



Universidad Camilo José Cela

Programa de Doctorado en Medicina Genómica

## **BIOPSIA LÍQUIDA:**

**APLICACIÓN DE MÉTODOS ÓPTICOS Y METABÓLICOS PARA LA  
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS,  
PROTEÍNAS Y CÉLULAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON  
CÁNCER**

Tesis Doctoral

**EDUARDO GARCÍA-RICO FERNÁNDEZ**

Directores

Francisco López Muñoz

Ramón Álvarez Puebla

MADRID, 2017



*¿Por qué cada uno de los griegos podía erigirse en representante de su tiempo, y  
no así el hombre moderno?*

*Porque al primero le dio forma la naturaleza, que todo lo une, y al segundo el  
entendimiento, que todo lo divide*

*Friedrich Schiller*

*A los que ya no están, pero nos hacen ser. “Mano fría que aprietas mi corazón”*

*A Manuel, Eduardo, Manuel, Marina, Miguel, Adrián y Patricia*

*A Violeta*



## AGRADECIMIENTOS

“NO FUERCES LA TRAVESÍA. AS PREFERIBLE QUE DURE MUCHOS AÑOS, QUE SEAS VIEJO CUANDO FONDEES EN LA ISLA, RICO DE TODO LO QUE HABRÁS GANADO HACIENDO EL CAMINO. ÍTACA TE HA DADO EL BELLO VIAJE, SIN ELLA NI HABRÍAS SALIDO. Y SI LA ENCUENTRAS POBRE, NO ES QUE TE HAYA ENGAÑADO. SABIO COMO TE HABRÁS HECHO, SABRÁS LO QUE SIGNIFICAN LAS ÍTACAS”

ESTA ES UNA TESIS DOCTORAL A SOTAVENTO. YA SÉ ALGO DE LA MAR Y DE LOS VIENTOS. HE APRENDIDO ALGO DE ESTA SINGLADURA COMPARTIDA CADA DÍA, COMPUESTA DE LUCHAS, SUEÑOS, FRACASOS Y, SOLO A VECES, ÉXITOS.

SEGÚN CLAUDE BERNÁRD “EL ARTE SOY YO PERO LA CIENCIA SOMOS NOSOTROS”. MI AGRADECIMIENTO A TODOS LOS QUE HAN FORMADO Y FORMAN MI “PERSONAL” NOSOTROS. PERO LA CIENCIA TAMBIÉN REQUIERE UN “ELLOS”. SON AQUELLAS PERSONAS E INSTITUCIONES QUE LE DAN CONFIANZA Y SOPORTE. EN MI CASO, SE TRATA DEL GRUPO HM Y LAS INSTITUCIONES MENCIONADAS EN LOS ARTÍCULOS AQUÍ REUNIDOS. PERO ABARCANDO EL YO, EL NOSOTROS Y EL ELLOS, ESTÁIS MIS COMPAÑEROS DE TRAVESÍA. VOSOTROS SABÉIS QUIENES SOIS, PUES COMPARTIMOS ÍTACA.



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

### A

ATP  
Adenosin Triphosphate, 22, 128

### B

B HLH ZL  
Basic Helyx Loop Helyx Zipper Leucine, 62

### C

cfDNA  
Circulating Free DNA, 14

CTCs  
Circulating Tumor Cells, 12, 14, 22, 23, 24,  
61, 90, 91, 92, 93, 97, 99, 107, 109, 114,  
115, 131, 132, 133, 135, 137

ctDNA  
Circulating Tumor DNA, 12, 26

### D

DAQ  
Date Adquisition, 105

DG  
Deoxiglucosa, 128, 212

DTC  
Diseminated Tumor Cells, 12

### E

ECOG  
Eastern Cooperative Oncology Group, 11

EGFR  
Epithelial Growth Factor Receptor, 9, 11,  
90, 111, 115, 150

EMT  
Transición Epitelial-Mesenquimal, 5, 12, 63,  
101, 115

### F

FDG  
Fluor Desoxi Glucosa, 18

FISH  
Fluorescence In Situ Hybridization, 6, 8,  
133, 138

### G

GFP  
Green Fluorescent Protein, 63

### L

LV  
Latent Variable, 38, 39, 46, 52, 127

### N

nt  
Nucleotide, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37,  
38, 40, 41, 43, 44, 45, 48, 51, 52, 53

### O

OXPHOS  
Fsforilación oxidativa, 18

### P

PBMC  
Peripheral Blood Mononuclear Cells, 22, 80,  
99, 108, 118, 119, 120, 121, 124, 137,  
138

PCR  
Polimerase Chain Reaction, xii, xiii, xiv, 9,  
11, 26, 55, 92, 102, 133, 134, 138, 150

PDMS  
Polidimetilsiloxano, 103, 104

PET

Positron Emission Tomography, 18, 19, 91,  
115, 127, 148

PLS-DA

Partial Least Squares Discriminant  
Analysis, 23, 28, 37, 38, 40, 46, 47, 50,  
52, 135

**S**

SERS

Surface Enhanced Raman Spectroscopy, xii,  
xiv, 15, 16, 17, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29,  
30, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 44, 45,  
46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 59, 60, 63,  
64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 79,  
81, 110, 135, 136, 145, 164

