ácido siálico a concentraciones de 1, 5 y 10 mg / dl y espectros de ácido siálico medidos en saliva de ocho mujeres sanas. Las curvas en color negro, rojo (abajo) y azul, son los espectros de calibración del AS reactivo analítico, a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/dl.

En la Figura 5.1 se presenta la comparación de los espectros SERS de las soluciones de referencia de AS en concentraciones de 1, 5 y 10 mg / dl con respecto a los espectros medidos en saliva de ocho mujeres sanas. La estrecha similitud de los espectros SERS de AS medidos en saliva con los obtenidos a partir de la solución acuosa estándar de AS, valida la capacidad de SERS para medir AS en saliva humana. Como puede verse en la Figura, la concentración de AS en la saliva de estas ocho mujeres sanas varía entre 1 y 5 mg / dl, curvas negra y roja en la parte baja de la gráfica, respectivamente.

La Figura 5.2 compara los espectros SERS de las soluciones de referencia de AS en concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg / dl con los de AS a partir de la saliva de seis pacientes con cáncer de mama. A diferencia del caso de los espectros SERS obtenidos de individuos sanos, se puede concluir que las concentraciones de AS en la saliva de estos pacientes con cáncer de mama oscila entre 10 y más de 20 mg / dl.

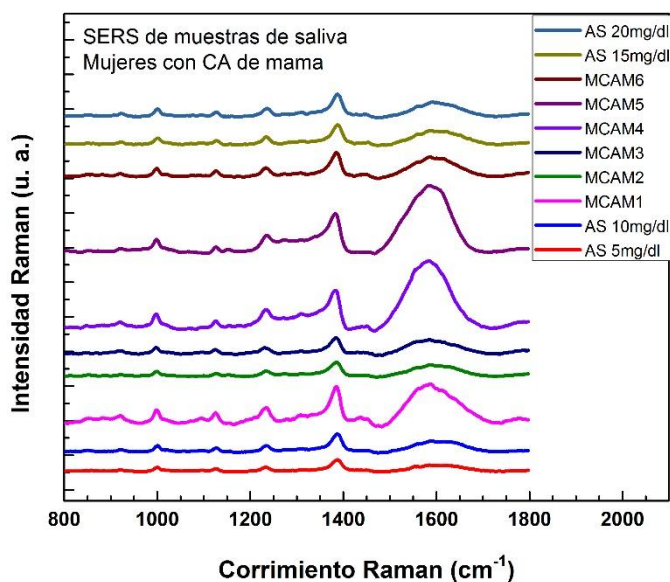


Figura 5.2 Comparación entre los espectros de SERS del AS a concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg / dl y espectros de ácido siálico medidos en saliva de seis pacientes con cáncer de mama.

Dado estos resultados y como una demostración de la aplicación propuesta, la Figura 5.3 muestra una gráfica de la frecuencia de las concentraciones de AS con un ancho de intervalo de 1 mg / dl para mujeres sanas (barras rojas) y pacientes con cáncer de mama, independientemente de la etapa del cáncer (barras verdes). A partir de esta figura, se puede ver fácilmente cómo las concentraciones de AS del grupo control de mujeres sanas se agrupan estrechamente después de una distribución normal con una media estimada de 3,5 y una desviación estándar de 1 mg / dl. Por el contrario, en el caso de pacientes con cáncer de mama, existe una amplia dispersión en concentraciones de AS que varían de 5 a 40 mg / dl, con una media de 18,3 mg / dl y una desviación estándar de 9,4 mg / dl. Esta información se utilizó para establecer que las concentraciones salivales de AS superiores a 7 mg / dl son indicativas de la presencia de una posible afección cancerosa.

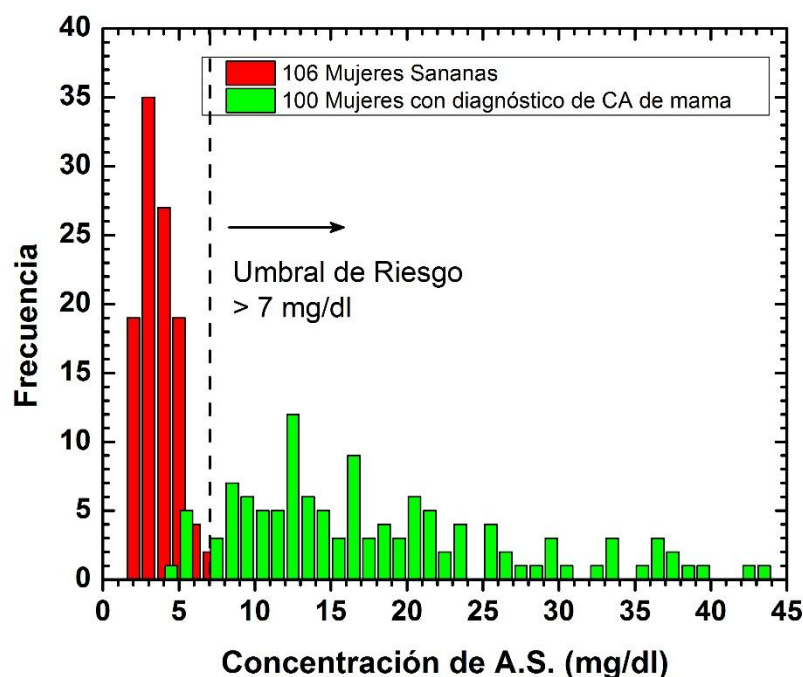


Figura 5.3 Gráfica de frecuencia de las concentraciones de ácido siálico con un ancho de intervalo de 1 mg / dl para los controles sanos (barras rojas) y los pacientes con cáncer de mama, independientemente de la etapa del cáncer (barras verdes). Tienes la gráfica en castellano, favor de sustituir.

5.1.1 Análisis estadístico.

Un centenar de pacientes, con edades comprendidas entre los 25 y los 78 años (promedio: 51,8 años \pm 12,0) y ciento seis voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 18 y 60 años (promedio: 28,6 años \pm 12,7), todas mujeres en ambos grupos, participaron en este estudio. La Figura 5.4 (Insertada en la parte superior izquierda) muestra la concentración de ácido siálico de cada participante, en puntos negros, mujeres sanas (negativos) y en rojo las enfermas. Las características de los pacientes que participan en el proyecto se muestran en la Tabla 4. El análisis estadístico se llevó a cabo en los paquetes estadísticos SPSS 20 y Origin Pro 8. El carácter de la distribución de los datos (paramétricos, o muestras distribuidas consistentes con una distribución normal, o no-paramétrica se debe de establecer primeramente, para definir los tipos de pruebas estadísticas aplicables, para establecer si los datos nos permiten establecer conclusiones sobre su diferencia o distinción estadística. La asunción de datos no paramétricos se evaluó y se apoyó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba arrojó que los resultados de las mujeres enfermas no conforman una muestra de una distribución estadística. La existencia de una diferencia estadística real entre los medios de concentración de control y los sujetos con diagnóstico positivo se evaluaron mediante una prueba U de Mann Whitney. Se consideró que un valor de $P \leq 0.05$ era estadísticamente significativo. La aplicación de la prueba U de Mann Whitney respalda la hipótesis de que la expresión de AS presente en la saliva del control y los pacientes afectados son diferentes. La Figura 5.4 muestra también la gráfica de “cajas” de la concentración de ácido siálico en ambos grupos.

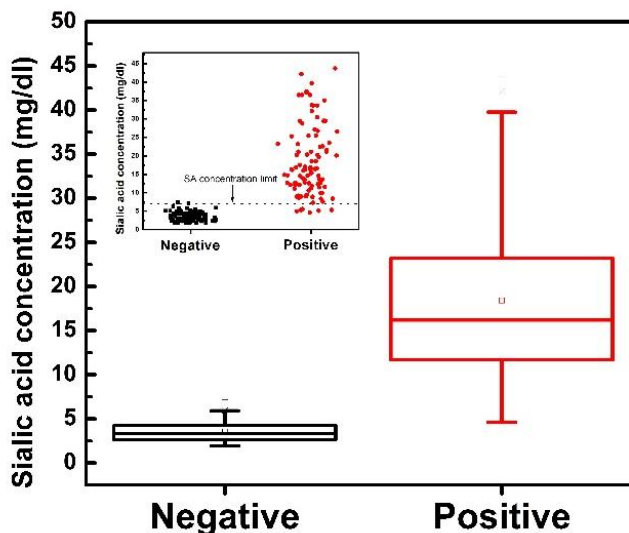


Figura 5.4 Diagrama de caja de la concentración de ácido siálico en grupos de pacientes sanos y afectados. Recuadro: gráfico de nubes de la concentración de ácido siálico de cada participante.

	Grupo control	Grupo enfermo	<i>P</i>
Número de Participantes	106	100	
Concentración de AS (mg/dl)	3.4(2.7 a 4.5)	15.4(11.3 a 22.5)	0.05

Tabla 4. Características de los pacientes que participan en el proyecto. Los datos se presentan como mediana (cuartil inferior a cuartil superior) dado el carácter no paramétrico de los datos. La prueba U de Mann Whitney que aplica para datos distribuidos no paramétricamente) se utilizó para las comparaciones.

En la Figura 5.5, se muestra un diagrama de caja de la concentración promedio en función del estadio clínico. Como solo teníamos 3 pacientes diagnosticados en estadio IV, se agruparon junto con pacientes en estadio III en el análisis estadístico. Los valores numéricos de las medianas, más / menos el primer y tercer cuartil (Q1, Q3) se resumen en la Tabla 5. La inspección de esta figura sugiere que puede existir cierta correlación entre las concentraciones de AS presentes en la saliva de las personas afectadas por cáncer de mama y el diagnóstico de estadio clínico de la enfermedad. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis en todos los datos de concentración de AS y las etapas clínicas del cáncer para

probar si existe diferencia estadísticamente significativa entre estos datos no paramétricos. Se obtuvo un valor de $P = 0.0007$, lo que indica que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de AS entre las diferentes etapas clínicas. Se hicieron pruebas posteriores de comparación múltiple, una de Dunn, y una prueba de Bonferroni que aplican para examinar si los grupos de pacientes por estadios presentan una concentración media, o mediana que sea estadísticamente diferentes. Ambas pruebas resultan solo en diferencias significativas entre las etapas (0, I) frente a las etapas III y IV a $P < 0.05$. No se obtuvieron diferencias significativas entre el resto de las etapas cuando se compararon en pares (0,I), (0,II), (I, II), en ambas pruebas. Una simple prueba de correlación de Spearman indica que $r^2 = 0.16$ en la concentración de AS vs el estadio clínico. Sin embargo hacemos notar que la aplicación de esta prueba es solo como ejercicio indicativo, matemáticamente no recomendado, ya que la prueba estrictamente demanda que las variables a examinar sean numéricas y no categóricas, como lo son en este caso los estadios del cáncer.

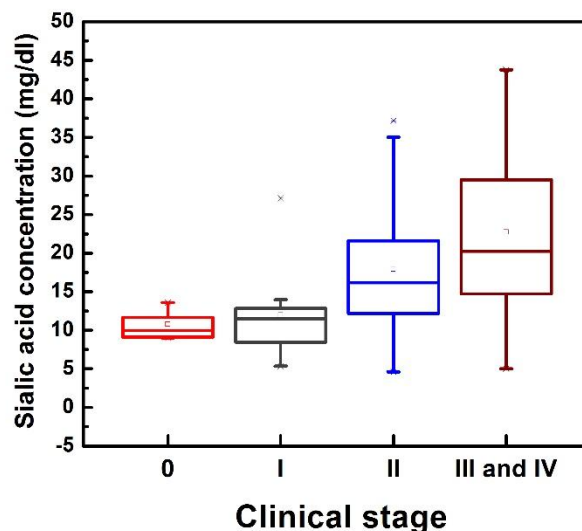


Figura 5.5 Diagramas de caja de las concentraciones promedio y mediana en función del estadio clínico.

Estadio de Cáncer	Mediana	Q1	Q3	Frecuencia
ETAPA 0	11.2	10.1	12.7	8
ETAPA I	11.9	8.5	12.7	10
ETAPA II	16.3	12.2	22.0	48
ETAPAS III & IV	20.7	15.1	29.5	34
				100

Tabla 5. Valores de concentración AS: mediana, primer cuartil Q1 y tercer cuartil Q3 de los datos, para cada paciente diagnosticado en una etapa de cáncer.

Sensibilidad y especificidad

En el ámbito de las pruebas estadísticas y de las ciencias biomédicas, es esencial el calcular la sensibilidad y especificidad estadísticas al final de haber efectuado un estudio que compara resultados negativos/positivos, es decir pacientes sanos/enfermos. Usando la definición de sensibilidad de una prueba como el porcentaje de positivos que están identificados correctamente (es decir de enfermas en este caso que son identificadas por la prueba del AS-SERS), adoptando un umbral de concentración de AS de 7 mg / dl para diferenciar entre sanos y enfermos, la sensibilidad del método propuesto para la detección de cáncer de mama fue $\approx 94\%$. La especificidad se define como la probabilidad de que un individuo sano tenga un resultado negativo en la prueba bajo consideración. Utilizando el mismo umbral de concentración de AS de 7 mg / dl, la especificidad calculada del método resultó en 98%. La precisión (o valor predictivo positivo) de una prueba, definida como la proporción de verdaderos positivos dividida por el número de todos los positivos, fue del 92% (¡que sería la probabilidad de un resultado de la prueba que me indique que estoy enfermo, cuando realmente lo estoy!) para el mismo umbral de concentración de AS.

Se ha observado que en estudios salivales, las enfermedades bucales, como la gingivitis, deben tenerse en cuenta para evitar errores positivos falsos [7], [39] Además, Stefanelli et al. [44] informaron que los niveles de AS aumentaron en el suero de pacientes con cáncer de útero, pulmón, colon / recto, estómago y próstata. En todos estos casos, la concentración sérica de AS fue mayor que la concentración media que se encontró en el suero de pacientes con cáncer de mama. Los mismos autores han demostrado un aumento de los niveles de AS en la artritis reumatoide, la cirrosis hepática y las enfermedades inflamatorias graves (como la neumonía). Como resultado, el aumento de AS salival puede ser indicativo de la presencia, no específicamente, de cáncer de mama, pero alternativamente de otros tipos de cáncer y / o de afecciones inflamatorias graves no relacionadas con el cáncer. Este último inconveniente es fácil de evitar exigiendo que la prueba NO se aplique si la paciente sufre de una afección inflamatoria grave tal como la neumonía mencionada, y averiguando previamente si la paciente sufre de periodontitis grave, que es fácil de diagnosticar por un profesional de la odontología.