SSCP

Single Strand Conformational  
Polimorphism, 28, 41, 42, 44, 45, 136

ssDNA

Single Strand DNA, 27, 28, 30, 32, 33, 34,  
35, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48,  
50, 51, 52, 53

**W**

WT

Wild Type, 49, 51, 52

**Y**

YFP

Yellow Fluorescent Protein, 63

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: TIPOS DE BIOMARCADORES.....	12
TABLA 2: VENTAJAS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA.....	14
TABLA 3: DEFINICIONES .....	16
TABLA 4: SECUENCIAS DE BASES DE ADN DE UNA SOLA CADENA DE 20 Y 141 NT (TABLA S1) .....	36
TABLA 5: SECUENCIAS DE BASES DE ADN DE CADENA ÚNICA DE 35 NT (TABLA S2) .....	37
TABLA 6: TUMORES CON AMPLIFICACIÓN DE C-MYC. ....	63
TABLA 7: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ESTADO DE PROGRESIÓN DEL CÁNCER EN EL MOMENTO DE LA EXTRACCIÓN DE SANGRE. ....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: PROCESO DE METASTATIZACIÓN .....	6
FIGURA 2: HETEROGENEIDAD TUMORAL.....	8
FIGURA 3: HETEROGENEIDAD SUBYACENTE.....	9
FIGURA 4: MOMENTOS DE INTERVENCIÓN.....	10
FIGURA 5: HETEROGENEIDAD NO DETECTADA POR LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES. .....	11
FIGURA 6: CURVAS DE SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CTCs.....	15
FIGURA 7: FUNDAMENTOS DE LOS ESPECTROS RAMAN Y FLUORESCENTE. ....	17
FIGURA 8: DIFERENCIAS ENTRE LOS ESPECTROS RAMAN Y FLUORESCENTE.....	18
FIGURA 9: TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET). IMAGEN PET DE UN CÁNCER DE PULMÓN, CON UNA PEQUEÑA ADENOPATÍA MEDIASTÍNICA. ....	20
FIGURA 10: ESPECTROS SERS OBTENIDOS BAJO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SAL.....	31
FIGURA 11: ESPECTRO DE EXTINCIÓN DE LOS COLOIDES AGNP, ESPECTRO SERS Y POTENCIAL.....	32
FIGURA 12 : PLEGAMIENTO DE LA MOLÉCULA DE ADN .....	33
FIGURA 13: SIMULACIÓN DE LA ADSORCIÓN DEL SSDNA DE 141 PB.....	34
FIGURA 14: SIMULACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE SSDNA DE 20 PB.....	34
FIGURA 15: SECUENCIA DE RAS.....	35
FIGURA 16: RESULTADOS PROMEDIO DE 54 ESPECTROS.....	38
FIGURA 17: ESPECTROS SERS A 25°C.....	39
FIGURA 18: PLS-DA. CADA ESPECTRO ES UN PUNTO.....	40

FIGURA 19: VARIABLES LATENTES. ....	41
FIGURA 20: ELECTROFORESIS SSCP.....	43
FIGURA 21: PROMEDIO DE ESPECTROS SERS DE LOS FRAGMENTOS DE ADN WT Y MUT. ....	52
FIGURA 22: PREDICCIÓN DE LA PERTENENCIA DE ESPECTROS A UNA CLASE ESPECÍFICA. ....	53
FIGURA 23: SERS DE FRAGMENTOS DE 141 PB, WT Y MUT. ....	54
FIGURA 24: ESPECTROS SERS DE FRAGMENTOS DE 141PB MUT Y WT. ....	55
FIGURA 25: ANÁLISIS PLS-DA A PARTIR DE LOS DATOS ESPECTRALES DE MUT EN FRAGMENTOS DE 141 PB. ....	55
FIGURA 26: ESPECTROS SERS DE FRAGMENTOS DE 141 PB EN DISTINTAS CONDICIONES.....	56
FIGURA 27: ESTRUCTURA DEL CONSTRUCTO. ....	67
FIGURA 28: ESPECTROS DE LA NANOPARTÍCULA EN SUS DISTINTAS FASES. ....	68
FIGURA 29: ESPECTROS A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	69
FIGURA 30: FUNCIONALIDAD DEL CONSTRUCTO Y RESPUESTA EN PRESENCIA DE C- MYC.....	71
FIGURA 31: PROTOCOLO EN MUESTRAS REALES. ....	73
FIGURA 32: PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	81
FIGURA 33: IMÁGENES SEM: ....	84
FIGURA 34: ESPECTRO UV TRAS FUNCIONALIZACIÓN. ....	85
FIGURA 35: CHIP OPTOFLUÍDICO. ....	96
FIGURA 36: CITOMETRÍA DE FLUJO.....	98
FIGURA 37: SEÑAL EN EL DISPOSITIVO OPTOFLUÍDICO.....	99
FIGURA 38: RESULTADOS EN PACIENTES. ....	100

FIGURA 39: RESULTADOS OPTOFLUÍDICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES. .....	101
FIGURA 40: PERFILES DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE LOS FLUORÓFOROS UTILIZADOS. .....	118
FIGURA 41: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO, CONCENTRACIÓN OXÍGENO Y TIEMPOS. ....	119
FIGURA 42: MICROSCOPIA CONFOCAL UNA VEZ OPTIMIZADAS LAS CONDICIONES.	120
FIGURA 43: RESULTADOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO. ....	121
FIGURA 44: CORRELACIÓN ENTRE PROPORCIONES ESPERADAS DE CÉLULAS Y REALES. FLUORESCENCIA PROMEDIO. ....	121
FIGURA 45: EL INCREMENTO DE PUBLICACIONES ACERCA DE BIOMARCADORES ES CLARAMENTE MÁS RÁPIDO QUE SU TRASLACIÓN CÍNICA. MODIFICADO DE ELISABETH DRUCKER Y KURT KRAPPENBAUER 2013 .....	135
FIGURA 46: APLICACIÓN PRÁCTICA DE LOS HALLAZGOS. ....	140
FIGURA 47: DIAGRAMA DEL PROCESO DE APLICACIÓN CLÍNICA DE LAS TÉCNICAS DE BIOPSIA LÍQUIDA PROPUESTAS. ....	141

## ÍNDICE DE APÉNDICES

APÉNDICE A: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	155
APÉNDICE B: CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES.....	157
APÉNDICE C: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	159
APÉNDICE D: CARACTERÍSTICAS DE LAS PUBLICACIONES ORIGINALES .....	164
APÉNDICE E: ARTÍCULOS ORIGINALES .....	165
APÉNDICE F: COPIA DE LOS ARTÍCULOS ORIGINALES.....	166
APÉNDICE G: PATENTES .....	177



## RESUMEN

El examen patológico clásico de los tumores (morfo-histológico) es incapaz de delinear todas las dimensiones de la enfermedad clínica que son requeridas en la práctica. Por otro lado, la caracterización molecular de los tumores, aplicada de forma consistente en oncología clínica, no solo identifica la enfermedad, sino que añade valor predictivo y pronóstico y tiene el potencial de definir objetivos terapéuticos específicos. El estudio anátomo patológico convencional comienza típicamente con la obtención de una muestra de tejido sólido (o citología) mediante una biopsia invasiva. Posteriormente, la muestra se analiza en el laboratorio por histo/inmunohistoquímica (HC / IHC). Este procedimiento permite determinar las características morfológicas y la expresión de biomarcadores en los tejidos estudiados, alcanzándose así un diagnóstico y un pronóstico. Además de la lentitud de este proceso, que implica varias fases: preanalítica (fijación, inclusión, procesamiento y corte), analítica (permeabilización, tinción y visualización) y las etapas post-analíticas (interpretación y diagnóstico), la biopsia de tejido suele ser bastante compleja, ya que es dolorosa, potencialmente dañina para el paciente y costosa. Además, no permite monitorizar la evolución de la enfermedad en tiempo real y, en algunos casos, ni siquiera es factible su realización. Por lo tanto, el desarrollo de métodos no invasivos para detectar, caracterizar y monitorizar tumores es un desafío fundamental en oncología.

La denominada biopsia líquida consiste en la detección y caracterización de células tumorales circulantes en la sangre, así como los ácidos nucleicos, proteínas o exosomas asociados a ellas. Ofrece la oportunidad de investigar el tumor primario y, simultáneamente, la metástasis. A diferencia de las biopsias tradicionales que requieren una cirugía u otros procedimientos invasivos, la biopsia líquida se realiza a través de la toma de muestras de sangre. Más importante aún, la biopsia líquida proporciona una visión dinámica del tumor, ya que puede realizarse en los sucesivos tiempos de evolución de la enfermedad tumoral, permitiendo una monitorización seriada de su curso, una definición rápida de sensibilidad o resistencia a los tratamientos y, finalmente, un diagnóstico precoz de las recaídas. Pero pese a las ventajas que ofrece este método diagnóstico, aún no hay una tecnología validada clínicamente. Las dos principales limitaciones de la biopsia líquida para su validación son:

1-Tecnológica: la complejidad de las tecnologías disponibles, al implicar una alta especialización y centralización (como la citometría de flujo, la PCR o la secuenciación.), son muy costosas y por ello no están disponibles en el “punto de atención al paciente”.

2-Estratégica: la heterogeneidad de los tumores limita los métodos de detección actuales, basados en dianas predefinidas, limitando la capacidad de detección de la mayor parte de las poblaciones celulares.

En esta tesis doctoral se proponen, desarrollan y demuestran cuatro nuevos procedimientos que comparten el objetivo común de intentar superar estas dos limitaciones:

- La aplicación de la técnica de análisis SERS para la detección de mutaciones específicas de tumores en ácidos nucleicos circulantes (cfDNA de k-RAS en cáncer de colon) sin recurrir a PCR ni Secuenciación.
- La aplicación de un dispositivo optofluídico para la detección de células tumorales de cáncer de mama.
- La detección de células tumorales mediante manipulación del efecto Warburg, común a más del 80% de los tipos de tumor.
- La detección subrogada de células tumorales mediante el análisis SERS de la proteína c-MYC, amplificada en prácticamente todos los tipos tumorales.