Es importante señalar que en nuestro estudio, la edad media del grupo de control es menor que la edad media del grupo de cáncer de mama. Se ha informado que los niveles de AS aumentan solo en un 4-5% y un 7% en los grupos de edad 50-59 y 60-69 años de edad, en comparación con el grupo de 20-49 años, en el que los niveles de AS permanecen prácticamente iguales [28]. Por lo tanto, el incremento en la concentración de AS esperado para pacientes de 50 años o más, está muy por debajo del umbral de 7 mg / dl propuesto para un resultado negativo, y estará contenido dentro de una desviación estándar de la media de $3,5 \pm 1,0$ mg / dl.

5.2 Reproducibilidad de la metodología con diferentes distribuciones de NPs.

Una gran pregunta que surgió a partir de la primera etapa de resultados, fue si el tamaño de las NPs influiría en el incremento de las intensidades de los espectros, así como el espectro de la medición de una sola muestra de saliva en diferentes días, inconvenientes que pueden afectar la validez de la determinación del nivel del AS en la saliva. Por lo que se propuso un ejercicio en donde se sintetizaron 4 diferentes coloides bajo el mismo procedimiento de Turkevich, pero obteniendo diferentes distribuciones de tamaños en las Nanopartículas y midiendo con esos cuatro diferentes coloides dos muestras de saliva, la de una participante sana y la de una con previo diagnóstico de cáncer, obteniendo los siguientes datos.

Primera calibración de ácido siálico

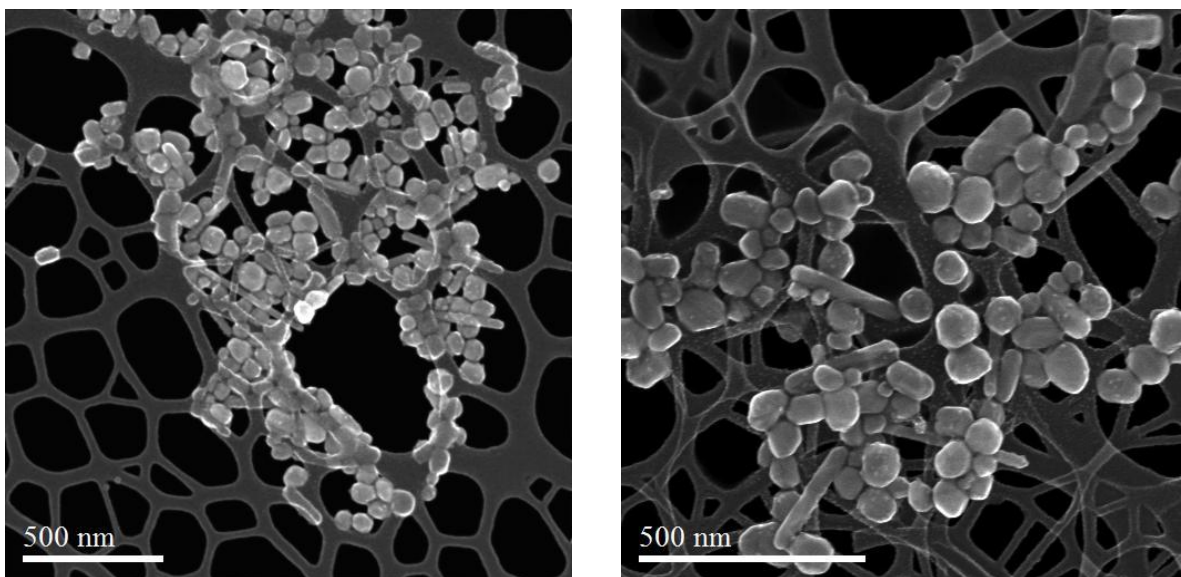


Figura 5.6 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 1 (80 ± 30 nm)

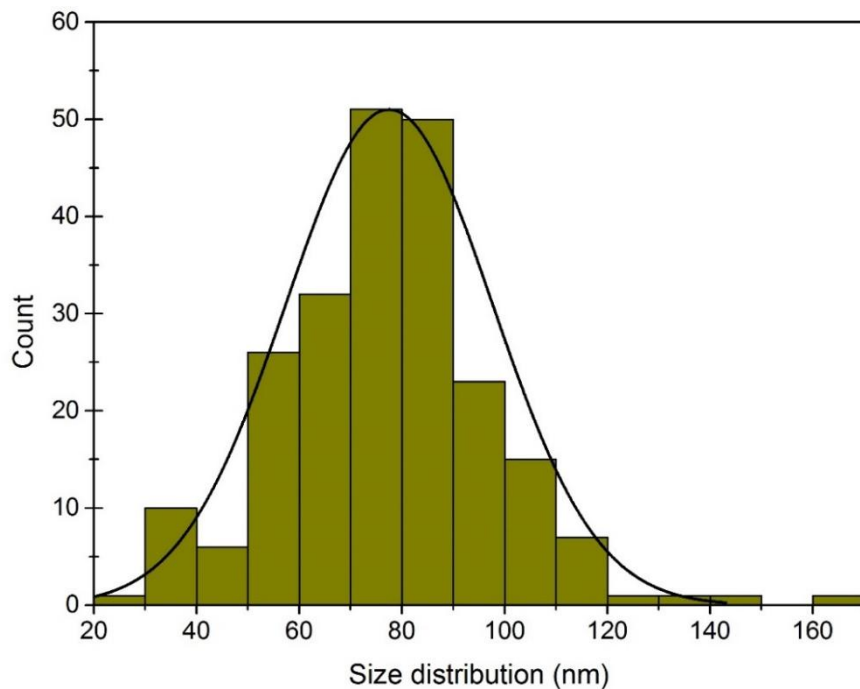


Figura 5.7 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 1 (80 ± 30 nm)

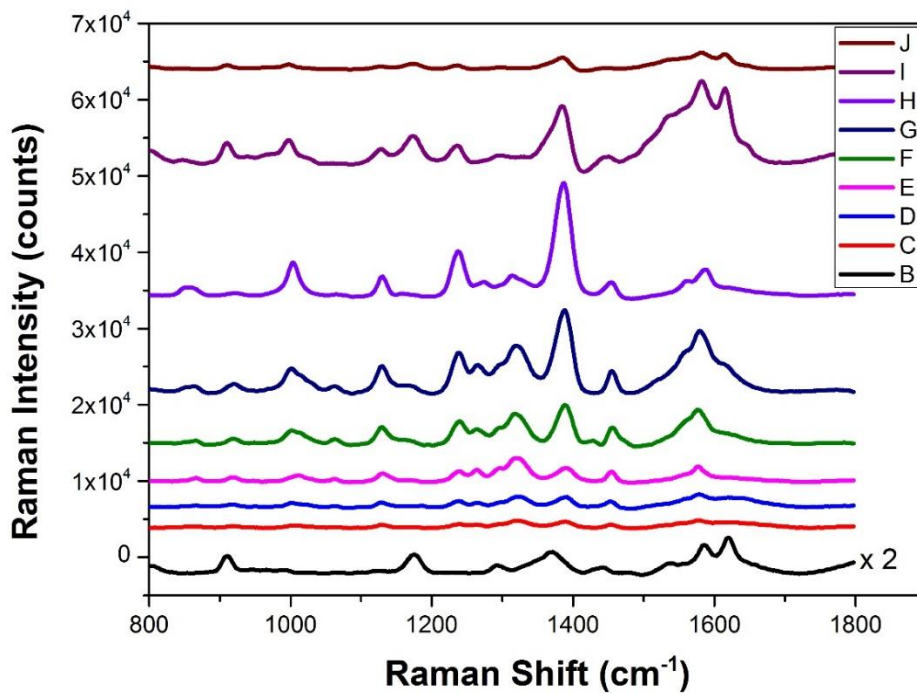


Figura 5.8 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

En la figura 5.8 cada espectro tiene la siguiente correspondencia:

- B: Coloide No 1 de NPs-Ag
- C: AS de 1mg/dl + NPs-Ag
- D: AS de 5mg/dl + NPs-Ag
- E: AS de 10mg/dl + NPs-Ag
- F: AS de 15mg/dl + NPs-Ag
- G: AS de 20mg/dl + NPs-Ag
- H: AS de 50mg/dl + NPs-Ag
- I: Saliva de una paciente con cáncer de mama + NPs-Ag
- J: Saliva de una mujer sana + NPs-Ag

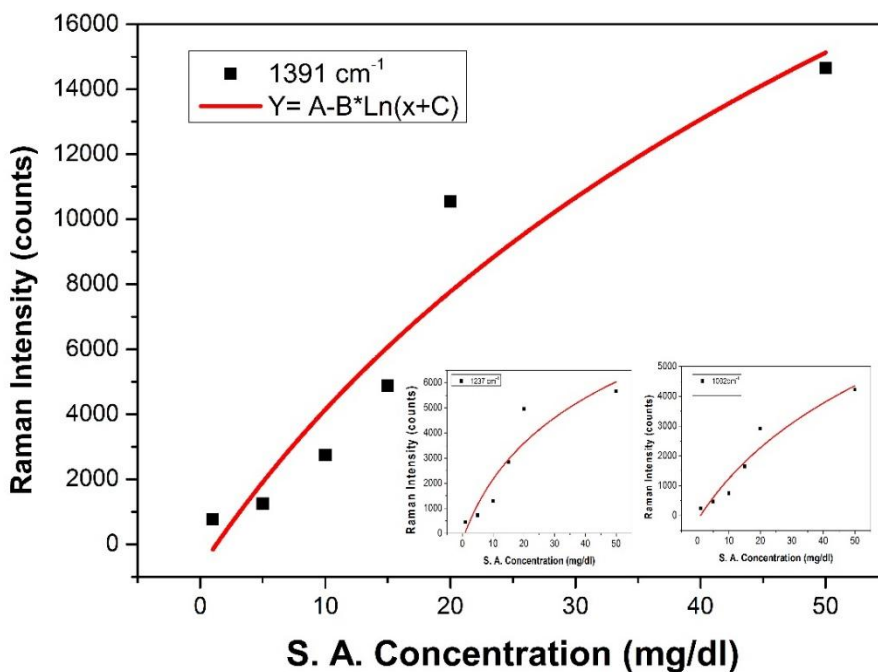


Figura 5.9 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 1.

Muestra de Saliva	Concentración de AS (mg/dl)
Mujer sana	3.4
Mujer con cáncer de mama	19.7

Tabla 6. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 1

Segunda calibración de ácido siálico

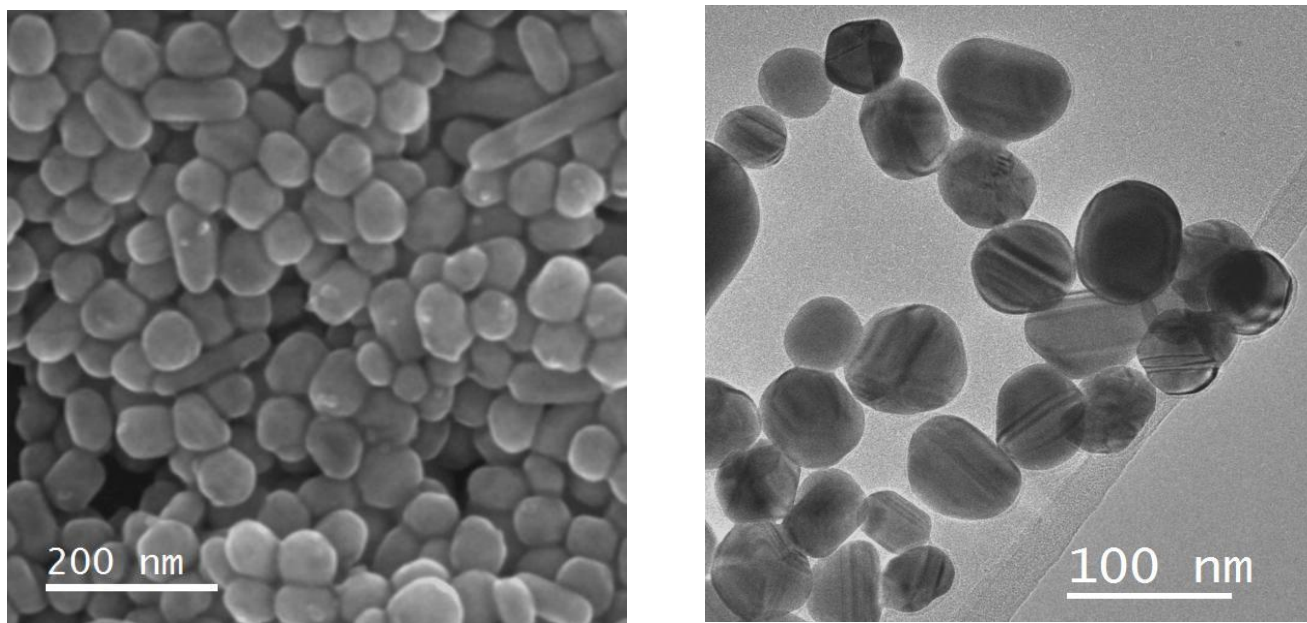


Figura 5.10 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 2 (65 ± 20 nm)

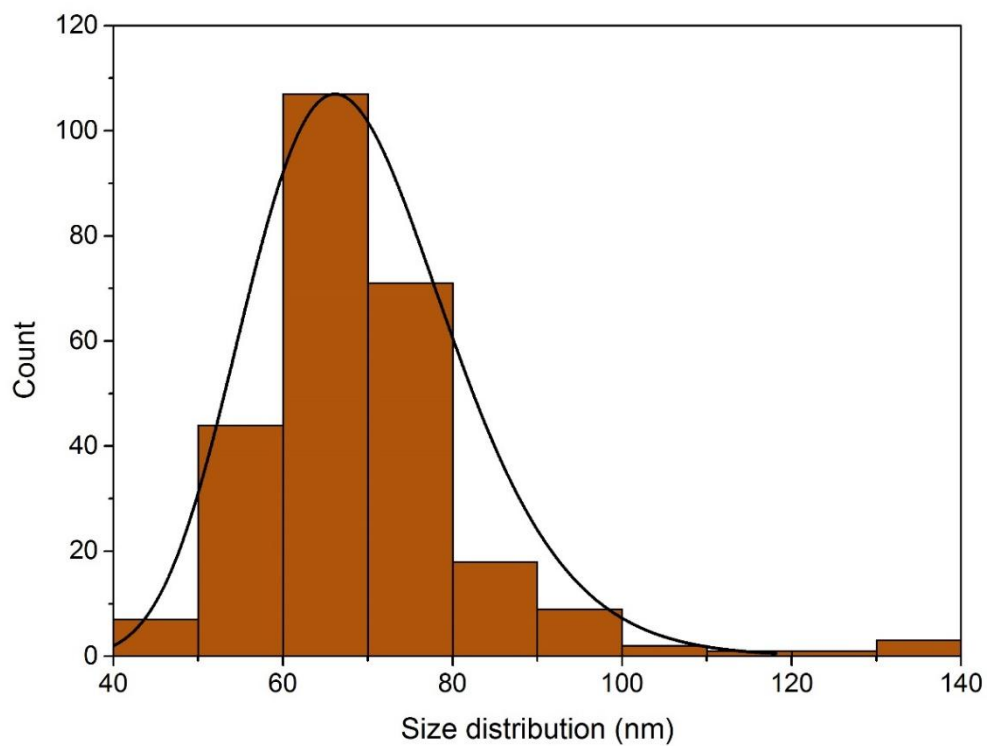


Figura 5.11 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 2 (65 ± 20 nm)

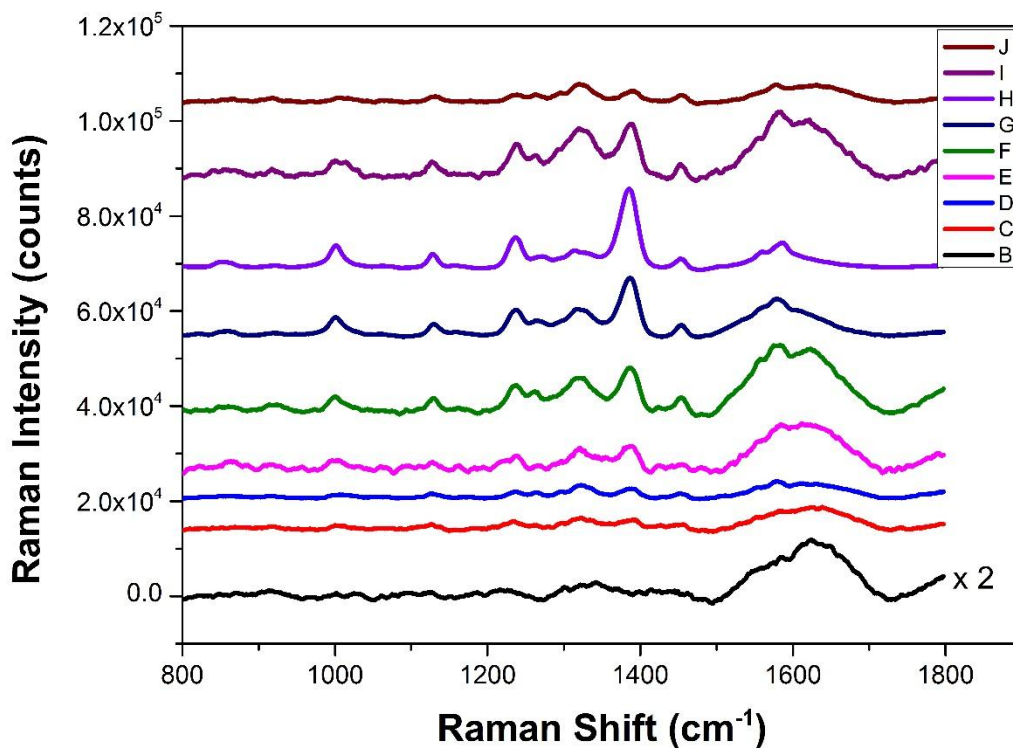


Figura 5.12 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

En la figura 5.12 cada espectro tiene la siguiente correspondencia:

- B: Coloide No 2 de NPs-Ag
- C: AS de 1mg/dl + NPs-Ag
- D: AS de 5mg/dl + NPs-Ag
- E: AS de 10mg/dl + NPs-Ag
- F: AS de 15mg/dl + NPs-Ag
- G: AS de 20mg/dl + NPs-Ag
- H: AS de 50mg/dl + NPs-Ag
- I: Saliva de una paciente con cáncer de mama + NPs-Ag
- J: Saliva de una mujer sana + NPs-Ag

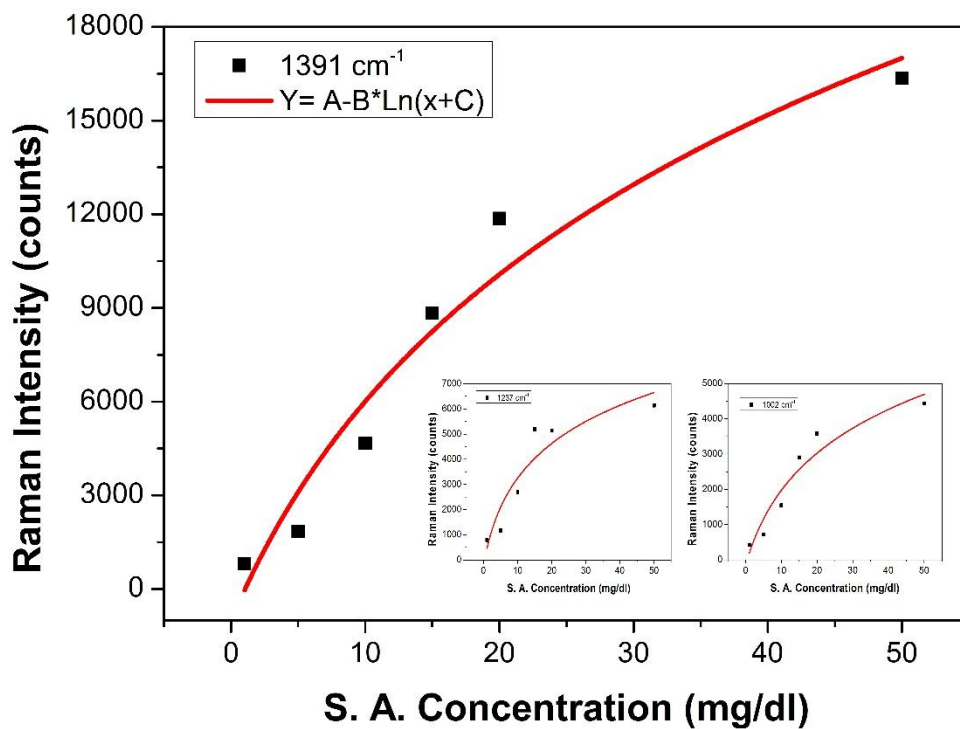


Figura 5.13 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 2.

Muestra de Saliva	Concentración de AS (mg/dl)
Mujer sana	2.9
Mujer con cáncer de mama	20.1

Tabla 7. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 2.

Tercera calibración de ácido siálico

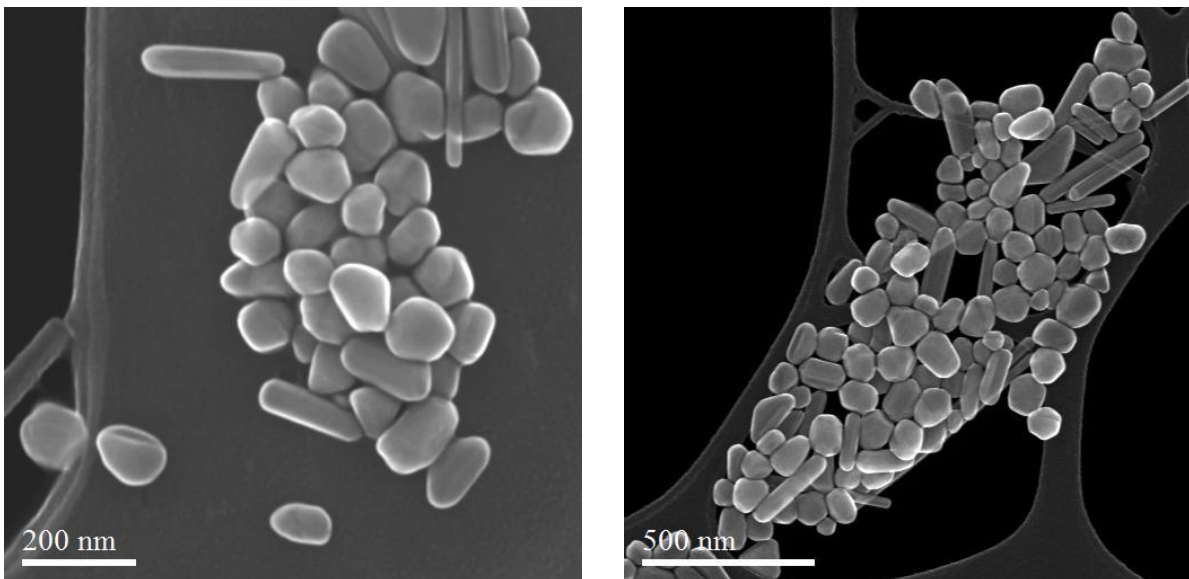


Figura 5.14 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 3 (110 ± 30 nm)

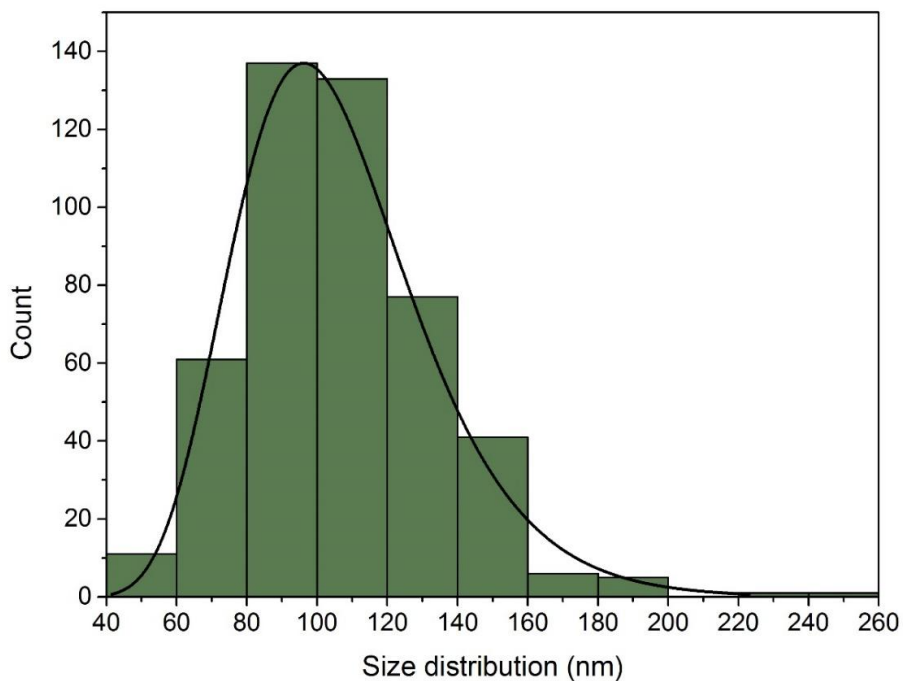


Figura 5.15 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 3 (110 ± 30 nm)

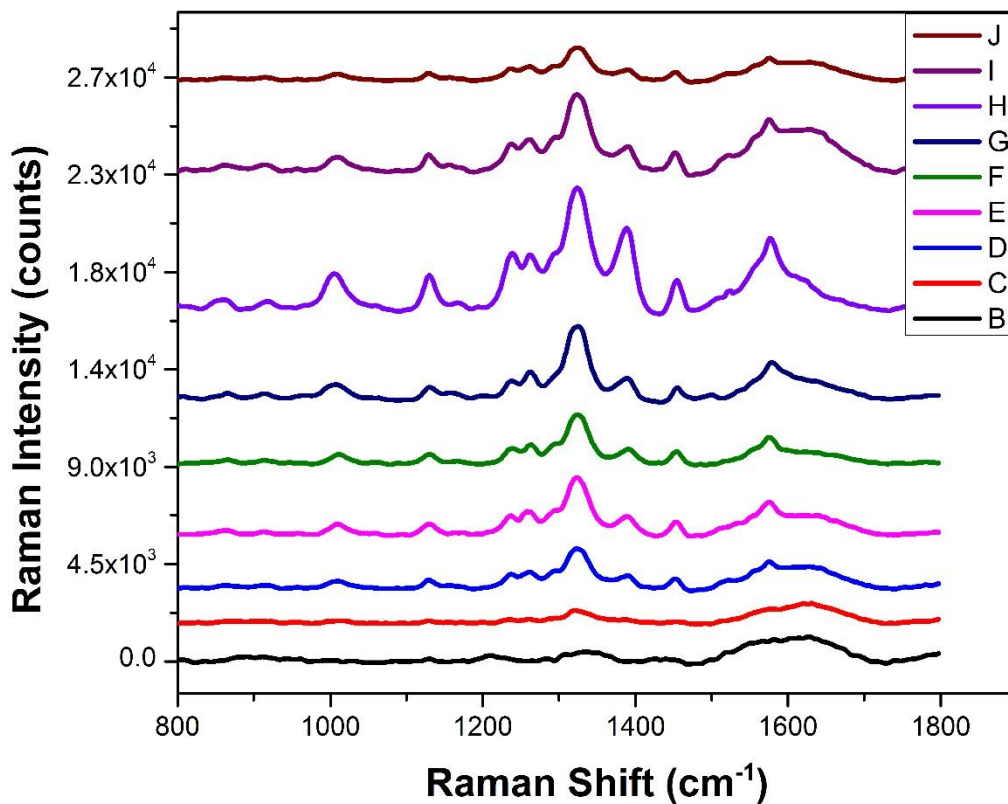


Figura 5.16 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

En la figura 5.16 cada espectro tiene la siguiente correspondencia:

B: Coloide No 3 de NPs-Ag

C: AS de 1mg/dl + NPs-Ag

D: AS de 5mg/dl + NPs-Ag

E: AS de 10mg/dl + NPs-Ag

F: AS de 15mg/dl + NPs-Ag

G: AS de 20mg/dl + NPs-Ag

H: AS de 50mg/dl + NPs-Ag

I: Saliva de una paciente con cáncer de mama + NPs-Ag

J: Saliva de una mujer sana + NPs-Ag

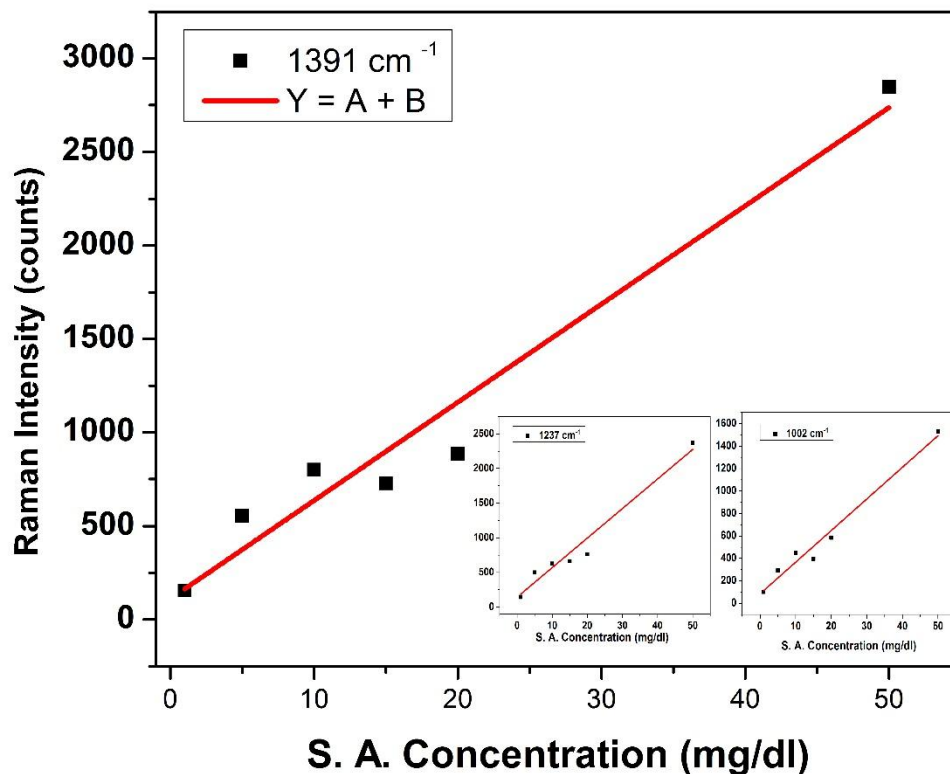


Figura 5.17 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 3.