Dichas tecnologías y estrategias se demuestran teórica y experimentalmente en los artículos compilados en esta tesis, confirmándose su efectividad en pacientes reales. Constituyen una prueba de concepto de su utilidad clínica e inician los primeros ensayos observacionales para su validación clínica.

## ABSTRACT

The classical pathologic examination of tumors (morpho-histological) is unable of outlining all dimensions of the clinical disease. On the other hand, the molecular characterization of tumors, consistently applied in clinical oncology, identifies the disease, adds predictive and prognostic value and determines the presence of specific therapeutic targets. This class of analyses is typically performed on solid tissues acquired through invasive biopsy. Posteriorly, the samples are analyzed in the pathology lab by histo/immunohistochemistry (HC/IHC). This allows to determine the morphological characteristics and the expression of biomarkers in the tissues reaching, thus, a diagnostic and prognostic. Besides the slowness of this process, which involves pre-analytic (fixation, embedding, processing and sectioning), analytic (permeation, staining and visualization) and post-analytic steps (interpretation and diagnostic), a tissue biopsy is often quite challenging as it is costly, painful, or potentially risky for the patient. Further, it cannot track the disease evolution in real-time and, in some cases, it is not even feasible. Thus, the development of non-invasive methods to detect, characterize and monitor tumors is a major challenge in oncology.

Liquid biopsy consists of the detection and characterization of circulating tumor cells and nucleic acids or proteins associated therewith. It offers the opportunity to investigate the primary tumor and, simultaneously, the metastasis. Unlike traditional biopsies that require surgery or other invasive procedures, the liquid biopsy is done through the collection of blood samples. More importantly, the liquid biopsy provides a dynamic view of the tumor, as it can be performed in successive times of disease evolution, allowing serial monitoring of its course, a rapid definition of sensitivity or resistance to treatments and an early diagnosis of relapses. Despite the advantages offered by this diagnostic method there is still no clinically validated technology.

In this thesis by publications has been analyzed the limitations of these technologies, and two main limitations have been defined:

- 1 - The complexity of the available technologies that involve high specialization and centralization, such as flow cytometry, PCR or sequencing, etc., which are very expensive and are not available at the patient's point of care.

2- The heterogeneity of tumors that limits current detection methods, based mainly on predefined targets, limiting the detection of most of the cell populations.

The following approaches are proposed and developed to overcome them:

- The application of the SERS analysis technique for the detection of tumor-specific mutations in circulating nucleic acids (k-RAS cDNA in colon cancer) without resorting to PCR or Sequencing
- The application of optofluidic devices for the detection of tumor cells.
- The detection of tumor cells by manipulation of the Warburg effect, common to more than 70% of tumor types.
- Detection of tumor cells by SERS detection of the c-MYC protein, amplified in virtually all tumor types.

These strategies are demonstrated theoretically and experimentally, in de articles compiled in this doctoral thesis, confirming their effectiveness in real patients.

The structure of the thesis is by compilation of publications. The four articles that configure it share the common objective of defining a liquid biopsy methodology that exceeds the limitations described and is suitable for future clinical validation. They constitute a proof of concept that confirms its clinical utility and initiate the first observational tests for its clinical validation.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	EL CÁNCER	2
1.2	DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER	7
1.3	BIOMARCADORES	7
1.4	BIOPSIA LÍQUIDA	13
1.5	SERS: SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY	16
1.6	EFEECTO WARBURG	19
1.7	OPTOFLUÍDICA	21
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1	HIPÓTESIS DE TRABAJO	24
2.2	OBJETIVO GENERAL	25
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>3</b>	<b>ESTUDIO I</b>	<b>27</b>
3.1	CLASIFICACIÓN CONFORMACIONAL DE LAS MUTACIONES PUNTUALES DE K-RAS MEDIANTE SERS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER	27
3.1.1	<i>Resumen</i>	28
3.1.2	<i>Introducción</i>	28
3.1.3	<i>Objetivos</i>	30
3.1.4	<i>Resultados y discusión</i>	31
3.1.5	<i>Conclusiones</i>	44
3.1.6	<i>Información suplementaria</i>	45

REFERENCIAS .....	57
<b>4 ESTUDIO II.....</b>	<b>61</b>
4.1 REGLAS SERS DE SELECCIÓN DE SUPERFICIE APLICADAS A LA BIOPSIA LÍQUIDA PROTEÓMICA EN MUESTRAS REALES: DETECCIÓN EFICIENTE DE LA ONCOPROTEÍNA C-MYC.....	61
4.1.1 <i>Resumen</i> .....	62
4.1.2 <i>Introducción</i> .....	62
4.1.3 <i>c-MYC</i> .....	64
4.1.4 <i>SERS y reglas de selección</i> .....	65
4.1.5 <i>Objetivos</i> .....	66
4.1.6 <i>Modelo experimental</i> .....	66
4.1.7 <i>Muestras reales</i> .....	72
4.1.8 <i>Conclusiones</i> .....	74
4.1.9 <i>Información Suplementaria</i> .....	74
REFERENCIAS .....	85
<b>5 ESTUDIO III .....</b>	<b>89</b>
5.1 DISPOSITIVO OPTOFLUÍDICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN CÁNCER DE MAMA .....	89
5.1.1 <i>Resumen</i> .....	90
5.1.2 <i>Introducción: biopsia líquida de Células Tumorales Circulantes (CTCs)</i> <sup>91</sup>	
5.1.3 <i>Técnicas</i> .....	92
5.1.4 <i>Objetivos</i> .....	93
5.1.5 <i>Resultados y discusión</i> .....	93
5.1.6 <i>Conclusiones</i> .....	102