Muestra de Saliva	Concentración de AS (mg/dl)
Mujer sana	3.6
Mujer con cáncer de mama	19.5

Tabla 8. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 3.

Cuarta calibración de ácido siálico

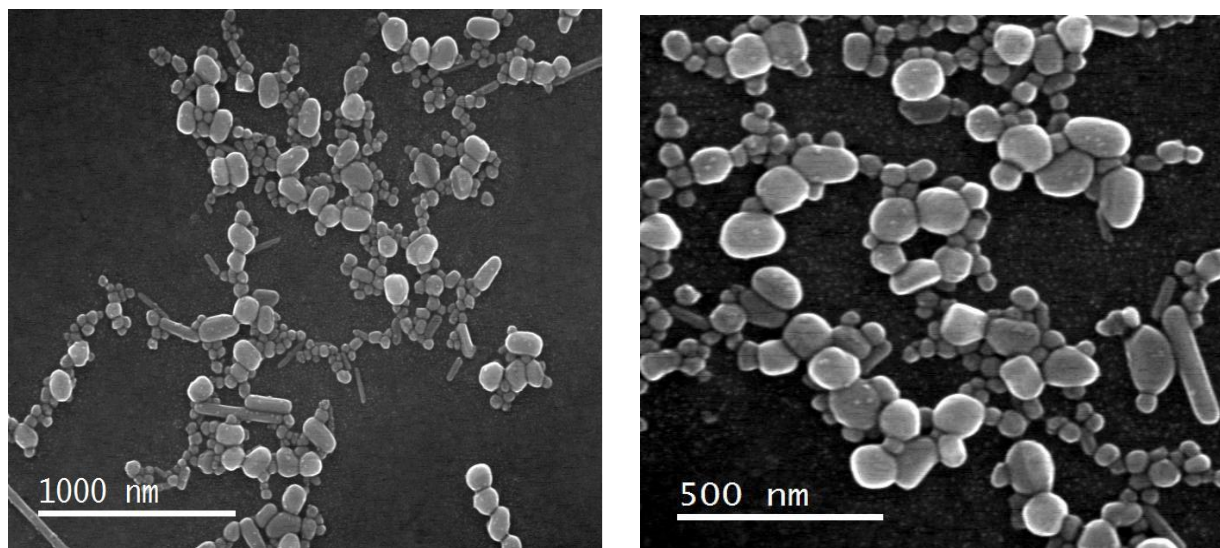


Figura 5.18 Imágenes SEM: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 4. Tamaño de distribución de 20 a 150 nm.

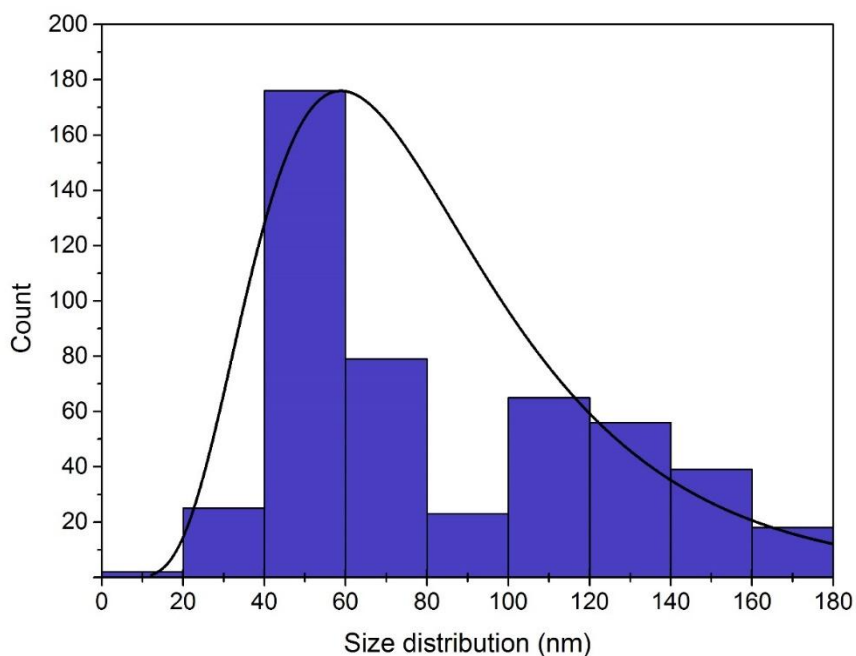


Figura 5.19 Histogramas: Distribución de tamaño de nanopartículas No. 4 Tamaño de distribución de 20 a 150 nm.

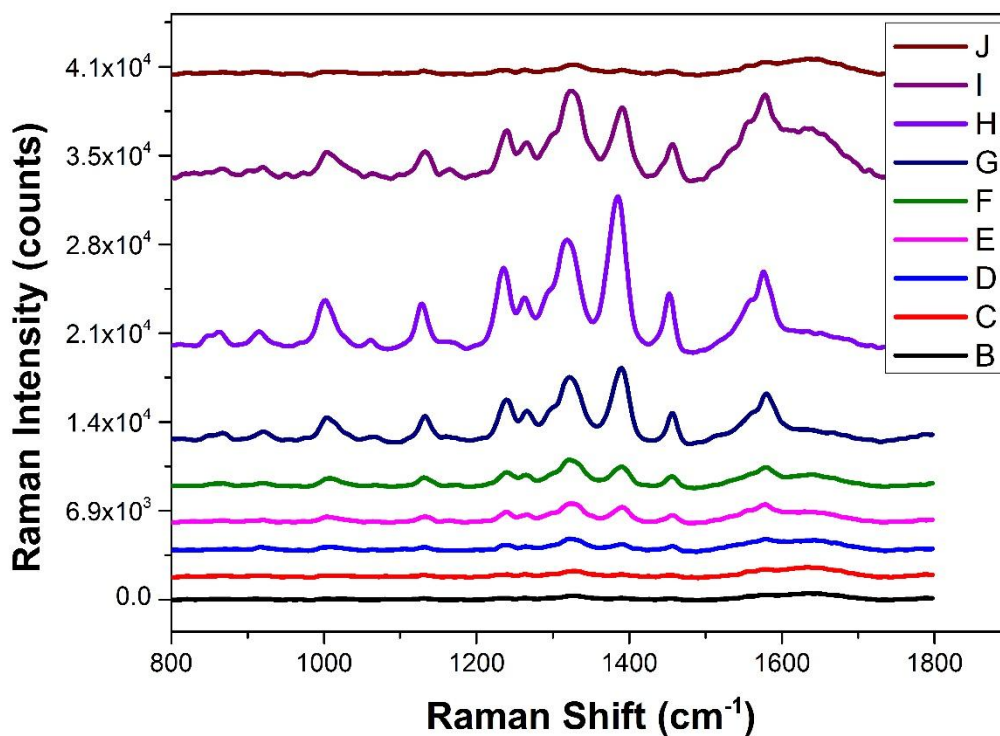


Figura 5.20 Espectros SERS del AS en reactivo, en una paciente sana y una diagnosticada.

En la figura 5.20 cada espectro tiene la siguiente correspondencia:

B: Coloide No 4 de NPs-Ag

C: AS de 1mg/dl + NPs-Ag

D: AS de 5mg/dl + NPs-Ag

E: AS de 10mg/dl + NPs-Ag

F: AS de 15mg/dl + NPs-Ag

G: AS de 20mg/dl + NPs-Ag

H: AS de 50mg/dl + NPs-Ag

I: Saliva de una paciente con cáncer de mama + NPs-Ag

J: Saliva de una mujer sana + NPs-Ag

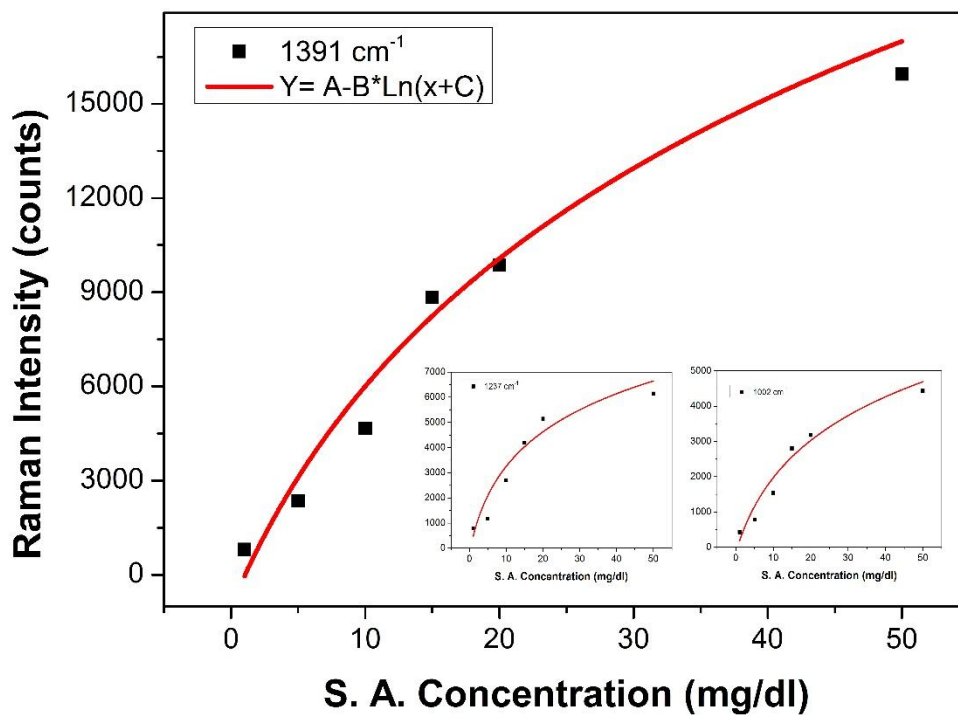


Figura 5.21 Curvas de calibración para la población de nanopartículas No. 4.

Muestra de Saliva	Concentración de AS (mg/dl)
Mujer sana	3.1
Mujer con cáncer de mama	20.4

Tabla 9. Resumen de la calibración con la población de nanopartículas No. 2.

RESUMEN DE RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE AS USANDO NPs-Ag DE DIFERENTES TAMAÑOS Y DISTRIBUCIONES						
MUESTRA DE SALIVA	Concentración de AS en la medición del trabajo.	Concentración de AS población 1 ± 0.5 (mg/dl)	Concentración de AS población 2 ± 0.5 (mg/dl)	Concentración de AS población 3 ± 0.5 (mg/dl)	Concentración de AS población 4 ± 0.5 (mg/dl)	S.A. Media ± Desviación estándar
	Población de 5 a 50 nm	(80 ± 30 nm)	(65±20 nm)	(110 ± 30 nm)	Población de 20 a 150 nm	
SANA	3.2	3.4	2.9	3.6	3.1	3.24 ± 0.27
CON CÁNCER DE MAMA	20.1	19.7	20.1	19.5	20.4	19.96±0.36

Tabla 10. Comparativa de los resúmenes de calibración con la medición original de las muestras de saliva.

En la tabla 10 se muestra que la reproducción de la metodología es buena aun y cuando la síntesis de NPs-Ag no sean idénticas, dado que la diferencia de resultados en la concentración de AS entre una medición y presenta resultados confiables al traslaparse los valores medios dentro de las incertidumbres experimental del método.

5.3 Segunda etapa de resultados

En la sección anterior se estableció estadísticamente la capacidad predictiva y/o para distinguir entre una mujer sana y una enferma a través de la concentración del AS presente en la saliva humana, de sujetos de género femenino. Sin embargo, una prueba de este tipo, para ser de interés en la práctica clínica y de cuidado de la salud, es necesario establecer su valor predictivo en pruebas de “chequeo” en la población femenina abierta, en lo que en la terminología médica se denomina como pruebas de tamizaje.

Con este propósito en una segunda etapa propuesta para este trabajo, dado los buenos resultados que se obtuvieron, se realizó un estudio prospectivo desde marzo de 2017 hasta febrero de 2018 en pacientes remitidos para evaluación de cribado de cáncer de mama a la Unidad Médica Especializada en Detección y Diagnóstico de Cáncer de Mama (UNEME-DEDICAM) en el municipio de Soledad de Graciano Sánchez, en el estado de San Luis Potosí, México. De acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki, se obtuvo el consentimiento escrito e informado de las personas antes de comenzar el estudio.

Los sujetos voluntarios que participaron fueron seleccionados del grupo de pacientes que participaron en una mamografía o en algunos casos en un estudio de ultrasonido, que el personal médico los remitió para ser sometidos a un estudio subsecuente de biopsia para descartar tumores malignos dada la presencia detectada de una masa incipientemente sospechosa en esos estudios previos (aproximadamente el 10% de las mujeres remitidas para efectuarse la mamografía y/o el ultrasonido). Las muestras de saliva obtenidas se analizaron para conocer los niveles de AS, previo a conocer el resultado de la histopatología, para realizar un estudio a ciegas.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la UNEME-DEDICAM. En el cual 164 mujeres fueron evaluadas en el estudio para determinación de AS en saliva mediante espectroscopia SERS. El grupo de pacientes cumplió con los siguientes criterios:

Inclusión. Mujeres, sin otro cáncer primario, que aceptaron participar en el estudio.

Exclusión: Declinar al no desear participar en el estudio, sujetos con quejas severas de salud oral (periodontitis o sangrado de las encías), consumo de medicamentos antiinflamatorios y corticosteroides en los tres meses previos, embarazadas o lactantes.

Las participantes completaron un cuestionario que incluía información sobre salud sistémica y enfermedades orales. Antes de la recolección de saliva, se requería que cada

participante realizara una limpieza oral como se propone en la recolección de saliva para el estudio. Posteriormente el proceso de muestra se hizo con la misma metodología que en la etapa anterior y de igual manera se midieron las muestras de saliva calibrando diariamente el AS.

Ciento sesenta y cuatro pacientes que fueron remitidos a una mamografía y / o ecografía se realizaron, y que posteriormente fueron seleccionados para una biopsia de mama extraída para examinar un bulto sospechoso en la mama, con edades comprendidas entre 19 y 85 años (media edad: 49.4 años \pm 9.4) participaron en este estudio. Las características de los pacientes que participan en el proyecto se muestran en la Tabla 11. Se puede ver que del análisis histológico resultaron 35 pacientes con cáncer de mama (edad media y DE 52 \pm 12,5 años), y 129 fueron diagnosticados como libres de cualquier tumor (edad media y SD 47 \pm 9 años).

Resultados de la prueba de U Mann Whitney	PCN; N=129		PCP; N=35		valor <i>p</i>
	Media \pm S. Dev.	Mediana; IQR	Media \pm S. Dev.	Mediana \pm IQR	
CAS (mg/dL)	6.7 \pm 7.3	5.2; 3.7	27.0 \pm 14.9	26.3; 23.1	0.0000
IMC (Kg/m ²)	28.9 \pm 13.4	26.6; 5.6	28.8 \pm 5.4	28.4; 6.4	0.2627
Edad	48.5 \pm 8.7	47; 9	52.8 \pm 11	52; 12.5	0.0363

Tabla 11: Pacientes que participaron en pruebas de detección de cáncer de mama que se sometieron a una biopsia para determinar el cáncer de mama incluido en el estudio. La *p* representa la significación obtenida para los resultados benignos de PCN (pacientes con casos negativos) y PCP para los resultados de cáncer de mama (positivo), según las pruebas U de Mann Whitney.

Se realizó una prueba de Shapiro para establecer si las variables medidas son una muestra de distribuciones normales o no. En la prueba, un nivel de significancia por debajo de $p < 0.05$ indica que las variables no están distribuidas normalmente. Esta prueba indicó que los datos de concentración de AS no se distribuyen normalmente, y por lo tanto requiere un análisis estadístico no paramétrico. Por lo tanto, procedimos a evaluar la mediana más / menos el rango intercuartílico. Para la comparación con algunos otros resultados en la literatura, enlistamos también la media más / menos una desviación estándar. Estos datos se resumen en la Tabla 11 para el parámetro relevante que es la Concentración de AS.

La diferencia entre los medios de concentración de los pacientes mamográficos benignos y los casos de cáncer de mama con diagnóstico positivo se evaluó mediante una prueba U de Mann Whitney, que también se ha resumido en la Tabla 11. Se consideró que un valor de $P \leq 0.05$ era estadísticamente significativo. La aplicación de la prueba U de Mann Whitney respalda la hipótesis de que la expresión de AS que está presente en la saliva de pacientes con cáncer benigno y de mama es estadísticamente diferente. En la tabla, también es posible percibir, en primer lugar, que no hay una diferencia significativa en el índice de masa corporal (IMC) entre los dos grupos de pacientes; y en segundo lugar, que con respecto a la edad, puede haber una diferencia estadística entre los dos mismos grupos. Como este informe se refiere a los pacientes que se someten a un cribado para asistir a un examen de la posibilidad de CA de mama, este no es un resultado imprevisto, ya que la probabilidad de aparición de CA de mama aumenta con la edad del sujeto [49].

La Figura 5.22 muestra la concentración de ácido siálico (CAS) de cada grupo de pacientes. Indicado en negro, son las CAS de pacientes resultantes de una biopsia benigna o resultados negativos (BN). En rojos aquellos en los que la histología indicó cáncer de

mama o biopsia positiva (BP), los resultados fueron positivos. El contraste en la propagación de los valores de CAS entre BP es inmediatamente evidente en esta figura.

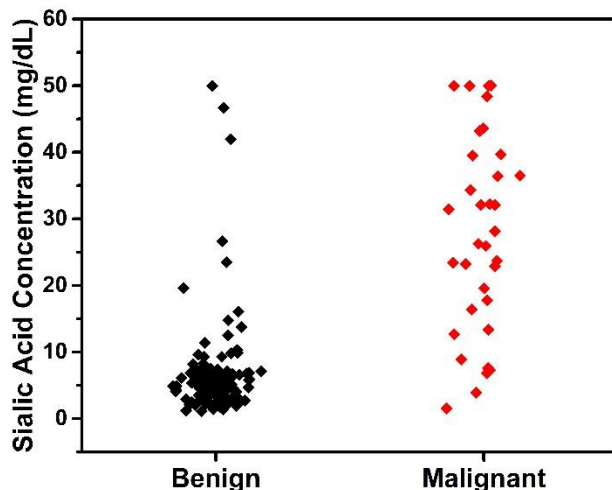


Figura 5.22 Diagrama de caja de las concentraciones de ácido siálico. Otra vez en rojo: resultados malignos de la biopsia; negro: resultados benignos de la biopsia de los participantes

La Figura 5.23 muestra el resultado de una Característica Operativa del Receptor o un análisis de la curva ROC para las concentraciones de ácido siálico entre los dos grupos de pacientes para establecer el umbral adecuado a estos estudios en población abierta de concentraciones del AS (CAS) que permitan una distinguibilidad estadística óptima. Como se sugiere en estadística, los ejes se eligen en sentido vertical para Sensibilidad (tasa positiva verdadera) y Especificidad horizontal 1 (tasa positiva falsa). Este análisis realizado con el programa R-Studio da como resultado que el mejor umbral para diferenciar entre PCN y PCP corresponde a la CAS 12.6 mg / dl, redondeado a un dígito decimal. El área bajo la curva ROC es del 95% para el límite de CAS propuesto. Este valor corresponde a una sensibilidad del 80% y una especificidad del 93%. Estos resultados se resumen en la Tabla 12

Positivo/Negativo SAC	Verdaderos Positivos	Falso Negativos	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
[VP+FP]	[VP]	[FN]	$VP/(FN+VP)$	$VN/(VN+FP)$	$VP/(VP+FP)$	$VN/(VN+FN)$
35	28	7				
Negativos SA	Verdaderos Negativos	Falsos Positivos	$28/(28 + 7)=$	$120/(120+9)=$	$28/(28+9)$	$120/(120+7)$
[VN+FN]	[VN]	[FP]				
129	120	9	80.0%	93.0%	75.7%	94.5%

Tabla 12. Resultado del análisis ROC para sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos. Las pacientes que participaron en las pruebas de detección de cáncer de mama se agruparon de acuerdo con los resultados de la biopsia para determinar el cáncer de mama

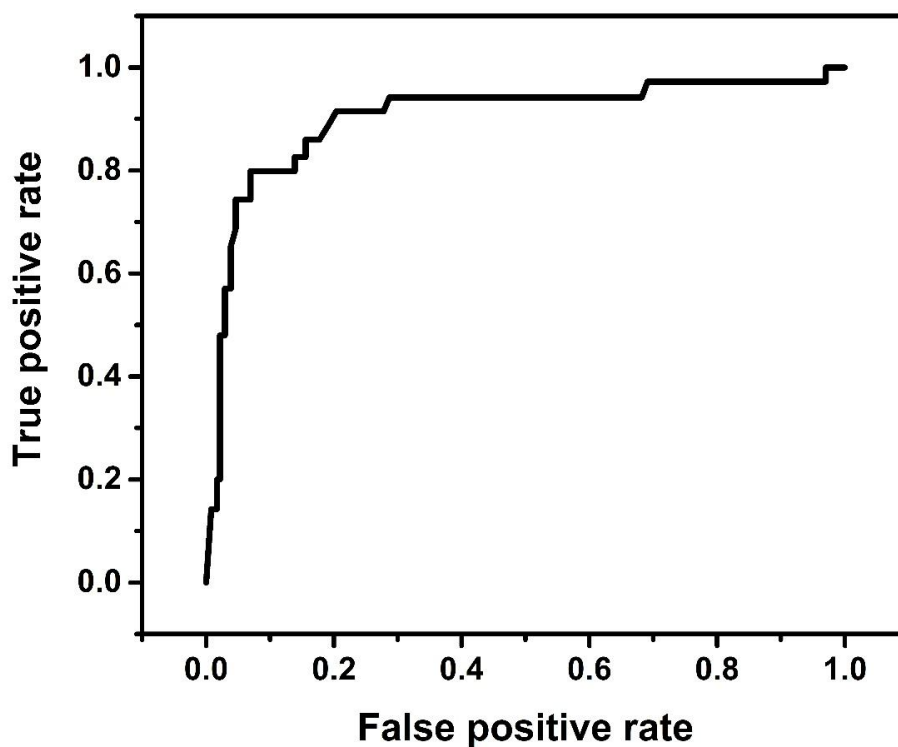


Figura 5.23. Análisis de la curva ROC para AS para optimizar el umbral de las concentraciones de ácido siálico para distinguir entre los resultados de los pacientes con biopsia benigna (negativos) y los resultados de la biopsia de cáncer de mama (positivo).

Nuestro SERS producido por NP-Ag para la concentración de AS en saliva, corrobora un incremento importante del nivel de concentración media (o mediana) en sujetos afectados de cáncer en comparación con los pacientes con resultados negativos. Estos resultados están de acuerdo con varios otros investigadores que han abordado el tema de los incrementos de los niveles de AS en pacientes con cáncer de mama, según lo determinado en el suero. En el estudio previo de nuestro grupo, comparando los niveles de AS entre mujeres ya diagnosticadas versus controles sanos, detectadas por SERS en saliva, informamos para grupos de control elegidos sanos una media de 3.5 ± 1.0 mg / dl y una media de 18.5 ± 9.7 mg / dl en el grupo de cáncer de mama. Estos números deben compararse con los obtenidos para los participantes de la población abierta en el proceso de selección, de una media para pacientes no afectados de 6.7 ± 7.3 mg / dl y una media de 27.0 ± 14.9 mg / dl. Es necesario señalar que los niveles medios recientemente establecidos se obtienen bajo un nuevo corte de CAS determinado en el análisis ROC de > 12.5 mg / dl. En el momento actual, las pruebas en el cáncer de mama para biomarcadores, se han restringido exclusivamente a detectarlos en el tejido canceroso del tumor extraído como biomarcadores predictivos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la CAS tiene el potencial de ser un biomarcador útil para detectar el cáncer de mama en la población femenina.

CAPITULO 6

6. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO EN OTRO TIPO DE CÁNCER

6. Análisis de la concentración de ácido en otro tipo de cáncer.

Dado que el cáncer de ovario es el séptimo cáncer más común en las mujeres en el mundo [70], [71] y que casi 239,000 casos fueron reportados en 2012; lo cual representa casi el 4 por ciento de todos los casos nuevos de cáncer en mujeres, se decidió hacer un estudio paralelo al Ca de mama enfocándonos en este tipo de cáncer.

Este cáncer generalmente es mortal, aproximadamente 152,000 muertes en 2012, y es la octava causa más común de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo [70], [71]. Esta tasa de mortalidad inaceptable, provoca la necesidad de tener métodos de diagnósticos eficaces y altamente sensibles para examinar a las mujeres que pueden tener evidencia de cáncer de ovario o síntomas que pueden llevar al especialista médico a considerar un examen clínico adicional del paciente involucrado, para descartar la existencia de ovario cáncer.

El biomarcador más importante que ha demostrado ser un complemento útil para el cáncer de ovario es la proteína CA-125, que se ha descubierto que es producida por más del 90 por ciento de los cánceres de ovario epiteliales avanzados [72],[73]. Los valores normales van de 0 a 35 (U / ml). Como resultado, la proteína CA-125 se ha convertido en el marcador sérico más evaluado en pruebas de laboratorio para el cáncer de ovario.

Un problema importante es que los métodos de detección tienden a encontrar una gran cantidad de casos que son falsos positivos. El uso combinado de ultrasonido transvaginal y CA-125 da como resultado una mayor sensibilidad para la detección de cáncer de ovario, pero a una mayor tasa de resultados falsos positivos[74], [75]. Desafortunadamente, la malignidad solo se puede evaluar con cirugía. Esto podría conducir a una cirugía

innecesaria en casos falsos, con el inconveniente adicional de la probabilidad siempre existente de complicaciones debido a la cirugía, así como la ansiedad causada por resultados alarmantes falsos.

Por eso en este trabajo paralelo nuestro principal objetivo fue establecer la utilidad de monitorear los niveles de AS por SERS a partir de NPs-Ag, en casos sospechosos de cáncer de ovario, agregando así una pruebas de nivel de AS como complemento para el diagnóstico de cáncer de ovario, junto con el CA-125 y el ultrasonido.

Para este estudio, la población para el estudio se tomó bajo los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: Pacientes atendidos al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central Dr. "Ignacio Morones Prieto" en San Luis Potosí, S.L.P. México (HCSLP), en el período de julio a diciembre de 2017, que fueron diagnosticados por ultrasonido con masas anexiales tumorales y que fueron programadas para intervención quirúrgica, sin tratamiento clínico previo.