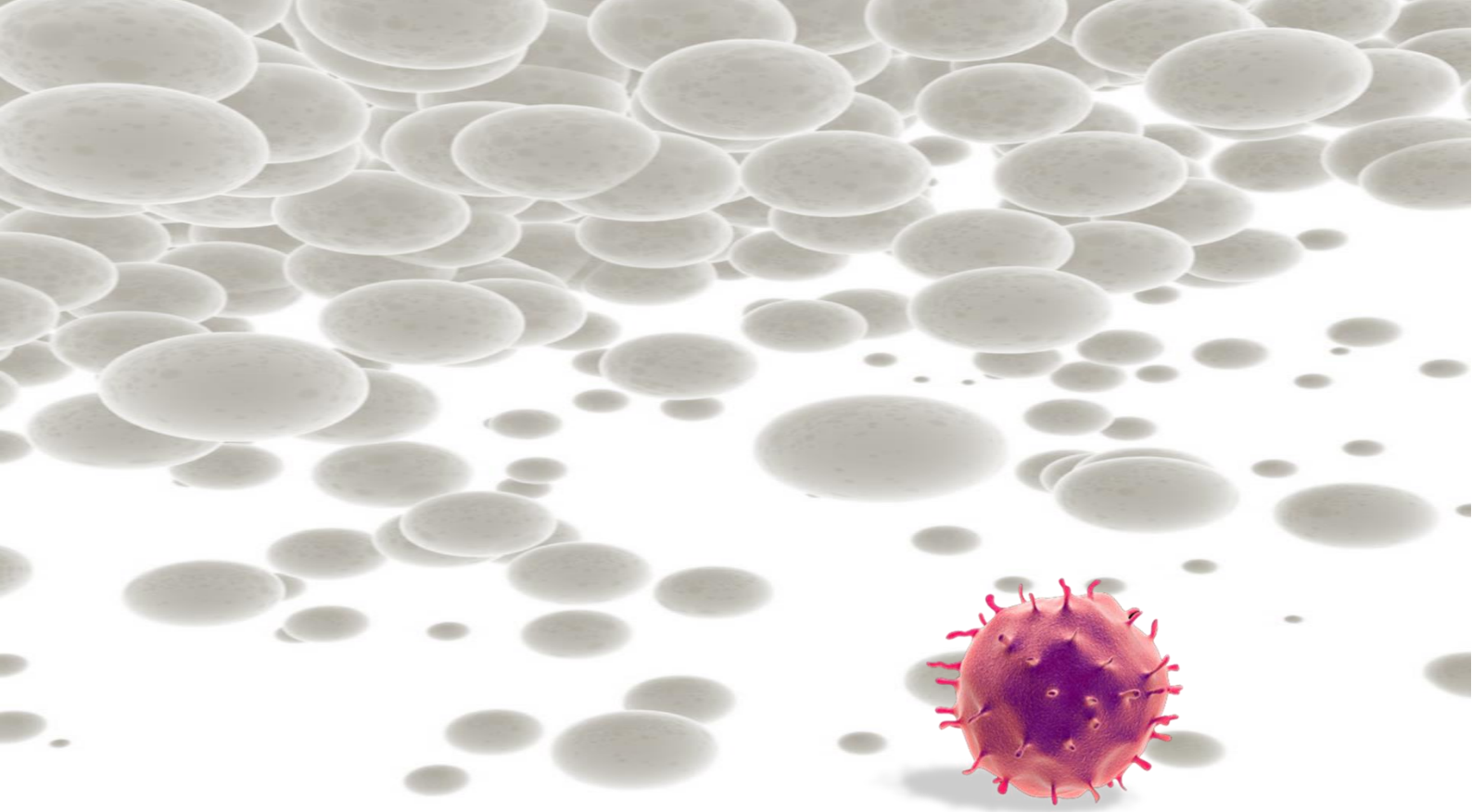
5.1.7	<i>Información suplementaria</i> .....	103
	REFERENCIAS .....	109
<b>6</b>	<b>ESTUDIO IV</b> .....	<b>113</b>
6.1	PROCEDIMIENTO METABÓLICO PARA EL RECONOCIMIENTO UNIVERSAL DE CÉLULAS TUMORALES .....	113
6.1.1	<i>Resumen</i> .....	114
6.1.2	<i>Introducción</i> .....	114
6.1.3	<i>Objetivos</i> .....	116
6.1.4	<i>Resultados y Discusión</i> .....	116
6.1.5	<i>Conclusiones</i> .....	122
6.1.6	<i>Información Suplementaria (Materiales y Métodos)</i> .....	122
	REFERENCIAS .....	126
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>131</b>
7.1	OTROS HALLAZGOS DESTACABLES .....	138
7.1.1	<i>Proteína c-MYC como marcador surrogado</i> .....	138
7.1.2	<i>La hiperoxia como factor inductor de un incremento de captación de glucosa en las células tumorales.</i> .....	139
7.2	PERSPECTIVAS .....	140
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS GENERALES</b> .....	<b>147</b>
<b>10</b>	<b>APÉNDICES</b> .....	<b>153</b>
	<b>A: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA</b> .....	<b>155</b>
	<b>B: CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES</b> .....	<b>157</b>