Criterios de exclusión: cualquier diagnóstico previo de cáncer, segundo cáncer primario, embarazo, cualquier enfermedad sistémica o circulatoria, o enfermedad periodontal.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de HCSLP. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Cincuenta y dos pacientes diagnosticados con masas anexiales programadas para intervención quirúrgica, con edades comprendidas entre 25 y 78 años (promedio: 41,6 años \pm 17,3) participaron en este estudio. Las características de los pacientes que participan en el proyecto se muestran en la Tabla 13. Se puede ver que el análisis histológico resultó en 37 pacientes con masas anexiales benignas y en 15 pacientes estas masas fueron cáncer de ovario.

Se realizó una prueba de Shapiro para establecer la normalidad (o no) en la distribución de las variables medidas. En la prueba, un nivel de significancia de $p < 0.05$ indica que las variables no están distribuidas normalmente. Resulta de esta prueba que solo el índice de masa corporal y la menarquía se distribuyeron normalmente, los datos de AS y CA-125 requieren un análisis estadístico no paramétrico. Dado que la mayoría de las variables son no paramétricas, procedemos a evaluar la mediana más / menos del primer y tercer cuartil (Q1, Q3), que se resumen en la Tabla 13 para los parámetros relevantes.

La Figura 6.1 muestra la concentración de ácido siálico de cada grupo de pacientes. Indicado en negro, son la CAS de los pacientes afectados con masa anexial benigna, y en rojo los que la histología indicó cáncer de ovario.

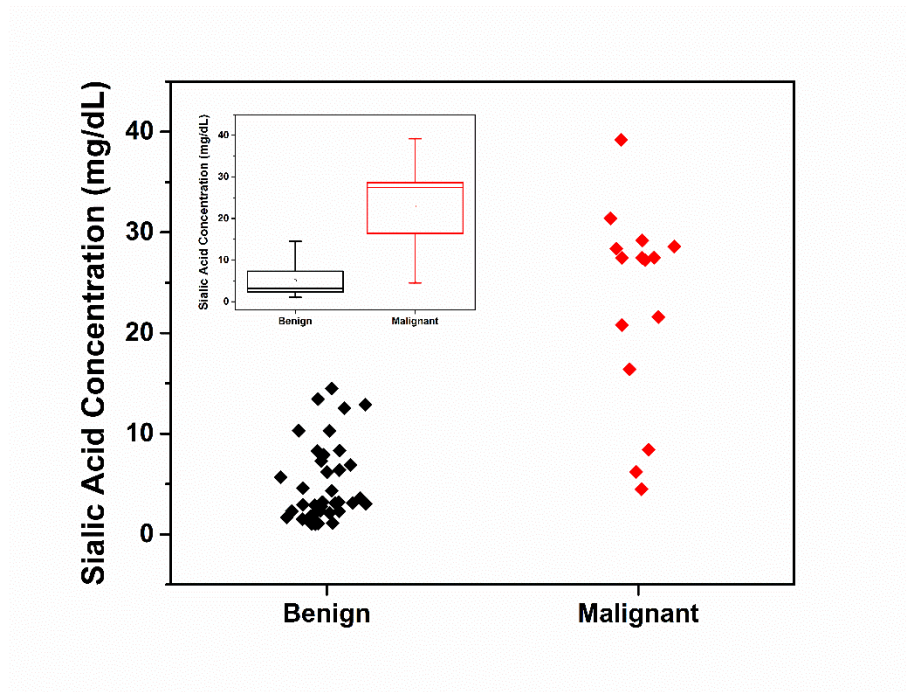


Figura 6.1 Gráfico de nubes de la concentración de ácido siálico de cada grupo de pacientes. Rojo: cáncer de ovario; negro: masa anexial benigna. Insertar: diagrama de caja de la concentración de ácido siálico, nuevamente rojo: cáncer de ovario; negro: masa anexial benigna.

La diferencia entre los medios de concentración de pacientes con masa anexial benigna y el diagnóstico positivo de casos de cáncer de ovario se evaluó mediante una prueba U de Mann Whitney, también resumida en la Tabla 13. Se consideró que un valor de $P \leq 0.05$ era estadísticamente significativo. La aplicación de la prueba U de Mann Whitney respalda la hipótesis de que la expresión de AS presente en la saliva de pacientes con lesiones benignas y cáncer de ovario es diferente. El recuadro de la Figura 6.1 muestra la gráfica de caja de la concentración de ácido siálico en ambos grupos.

Resultados de la prueba de U Mann Whitney	BAMP; N=37		Q1	Q3	OCP; N=15		Q1	Q3	Valor p
	Media	Mediana			Media	Mediana			
CA125 (U/mL)	80.6	34	21	54	1036.3	320	76.6	1662	0.0003
CAS (mg/dL)	5.1	3.2	2.3	7.3	23.0	27.4	18.6	28.5	0.0000
	Mediana				Mediana				Valor p
BMI (Kg/m ²)	28		25	32	25		23	27	0.0745
Edad de la primera regla	13.4		12	15	13		12	14	0.7491
	media		S.D.		media		S.D.		
Embarazos	1		2		2		3		0.6524
Edad	36.8		15.3		51.2		18.7		0.0148
Post-menopáusicas	6 (16.2%)				8 (53.3%)				
Menstruaciones Irregulares	6 (16.2%)				2 (13.3%)				
MRI > 200 n (%)	4 (10.8%)				12 (80%)				<0.0001

Tabla 13. Pacientes diagnosticados con características de masas anexiales incluidas en el estudio. La p representa la significación obtenida para la masa anexial benigna de BAMP y los pacientes afectados de cáncer de ovario OCP, según las pruebas U de Mann Whitney.

La Figura 6.2 muestra el resultado de una Característica Operativa del Receptor o análisis de la curva ROC para las concentraciones de ácido siálico entre los dos grupos de pacientes. Este análisis realizado con el programa R-Studio resulta en que el mejor umbral para diferenciar las lesiones benignas del cáncer de ovario con una CAS > 15.5 mg / dl. El área bajo la curva ROC es 94.05% para el límite de CAS sugerido. Este valor umbral de CAS corresponde a una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%. En la figura se incluye el análisis ROC para el Ca-125. El ejercicio resulta en un área más pequeña bajo la curva del 82.52%, en comparación con el AS.

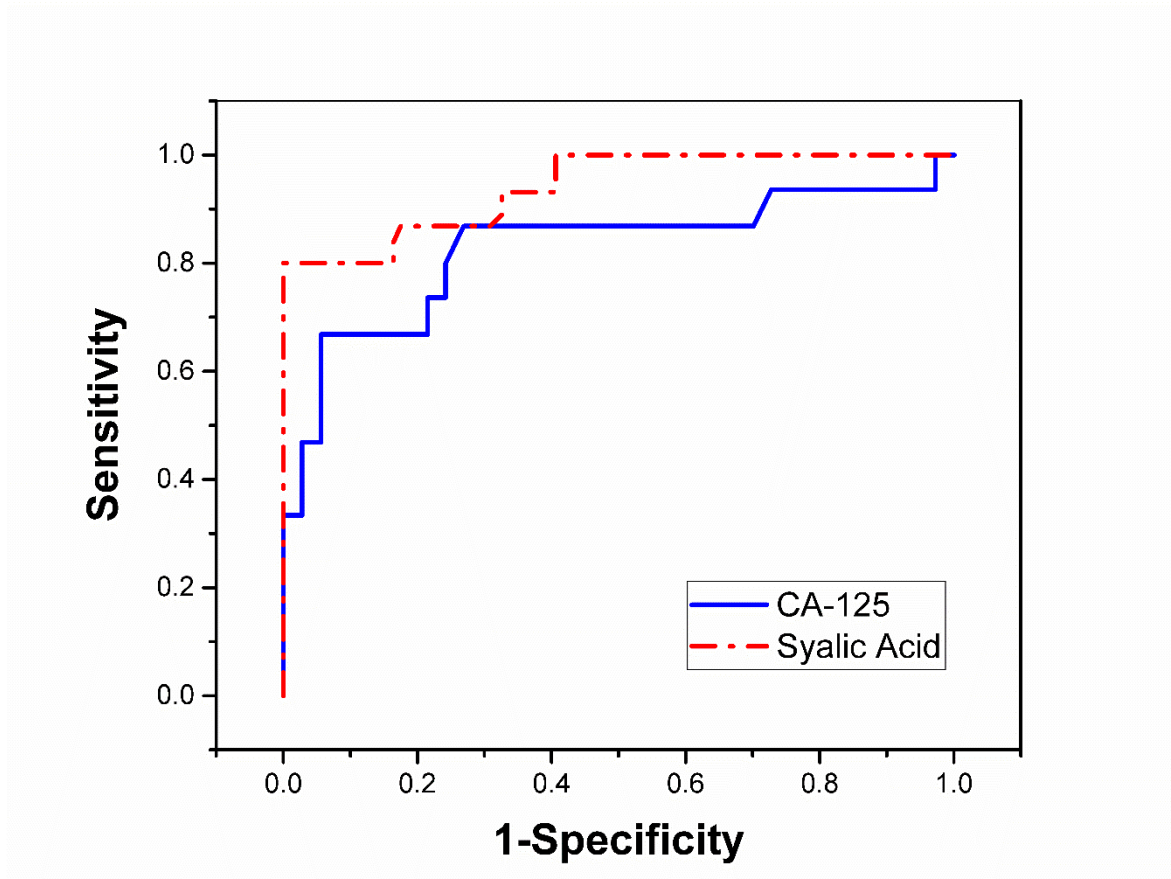


Figura 6.2. Análisis de la curva ROC para SA (y CA-125), para optimizar el umbral de concentraciones de ácido siálico para distinguir entre pacientes con masa anexial benigna y pacientes con cáncer de ovario.

La Figura 6.3 se muestra un gráfico CA-125 vs AS de las lesiones benignas y cáncer de ovario, (puntos negro y rojo, respectivamente). En azul se representan las concentraciones de corte normalmente sugeridas para el CA-125 (línea discontinua horizontal, 35 U / ml) y de AS (línea punteada vertical). A partir de la figura, es evidente que la CAS bajo el punto de corte proporcionado por el análisis ROC tiene un mejor rendimiento que CA-125 para distinguir entre casos benignos y malignos. Pero con respecto a la detección de verdaderos positivos, CA-125 en este ejercicio perdió solo dos casos positivos, en el límite de 35 U / ml, frente a 3 para AS, pero a expensas de generar demasiados falsos positivos, 15 de ellos en este ejercicio, contra ninguno para el AS, bajo el límite de 15.5 mg / dl.

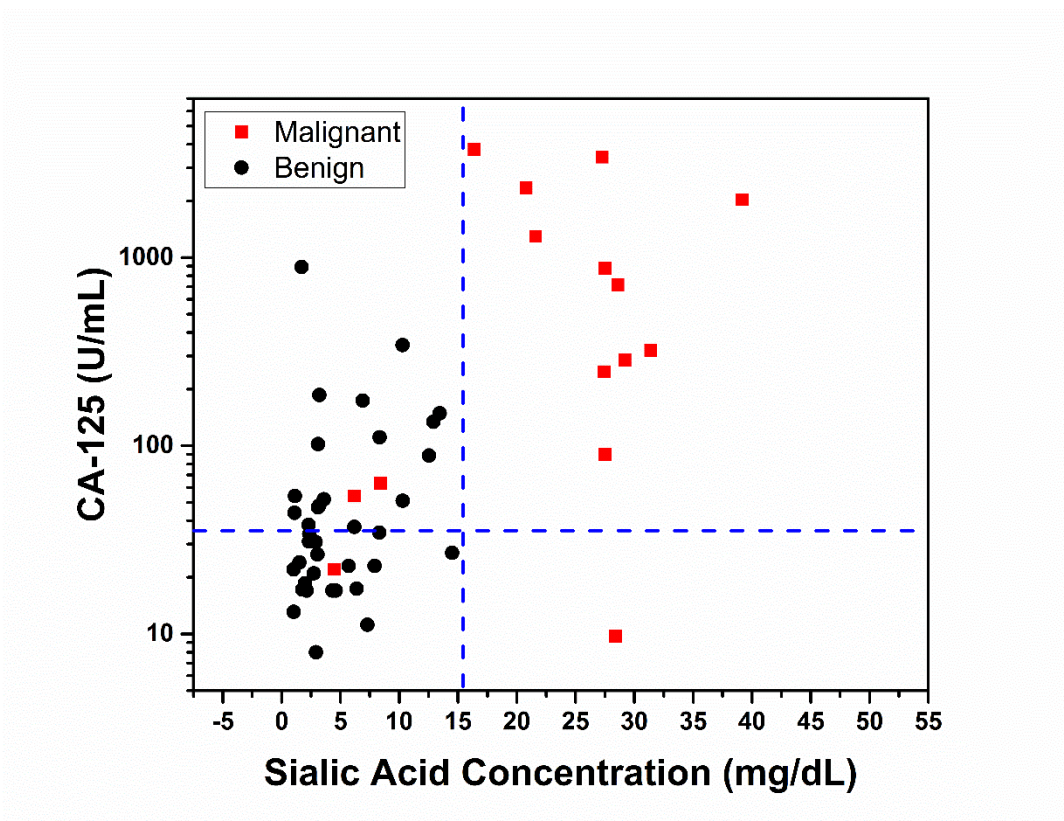


Figura 6.3. Gráfico de AS y CA-125, para ilustrar cómo los valores de corte de las concentraciones de AS y CA-125 distinguen entre pacientes con masa anexial benigna (negro) y pacientes con cáncer de ovario (rojo).

En la Figura 6.4, presentamos una comparación entre las sensibilidades, las especificidades, los valores predictivos positivos (PPV) y los valores predictivos negativos (NPV) para cada prueba. La Figura incluye los valores de corte y los intervalos de confianza para cada biomarcador, así como para el índice de riesgo de malignidad (MRI) calculado. La Figura muestra cómo el AS bajo el valor de corte de 15.5 mg / dl se desempeña tan bien como la MRI.