<b>C: CONSENTIMIENTO INFORMADO .....</b>	<b>159</b>
<b>D: CARACTERÍSTICAS DE LAS PUBLICACIONES ORIGINALES .....</b>	<b>164</b>
<b>E: ARTÍCULOS ORIGINALES .....</b>	<b>165</b>
<b>F: PATENTES .....</b>	<b>177</b>









# 1 INTRODUCCIÓN



La presente tesis doctoral está estructurada como una compilación de cuatro artículos publicados. Los trabajos que en dichos artículos se exponen obedecen a un objetivo común. Todos ellos están centrados en la denominada “biopsia líquida”, título de esta tesis. Se propusieron dos objetivos en relación a este procedimiento: mejorar tecnológicamente los métodos existentes en la actualidad en cuanto a simplicidad y coste y, por otro lado, superar una de sus principales limitaciones: la existencia de heterogeneidad tumoral. En esta introducción se describe el concepto de biopsia líquida, sus aplicaciones y el estado actual de las estrategias disponibles, así como las tecnologías existentes para su implementación clínica. Finalmente, se describen los fundamentos y técnicas adoptadas en los cuatro artículos que configuran esta tesis.

EL CÁNCER

DIAGNÓSTICO

BIOMARCADORES

BIOPSIA LÍQUIDA

SERS

EFEECTO WARBURG

OPTOFLUÍDICA

## 1.1 El Cáncer

El cáncer supone un problema sanitario mundial de primer orden. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) fallecen 8.2 millones de personas cada año por esta enfermedad, lo cual supone más de 22.000 fallecimientos diarios. Además, diversas evidencias epidemiológicas muestran una tendencia al empeoramiento de esta situación, al menos en cuanto a la incidencia de la enfermedad.

Es una enfermedad ocasionada por el fracaso de los controles que regulan la división y la muerte celular. Este equilibrio, entre división y muerte, es el que determina en última instancia la estructura y la función de los organismos pluricelulares y, por tanto, su integridad, identidad y supervivencia.

A lo largo de los últimos 50 años, la teoría y la investigación clínica y experimental han ido constituyendo un modelo de esta enfermedad que se definiría por la aparición de múltiples etapas o estadios sucesivos, cada uno de los cuales estaría caracterizado por la presencia de determinados eventos, habitualmente mutaciones genómicas somáticas, que se irían acumulando. La presencia de estas mutaciones en la línea germinal aceleraría el proceso (cánceres hereditarios). La enfermedad, según este modelo, aparecería tras una compleja secuencia de acontecimientos o fallos. Por lo tanto, se asume que, independientemente de las distintas manifestaciones fenomenológicas o funcionales, las diversas expresiones de esta enfermedad heterogénea descansan en una inestabilidad genómica, es decir, en la presencia de mutaciones genómicas. Clark en un destacado artículo, considerado ya “clásico”, define el cáncer de la siguiente manera:

El cáncer consiste en una población de células anormales que muestran temporalmente un crecimiento/multiplicación en relación con sus vecinas. Dichas células anormales invaden los tejidos adyacentes, atraviesan la membrana basal y proliferan también en el mesénquima próximo a su origen, pudiendo metastatizar a sitios distantes. Es decir, muestran proliferación incontrolada en al menos, tres localizaciones: el compartimiento original, el mesénquima primario y un mesénquima distante (Clark 1991)

*Neoplasia* es una lesión focal, proliferativa, sea tumor benigno, cáncer primario o metástasis. Es una proliferación clonal, es decir, una lesión originadas en una sola

célula primitiva. *Progresión tumoral* designa la secuencia de cambios focales que tienen lugar dentro de las lesiones proliferativas de un sistema neoplásico, resultando en una serie de entidades cualitativamente diferentes. Las lesiones pueden progresar de benignas a malignas o a un incremento de malignidad. Vista como un proceso, la progresión no es obligada, de hecho, pueden describirse regresiones (en algún caso de melanoma).

*Displasia* es una proliferación focal de células con crecimiento temporalmente restringido, que muestran una organización anormal del tejido (diferenciación aberrante, atipia)

En un segundo artículo el mismo Clark (Clark 1995) añade que el cáncer sería una “forma aberrante de vida” y describe lo que denomina “paradigma genético”. Según este, el origen de la enfermedad consistiría en la acumulación de múltiples alteraciones cromosómicas y mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumor.

En este conjunto de ideas quedaron fijados los conceptos que definen hasta hoy la enfermedad denominada cáncer, al menos desde un punto de vista biológico, a los cuales se han ido añadiendo los sucesivos descubrimientos de nuevas mutaciones. El modelo se es descrito como “darwiniano”. Las mutaciones operarían en un proceso evolutivo de la enfermedad. Las que generan fenotipos más aptos serían seleccionadas al dotar a la célula de alguna ventaja proliferativa (Nowell 1976). El fin (pues es un modelo teleológico) sería la proliferación, ya que es esta característica la que otorgaría la mayor ventaja selectiva.

Cada componente de esta secuencia evolutiva alteraría una función capital en la homeostasis de los tejidos y de la vida celular: fracaso en la reparación de mutaciones, fracaso en la apoptosis, activación o sobreexpresión de oncogenes, inhibición de genes supresores o, finalmente, alteraciones específicas en el metabolismo. Con estos fundamentos teóricos se desarrollaron modelos experimentales de proliferación, crecimiento y selección, principalmente a través de líneas celulares (Norton 1988). Las estrategias terapéuticas también se ajustaron a este modelo mediante esquemas de poliquimioterapia contemplando la cinética tumoral según sus postulados (selección natural, crecimiento Gomperziano, supervivencia del más apto). Como decimos, el interés se focalizó fundamentalmente en la idea de proliferación, apareciendo las metástasis como un

fenómeno marginal y peor comprendido. Lo sustancial de este modelo no ha cambiado hasta muy recientemente, cuando el desarrollo de la biología molecular amplió las posibilidades no solo de análisis (conocimiento de las distintas vías de transducción de señal, por ejemplo), sino sobre todo las terapéuticas, con el diseño de drogas dirigidas directamente a alteraciones moleculares específicas (dianas terapéuticas) (Vogelstein and Kinzler 2002).

Todos estos conceptos han sido reunidos en el artículo seminal y muy crítico de Hanahan y Weinberg de 2011 (Hanahan and Weinberg 2011), en el que, además, se señalan nuevos objetivos así como algunas inconsistencias del modelo clásico. La inconsistencia fundamental de dicho modelo es la marginación del papel de las metástasis, ya que, según los datos más recientes, la metástasis no es simplemente un “lugar de llegada” del proceso de la enfermedad, sino que probablemente aparece desde el inicio (Spremlin and Dexter 1983). El proceso que denominamos cáncer implica la adquisición celular o tisular de tres fenotipos: invasivo, proliferativo y metastásico. En un tumor primario se liberan  $10^6$  células/día por gr de tumor (1 gr de tumor =  $10^9$  células).

El 90% de los fallecimientos por cáncer no se deben a la localización u origen primario del tumor, sino al hecho de que dichos tumores primarios son capaces de originar metástasis. Incluso estas últimas pueden, a su vez, crear nuevas metástasis. La importancia de este fenómeno es clara:

- El 30% de los tumores presentan metástasis macroscópicas en el momento del diagnóstico
- Otro 30% presentan micrometástasis (el límite de la capacidad radiológica de distinguir un nódulo está en un centímetro ( $10.000$  millones de células en  $1\text{ cm}^3$ ).
- Es un hecho biológico muy temprano en la enfermedad y aumenta con su curso (la probabilidad de aparición)

Denominamos metástasis a la colonización por parte de las células tumorales de nuevos tejidos no relacionados necesariamente con el tejido originario. La producción de dichas metástasis requiere la migración de las células tumorales bien localmente, lo que se denomina invasión, bien por vía linfática o a través del sistema circulatorio sanguíneo (diseminación hematológica o hematogena). Por tanto, en algún momento de la evolución de la enfermedad deberían ser detectables células

## 1. Introducción

tumorales circulantes o material derivado del tumor primario, tal como proteínas, ácidos nucleicos o exosomas (Figura 1).

La detección analítica de los llamados “marcadores tumorales”, que en general son glicoproteínas derivadas de un tumor primario o sus metástasis, es una aproximación tradicional a la metodología que se ha denominado actualmente “biopsia líquida”. Sin embargo, ninguno de estos marcadores séricos (CEA, CA125, etc.) ha conseguido mejorar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas radiológicas (excepción hecha del PSA en el caso del adenocarcinoma de próstata).

La biopsia líquida consiste en el aislamiento y / o enumeración, primariamente en sangre periférica, de células o ácidos nucleicos tumorales con el fin de establecer el diagnóstico, el pronóstico o incluso la monitorización de la enfermedad tumoral. Por tanto, se trata de un procedimiento no invasivo que podría, en el futuro, complementar a las biopsias quirúrgicas tradicionales

Este tipo de biopsia no solo presenta las ventajas de no ser cruenta y de ser practicable en todo momento, sino que, además, permite superar una de las características de los tumores que más dificultad está creando actualmente en el diagnóstico del cáncer. Se trata de la “heterogeneidad tumoral” (Sprenter and Dexter 1983; Perou et al 2000; Swanton 2012).