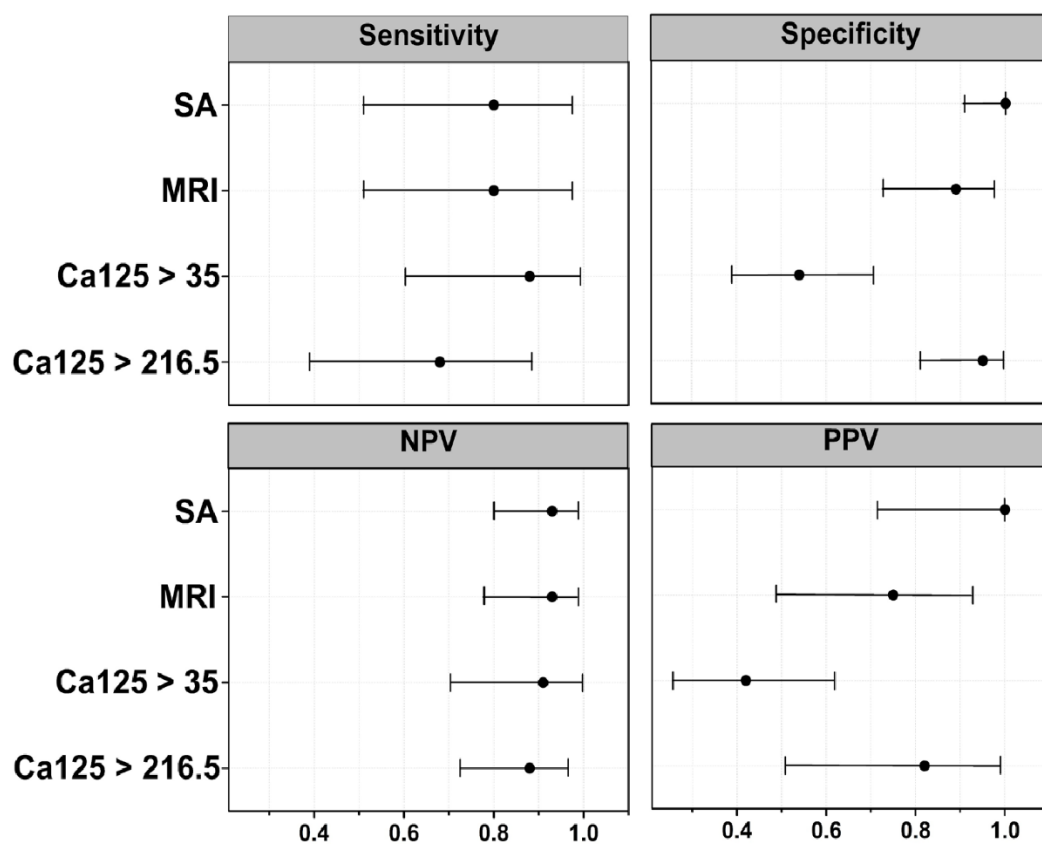


Figura 6.4. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada prueba. La Figura incluye valores de corte e intervalos de confianza para cada biomarcador, así como también para el índice de riesgo de malignidad (IRM).

CAPITULO 7

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

En vista de su potencial para la detección de AS en la saliva humana, la espectroscopia Raman puede usarse como un método prospectivo para el diagnóstico de cáncer de mama. Utilizando la curva de calibración obtenida con soluciones acuosas de referencia, este método se aplicó para determinar la concentración de AS en la saliva de 106 mujeres sanas y 100 pacientes con cáncer de mama. Hemos encontrado que la concentración media de AS en la saliva del grupo control fue de 3.5 ± 1.0 mg / dl (mediana, Q1, Q3: 3.4, 2.7, 4.5 mg / dl) en contraste con el valor promedio de 18.5 ± 9.7 mg / dl en el grupo de cáncer de mama (mediana, Q1, Q3: 16.3, 12.1, 23.3 mg / dl). Este método mostró una sensibilidad del 94%, una especificidad del 98% y una precisión del 92%. Con base en nuestros resultados, sugerimos que las concentraciones salivales de AS superiores a 7 mg / dl pueden ser indicativas con una alta probabilidad de presencia de cáncer de mama u otras neoplasias. Creemos que este trabajo ha demostrado el potencial de desarrollar un método versátil basado en SERS, que puede tener un gran valor en el diagnóstico del cáncer de mama. La adopción por la comunidad médica de la prueba SERS de saliva humana, aprovechando su simplicidad, su naturaleza no invasiva, su bajo costo y aplicabilidad independientemente de la edad o la densidad del tejido mamario, tiene el potencial de convertirse en un avance significativo en el cuidado de la salud de la mujer . Esto puede ayudar a reducir sustancialmente la mortalidad producida por una de las principales causas de muerte en todo el mundo de las mujeres.

Los resultados obtenidos con la reproducción del método en diferentes poblaciones de nanopartículas nos arrojan una confiabilidad que será significativa para implementar esta técnica como método de diagnóstico o tamizaje.

Encontramos que las concentraciones de AS en saliva por SERS de pacientes afectados de cáncer de mama aumentan con respecto al nivel de AS en sujetos examinados benignos resultantes, corroborando resultados previos en la literatura, donde la AS se midió mediante métodos de absorbancia convencionales que requieren un extenso procesamiento químico de las muestras. La prueba SERS mostró una sensibilidad del 80% y una especificidad del 93% con una AS de corte para distinguir entre los casos benignos y los casos de cáncer de 12,5 mg / dl según se estableció a partir de un análisis de la curva ROC. El método SERS no requiere la elaboración química de las muestras de saliva, y podría ser útil en el diagnóstico clínico, ya que es altamente sensible, rápido y de bajo costo, el equipo puede ser portátil y los resultados se pueden obtener en tiempo real.

Finalmente, el método SERS para determinar el nivel de AS en la saliva puede tener el potencial de evaluar la eficacia del tratamiento. Esto requiere una evaluación periódica del CAS después de que se completen las diferentes etapas del tratamiento, una situación que debe ser respaldada por estudios posteriores de pacientes afectados bajo tratamiento médico.

Nuestras mediciones de AS por SERS producidas por citrato de nanopartículas de plata reducidas de pacientes con cáncer de ovario afectados indican que estos niveles aumentan con respecto a la mediana del nivel de AS en sujetos con masa anexial, corroborando resultados previos en la literatura, donde la AS se midió mediante absorbancia convencional métodos que requieren un extenso procesamiento químico de las muestras. El umbral para diferenciar entre pacientes con masa anexial benigna y pacientes con cáncer de ovario es $CAS > 15.5$ mg / dl, a partir de un análisis de curva ROC. Este umbral de nivel AS o valor de corte corresponde a una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%. Nuestros resultados sugieren que los niveles de AS medidos a partir de muestras de saliva

pueden ser tan buenos predictores como el índice de MRI para la presencia de cáncer de ovario en sensibilidad y valor predictivo negativo y pueden superarlo en especificidad y valor predictivo positivo.

El método SERS no requiere la elaboración química de las muestras de saliva, y podría ser útil en el diagnóstico clínico, ya que es altamente sensible, rápido y de bajo costo, el equipo puede ser portátil y los resultados se pueden obtener en tiempo real. Por lo tanto, el método SERS para determinar el nivel de AS en la saliva, se puede utilizar como una prueba complementaria para diagnosticar la presencia de cáncer de ovario, distinguir entre casos de masa anexial benigna y cáncer de ovario y evaluar la eficacia del tratamiento posquirúrgico.

Descripción de Pruebas Estadísticas.

Prueba de U de Mann-Whitney

La prueba de Mann-Whitney se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. El planteamiento de partida es:

1. Las observaciones de ambos grupos son independientes.
2. Las observaciones son variables ordinales o continuas.
3. Bajo la hipótesis nula, la distribución de partida de ambos grupos es la misma: $P(X > Y) = P(Y > X)$
4. Bajo la hipótesis alternativa, los valores de una de las muestras *tienden a exceder* a los de la otra: $P(X > Y) + 0.5 P(X = Y) > 0.5$

Para calcular el estadístico U se asigna a cada uno de los valores de las dos muestras su rango para construir

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

donde n_1 y n_2 son los tamaños respectivos de cada muestra; R_1 y R_2 es la suma de los rangos de las observaciones de las muestras 1 y 2 respectivamente.

El estadístico U se define como el mínimo de U_1 y U_2 .

Los cálculos tienen que tener en cuenta la presencia de observaciones idénticas a la hora de ordenarlas. No obstante, si su número es pequeño, se puede ignorar esa circunstancia.

La prueba calcula el llamado estadístico U , cuya distribución para muestras con más de 20 observaciones se aproxima bastante bien a la distribución normal.

La aproximación a la normal, z , cuando tenemos muestras lo suficientemente grandes viene dada por la expresión:

$$z = \frac{(U - m_U)}{\sigma_U}$$

Donde m_U y σ_U son la media y la desviación estándar de U si la hipótesis nula es cierta, y vienen dadas por las siguientes fórmulas:

$$m_U = \frac{n_1 n_2}{2}$$

$$\sigma_U = \frac{\sqrt{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}}{12}$$

Prueba Kolmogorov-Smirnov

En estadística, la prueba de Kolmogórov-Smirnov (también prueba K-S) es una prueba no paramétrica que determina la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí.

El objetivo de esta prueba de bondad de ajuste es señalar y determinar si los datos estudiados o mediciones muestrales provienen de una población que tiene una distribución teórica determinada

Conviene tener en cuenta que la prueba Kolmogórov-Smirnov es más sensible a los valores cercanos a la mediana que a los extremos de la distribución.

$$F_n(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1_{\text{si } y_i \leq x}$$

alternativa.

Para dos colas de estadísticas viene dado por

$$D_n^+ = \max(F_n(x) - F(x))$$

$$D_n^- = \max(F(x) - F_n(x))$$

Donde $F(x)$ es la distribución presentada como hipótesis.

Prueba de Kruskal-Wallis

En estadística, la prueba de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Es una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos.

Ya que es una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos, en oposición al tradicional ANOVA. Sí asume, bajo la

hipótesis nula, que los datos vienen de la misma distribución. La metodología a seguir en la prueba es la siguiente:

1. El estadístico está dado por: $K = N - 1 \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$, donde:

- n_i es el número de observaciones en el grupo
- r_{ij} es el rango (entre todas las observaciones) de la observación en el grupo
- N es el número total de observaciones entre todos los grupos
- $\bar{r}_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$,
- $\bar{r} = \frac{N+1}{2}$ es el promedio de r_{ij} .

Note que el denominador de la expresión para K es exactamente $\frac{N-1}{12} \frac{n(n+1)}{12}$. Luego .

$$K = \frac{12}{N} \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{n+1}$$

2. Se puede realizar una corrección para los valores repetidos dividiendo K por $1 -$

$$\frac{\sum_{i=1}^G (t_i^3 - t_i)}{N^3 - N}$$

, donde G es el número de grupos de diferentes rangos repetidos, y t_i es el número de observaciones repetidas dentro del grupo i que tiene observaciones repetidas para un determinado valor. Esta corrección hace cambiar a K muy poco al menos que existan un gran número de observaciones repetidas.

3. Finalmente, el p-value (valor p) es aproximado por $Pr(x_{g-1}^2 \geq K)$.

Corrección de Bonferroni

En estadística, la corrección de Bonferroni es uno de varios métodos utilizados para contrarrestar el problema de las comparaciones múltiples.

La prueba de hipótesis estadística se basa en el rechazo de la hipótesis nula si la probabilidad de que los datos observados bajo la hipótesis nula sean bajos. Si se prueban múltiples hipótesis, aumenta la posibilidad de que se produzca un evento raro y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de que se rechace incorrectamente una hipótesis nula.

La corrección de Bonferroni compensa ese aumento probando cada hipótesis individual en un nivel de significancia de α / m , donde α es el nivel alfa global deseado y m es el número de hipótesis.

Coefficiente de correlación de Spearman

En estadística, el coeficiente de correlación de Spearman, ρ es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias (tanto continuas como discretas). Para calcular ρ , los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden.

El estadístico ρ viene dado por la expresión:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

donde D es la diferencia entre los correspondientes estadísticos de orden de $x - y$. N es el número de parejas de datos.

Se tiene que considerar la existencia de datos idénticos a la hora de ordenarlos, aunque si éstos son pocos, se puede ignorar tal circunstancia.

Para muestras mayores de 20 observaciones, podemos utilizar la siguiente aproximación a la distribución t de Student

$$t = \frac{\rho}{\sqrt{(1 - \rho^2) (n - 2)}}$$

La interpretación de coeficiente de Spearman es igual que la del coeficiente de correlación de Pearson. Oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, 0 cero, significa no correlación pero no independencia.

Test de Shapiro-Wilk

En estadística, el Test de Shapiro–Wilk se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos. Se plantea como hipótesis nula que una muestra x_1, \dots, x_n proviene de una población normalmente distribuida. Fue publicado en 1965 por Samuel Shapiro y Martin Wilk. Se considera uno de los test más potentes para el contraste de normalidad.

El estadístico del test es:

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

donde

- x_i (con el subíndice i entre paréntesis) es el número que ocupa la i -ésima posición en la muestra (con la muestra ordenada de menor a mayor);
- $\bar{x} = (x_1 + \dots + x_n) / n$ es la media muestral;
- las variables a_i se calculan

$$a_1, \dots, a_n = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

donde

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

siendo m_1, \dots, m_n los valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales. V es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden n .

La hipótesis nula se rechazará si W es demasiado pequeño. El valor de W puede oscilar entre 0 y 1.

Interpretación: Siendo la hipótesis nula que la población está distribuida normalmente, si el p-valor es menor a alfa (nivel de significancia) entonces la hipótesis nula es rechazada (se concluye que los datos no vienen de una distribución normal). Si el p-valor es mayor a alfa, no se rechaza la hipótesis y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

La normalidad se verifica confrontando dos estimadores alternativos de la varianza σ^2 :

- un estimador no paramétrico al numerador, y
- un estimador paramétrico (varianza muestral), al denominador.

Referencias

- [1] L. Flores-Luna, E. Salazar-Martínez, R. M. Duarte-Torres, G. Torres-Mejía, P. Alonso-Ruiz, and E. Lazcano-Ponce, “Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama,” *Salud Publica Mex.*, vol. 50, no. 2, pp. 119–125, 2008.
- [2] “ABC of breast diseases_ Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics.” .
- [3] M. Tapia, “La Nanotecnología En La Investigación Contra El Cáncer,” *Prim. Rev. Electrónica en América Lat. Espec. en Comun. Razón y Palabra*, vol. 68.
- [4] L. M. Lechuga, “Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud,” *Biotechnol. Apl. a la Salud Humana*, pp. 100–102, 2010.
- [5] E. Vinogradova, A. Tlahuice-Flores, J. J. Velazquez-Salazar, E. Larios-Rodriguez, and M. Jose-Yacaman, “Surface-enhanced Raman scattering of N-acetylneuraminic acid on silver nanoparticle surface,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 45, no. 9, pp. 730–735, 2014.
- [6] T. Angata and A. Varki, “Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: An evolutionary perspective,” *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 2, pp. 439–469, 2002.
- [7] L. K. Oztürk, E. Emekli-Alturfân, E. Kaşıkci, G. Demir, and A. Yarat, “Salivary total sialic acid levels increase in breast cancer patients: a preliminary study,” *Med. Chem.*, vol. 7, no. 5, pp. 443–7, 2011.
- [8] M. Angélica and G. Bucio, “ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA EN SUPERFICIE (SERS) PARA ESTUDIO NO DESTRUCTIVO DE PINTURA NOVOHISPANA QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE : A .?”
- [9] J. J. Castillo-león, “Plataformas nanoestructuradas de plata para identificación

- cualitativa de *Escherichia coli* mediante espectroscopia Raman intensificada por efecto de superficie ‘ prueba de concepto del sistema ’ Silver nanostructured platforms for detecting *Escherichia coli*,” vol. 14, pp. 164–169, 2017.
- [10] P. C. Lee and D. Meisel, “Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols ’,” *J. Phys. Chem.*, vol. 86, no. May, pp. 3391–3395, 1982.
- [11] I. Persaud and W. E. L. Grossman, “Surface-enhanced Raman scattering of triphenylmethane dyes on colloidal silver,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 24, no. 2, pp. 107–112, 1993.
- [12] et al. C. H. Munro, *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*. 1995.
- [13] C. V. Raman and K. S. Krishnan, “A new type of secondary radiation [11],” *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, 1928.
- [14] D. A. Long, *The Raman Effect The Raman Effect A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, 1st ed., vol. 8. 2002.
- [15] J. N. Ferraro, K. Nakamoto, and C. Brow, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd ed. 2003.
- [16] J. Castro-Ramos, A. Villanueva-Luna, and C. Ortiz-Lima, “Raman spectroscopy and its applications,” *Opt. pura y Apl.*, no. March 2013, 2013.
- [17] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, 1st ed. 2005.
- [18] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, “Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 163–166, 1974.
- [19] D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, “Surface raman spectroelectrochemistry. Part

- I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 1–20, 1977.
- [20] M. G. Albrecht and J. A. Creighton, “Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, no. 15, pp. 5215–5217, 1977.
- [21] E. Mechanism, E. Mechanism, S. Effect, and S. Effect, “Mecanismo Electromagnético del efecto SERS,” *Spectroscopy*, vol. 37, no. 1985, pp. 17–22, 2004.
- [22] C. L. Haynes and R. P. Van Duyne, “Plasmon-Sampled Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy †,” pp. 7426–7433, 2003.
- [23] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, and I. Itzkan, “Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS),” *Phys. Rev. ...*, vol. 78, no. 9, pp. 1667–1670, 1997.
- [24] S. Sánchez-Cortés, “SERS en coloides,” *Opt. Pur. y Apl*, vol. 37, no. 2, pp. 1–10, 2004.
- [25] A. García, “Espectroscopía Raman intensificada por superficie de biomoléculas a través de nanopartículas plasmónicas ultrasensibles,” pp. 3–137, 2015.
- [26] R. F. Aroca, N. P. W. Pieczonka, and M. Nazri, “Vibrational spectroscopy and surface-enhanced vibrational spectroscopy of carbonaceous materials : from nanotubes to graphite Espectroscopía vibracional y espectroscopía vibracional aumentada por superficies de materiales de carbono : de nanotubos al graf,” vol. 024106, no. 2003, pp. 187–194, 2007.
- [27] N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link, and P. Nordlander, “in Strongly Coupled Metallic Nanostructures,” vol. 111, pp. 3913–3961, 2011.

- [28] C. F. Bohren and D. R. Huffman, “Absorption and scattering of light by small particles,” 1998.
- [29] W. Suëtaka, “Surface Infrared and Raman Spectroscopy,” *Methods Surf. Charact.*, vol. 3, no. 0, p. 270, 1995.
- [30] M. Moskovits, “Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 36, no. 6–7, pp. 485–496, 2005.
- [31] and J. V. G. R. Aroca, R.F., M. Campos Vallette, “No Title,” in *Amplificación Sobre, plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF nanoestructuras metálicas*, España: Editorial CSIC Consejo Superior de Científicas., Investigaciones, 2014.
- [32] J. A. Creighton, “The effective Raman tensor for SER scattering by molecules adsorbed at the surface of a spherical particle,” *Surf. Sci.*, vol. 158, no. 1–3, pp. 211–221, 1985.
- [33] M. Moskovits and J. S. Suh, “Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: Calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver,” *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 23, pp. 5526–5530, 1984.
- [34] F. Avila, C. Ruano, I. Lopez-Tocon, J. F. Arenas, J. Soto, and J. C. Otero, “How the electrode potential controls the selection rules of the charge transfer mechanism of SERS,” *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 14, pp. 4213–4215, 2011.
- [35] L. Jensen, C. M. Aikens, and G. C. Schatz, “Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 5, pp. 1061–1073, 2008.
- [36] Y. Wang, J. Irudayaraj, and P. T. R. S. B, “Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology Surface-enhanced Raman

- spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology,” no. December 2012, 2013.
- [37] M. Schütz, D. Steinigeweg, M. Salehi, K. Kömpe, and S. Schlücker, “Hydrophilically stabilized gold nanostars as SERS labels for tissue imaging of the tumor suppressor p63 by immuno-SERS microscopy,” *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 14, pp. 4216–4218, 2011.
- [38] B. N. Vajaria *et al.*, “Evaluation of serum and salivary total sialic acid and α -L-fucosidase in patients with oral precancerous conditions and oral cancer,” *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, vol. 115, no. 6, pp. 764–771, 2013.
- [39] F. J. E. I. C. S. G. Crook MA, Pickup JC, Lumb PJ, Giorgino F, Webb DJ, “Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Complications Study,” *Diabetes Care*, vol. 24(2), 2001.
- [40] C. M. Wu EB, Lumb P, Chambers JB, “Plasma sialic acid and coronary artery atheromatous load in patients with stable chest pain,” *US Natl. Libr. Med. Natl. Institutes Heal. Search database Search term Search*, vol. 145(2), 1999.
- [41] R. Schauer, H. Schmid, J. Pommerencke, M. Iwersen, and G. Kohla, “Metabolism and Role of O-Acetylated Sialic Acids,” vol. 491, pp. 325–342, 2001.
- [42] S. L. Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., “Biochemistry and Role of Sialic Acids. In: Rosenberg A. (eds) *Biology of the Sialic Acids*,” *Springer, Boston, MA*, 1995.
- [43] A. Hernández-Arteaga *et al.*, “Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles,” *Nano Res.*, vol. 10, no. 11, pp. 3662–3670, 2017.

- [44] N. Stefenelli, H. Klotz, A. Engel, and P. Bauer, “Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections, and chronic liver diseases,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 109, no. 1, pp. 55–59, 1985.
- [45] D. M. Hogan-Ryan A, Fennelly JJ, Jones M, Cantwell B, “Serum sialic acid and CEA concentrations in human breast cancer.,” *Br J Cancer*, vol. 41.
- [46] I. T. Yao K1, Ubuka T, Masuoka N, Kinuta M, “Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction.,” *Anal. Biochem.*, vol. 182(2), 1989.
- [47] L. Skoza and S. Mohos, “Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation.,” *Biochem. J.*, vol. 159, no. 3, pp. 457–62, 1976.
- [48] M. Jose, J. D’Souza, M. Dadhich, V. Prabhu, V. Pai, and S. Harish, “Serum and salivary sialic acid as a biomarker in oral potentially malignant disorders and oral cancer,” *Indian J. Cancer*, vol. 51, no. 3, p. 214, 2014.
- [49] P. A. Tharun Varghese Jacob, Maya Ramesh, S Murali, K Ramesh, PR Sanjay, “A non-invasive study to estimate and compare salivary sialic acid level as tumor marker in patients with pre-cancer and oral cancer,” *J. Cancer Res. Ther.*, vol. 12, no. 2, pp. 634–639, 2016.
- [50] C. Andreou, M. R. Hoonejani, M. R. Barmi, M. Moskovits, and C. D. Meinhart, “Rapid Detection of Drugs of Abuse in Saliva Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Microfluidics,” no. 8, pp. 7157–7164, 2013.
- [51] a Y. C. and H. J. Wanyao Song, Lin Ding, “Plasmonic coupling of dual gold nanoprobe for SERS imaging of sialic acids on living cells,” *Chem. Commun.*, no. 70, 2016.

- [52] T. Gong *et al.*, “Highly sensitive SERS detection and quantification of sialic acid on single cell using photonic-crystal fiber with gold nanoparticles,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, pp. 227–233, 2014.
- [53] American Cancer Society, “Cancer Facts & Figures 2016,” *Cancer Facts Fig. 2016*, pp. 1–9, 2016.
- [54] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012,” *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [55] R. E. Bird, T. W. Wallace, and B. C. Yankaskas, “Analysis of cancers missed at screening mammography,” *Radiology*, vol. 184, no. 3, pp. 613–617, 1992.
- [56] A. Berrington De Gonzalez, C. D. Berg, K. Visvanathan, and M. Robson, “Estimated risk of radiation-induced breast cancer from mammographic screening for young BRCA mutation carriers,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 101, no. 3, pp. 205–209, 2009.
- [57] P. T. Huynh, A. M. Jarolimek, and S. Daye, “The false-negative mammogram,” *Radiographics*, vol. 18, no. 5, pp. 1137–1154, 1998.
- [58] P. Manchón, “Un espacio para hablar de cáncer de mama, el diagnóstico por imagen y como humanizar la radiología.” [Online]. Available: <https://pilarmanchon.es/2014/08/19/que-significa-tener-las-mamas-densas-o-fibroquisticas/>.
- [59] “Tasas de supervivencia del cáncer de seno,” *Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer*, 2017. [Online]. Available: https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tasas-de-supervivencia-del-cancer-de-seno.html#escrito_por.

- [60] “Tesis-Joa.” .
- [61] Q. H. Tran, V. Q. Nguyen, and A. T. Le, “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives,” *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 3, 2013.
- [62] P. H. J. Turkevich, John; Cooper, “A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold,” *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 55, no. c, pp. 55–75, 1951.
- [63] I. C. Noval, “mÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICA – ISABEL CANAL NOVAL,” 2016.
- [64] J. M. Melillo *et al.*, “Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles,” vol. 298, no. December, pp. 2176–2180, 2002.
- [65] F. Martinez, E. Zuñiga, and A. K. Sanchez, “Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología,” *Mundo Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 101–108, 2013.
- [66] G. Saenz, M. C. Hernández, and L. A. Martínez, “Artículo Suplemento Artículo Suplemento,” vol. 2011, pp. 34–35, 2011.
- [67] S. M. Lee, K. C. Song, and B. S. Lee, “Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method,” *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 2, pp. 688–692, 2010.
- [68] S. P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, and M. Sastry, “Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract,” *Biotechnol Prog*, vol. 22, no. 2, pp. 577–583, 2006.
- [69] J. Renau-piqueras and M. Faura, “Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido,” Valencia, 1965.

- [70] World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer, “Ovarian Cancer 2014 Report,” pp. 1–28, 2014.
- [71] C. By, “CANCER SURVIVORSHIP COUNTRY PROFILE US,” vol. 2016, pp. 1–7, 2017.
- [72] W. Goethe, “Del Homicida Invisible,” pp. 24–30, 2013.
- [73] A. Jemal *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival,” *Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 3–27, 2004.
- [74] E. J. Pavlik, “Ovarian cancer screening effectiveness: A realization from the UK collaborative trial of ovarian cancer screening,” *Women’s Heal.*, vol. 12, no. 5, pp. 475–479, 2016.
- [75] S. Taïeb, M. Ben Haj Amor, A. Mailliez, C. Adenis, and É. Leblanc, “Dépistage des cancers de l’ovaire: chez qui, comment et pour quelle efficacité ?,” *Imag. la Femme*, vol. 26, no. 2, pp. 66–71, 2016.

Productos Académicos

“*Diagnosis of Breast Cancer Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy to detect Sialic Acid Concentrations in Human Saliva*”. A. Hernández-Arteaga, J. J. Zermeño Nava, E. S. Kolosovas-Machuca, J.J. Velázquez-Salazar, E. Vinogradova. M. José-Yacamán and H. R. Navarro-Contreras. Nano Research. Junio (2017).

“*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Acetil-Neuraminic Acid on Silver Nanoparticles: Role of the Passivating Agent on the Amplification of the Raman Signal*”. A. Hernández-Arteaga, F. Delgado-Nieblas, H. R. Navarro-Contreras, M. José-Yacamán, J.J. Velázquez-Salazar, E. Vinogradova, and R.A. Guirado-López. Journal of Physical Chemistry C. Agosto 2017.

“*Determination of Sialic Acid in Saliva by Means of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Marker in Adnexal Mass Patients: Ovarian Cancer vs Benign Cases*” José de Jesus Zermeño-Nava, Marco Ulises Martínez-Martínez, Ana Laura Ramírez-de-Ávila, Aida Catalina Hernández-Arteaga, Ma. Guadalupe García-Valdivieso, Alondra Hernández-Cedillo, Miguel José-Yacamán, and Hugo Ricardo Navarro-Contreras. Journal Of Ovarian Research. Diciembre 2018.

“*Salivary Sialic Acid determination by Nanotechnology: An Useful Biomarker to Screen for Breast Cancer*” Aida Catalina Hernández-Arteaga, José de Jesus Zermeño-Nava, Marco Ulises Martínez-Martínez, Hiram Joazet Ojeda-Galván, Alondra Hernández-Cedillo, Miguel José-Yacamán, and Hugo Ricardo Navarro-Contreras. Breast Cancer.

“*Detection of histamine dihydrochloride at low concentrations using Raman Spectroscopy Enhanced by gold nanostars colloids*”. Ojeda-Galvan H. J., Angel Rodríguez-Vazquez, Francisco Gonzalez-Contreras Alexander Cuadrado, Aida Hernandez, Hugo Navarro-Contreras, Samuel Kolosovas-Machuca.

“*Determination of Sialic Acid by Means of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Periodontitis and Gingivitis Disease*” Aida Catalina Hernández-Arteaga, Alondra Hernández-Cedillo, Ma. Guadalupe García-Valdivieso, Nuria Patiño-Marín, Miguel José-Yacamán, and Hugo Ricardo Navarro-Contreras.

Estancias y Congresos

Internacionales

International Center for Nanotechnology and Advanced Materials (ICNAM) en el Department of Physics and Astronomy at the UTSA. Diciembre 10-17 del 2014. San Antonio, Texas.

Congresos

Nacionales

Congreso de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Aguascalientes; 11-13 de septiembre de 2017. Aguascalientes, AGS, México.

Internacionales

XXIV International Materials Research Congress. Sociedad Mexicana de Materiales A.C. 2015 (Cancún, México).