Esta heterogeneidad tumoral, es decir, la presencia en los tumores de células tanto genotípica como fenotípicamente diferentes (aun siendo su origen monoclonal) posiblemente explique el mecanismo subyacente a la aparición del fenómeno invasivo y metastásico (Hanahan and Weinberg 2011). Está claro que los tumores originados en tejidos epiteliales (carcinomas y adenocarcinomas) progresan hacia distintas formas de dediferenciación y rediferenciación, dando lugar a distintos grados de malignidad (Figura 2). En estas transiciones fenotípicas las células tumorales llegan a adoptar características similares a aquellas propias de las células mesenquimales embrionarias: movimiento, invasión, migración, deformabilidad, etc. Este fenómeno, subyacente a la heterogeneidad tumoral, se ha denominado “Transición Epitelial Mesenquimal” (EMT). Por otra parte, otra evidencia de dicha heterogeneidad tumoral, en este caso dinámica, se observa al aislar células tumorales circulantes en distintos momentos evolutivos de la misma enfermedad, de tal modo que en cada uno de esos momentos se observan características fenotípicas distintas. Este es el caso de las pacientes con cáncer de mama cuyo

tumor primario no presenta amplificación ni expresión de HER-2, pero cuyas metástasis detectadas mediante biopsias líquidas sucesivas muestran ocasionalmente expresión de dicho oncogén. Se trata de un hecho muy relevante, ya que dichas pacientes, ateniéndose exclusivamente a la biopsia primaria convencional tal como se procede actualmente en la clínica, no recibirían tratamiento específico contra HER-2 y, por tanto, estarían mal tratadas.

La heterogeneidad tumoral, como vemos, no solo es espacial, sino que también es dinámica, tanto desde un punto de vista intratumoral (espacial y temporal) como desde el punto de vista de la metástasis (primario-metástasis o metástasis-metástasis). De forma que dicho fenómeno constituye una limitación primordial a la utilización de las nuevas estrategias terapéuticas basadas en dianas moleculares (medicina personalizada), tal como se acaba de mencionar en el caso de HER-2.

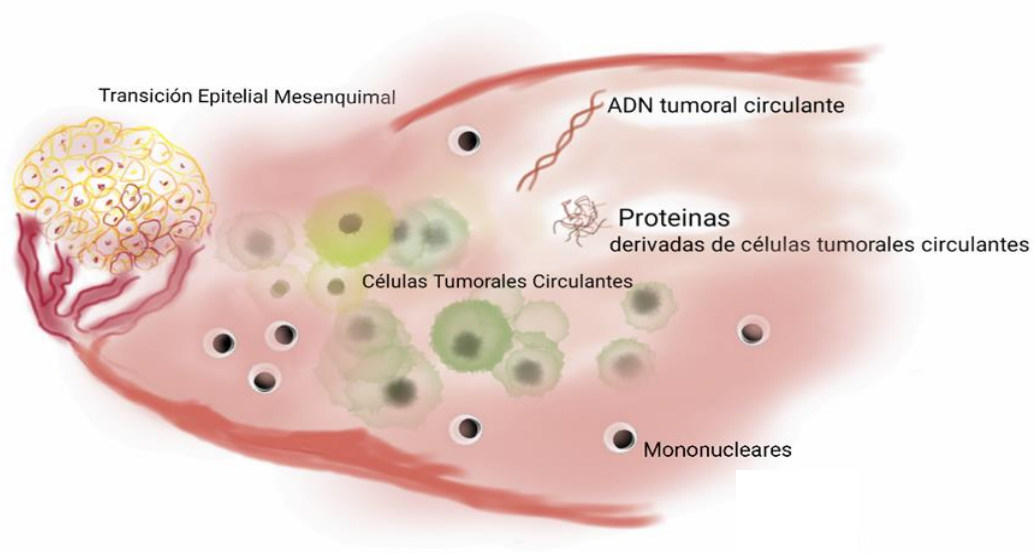


Figura 1: Proceso de metastatización

A partir del tumor primario se diseminan Células Tumorales Circulantes (CTCs). Tanto estas como el tumor primario liberan ADN, ARN, exosomas y proteínas



## 1.2 Diagnóstico del Cáncer

Si bien el enfoque de esta tesis doctoral está dirigido al cáncer en general, la mayor parte de los experimentos se han realizado en modelos de cáncer de mama y colon, tanto en líneas celulares como en pacientes.

Las decisiones terapéuticas actuales en el cáncer de mama se basan en:

- El análisis de datos clínicos, como el estado de los ganglios axilares o tamaño del tumor.
- La histología: tipo histológico, grado nuclear, diferenciación, algún indicador proliferativo (número de mitosis o Ki67).
- La inmunohistoquímica: receptores estrogénicos (ER), receptores de progesterona (PR).
- FISH : (fluorescent in situ hybridization) amplificación de HER-2.

Estos parámetros no solo tienen valor pronóstico, sino que también añaden valor predictivo, es decir, anticipan la probabilidad de responder a tratamientos determinados. Sin embargo, aunque dicha información establece los indicadores pronósticos y predictivos básicos, hay distintas situaciones clínicas en las que se necesita una mayor precisión. En este sentido, se han introducido en los últimos años dos nuevas aproximaciones: perfil genético (Oncotype-DX ®, Mamaprint ®) y biopsia líquida: Cellsearch ® (procedimientos aprobados por la FDA)

El desarrollo de estas técnicas ha supuesto, al menos desde un punto de vista teórico, una nueva taxonomía del cáncer de mama (los denominados por Perou *subtipos intrínsecos* ) (Perou et al. 2000). A pesar de ello, la tecnología que supone esta clasificación es cara y no está disponible para la práctica clínica rutinaria.

## 1.3 Biomarcadores

En los últimos años se han introducido en la práctica clínica nuevos biomarcadores que han facilitado la toma de decisiones médicas.

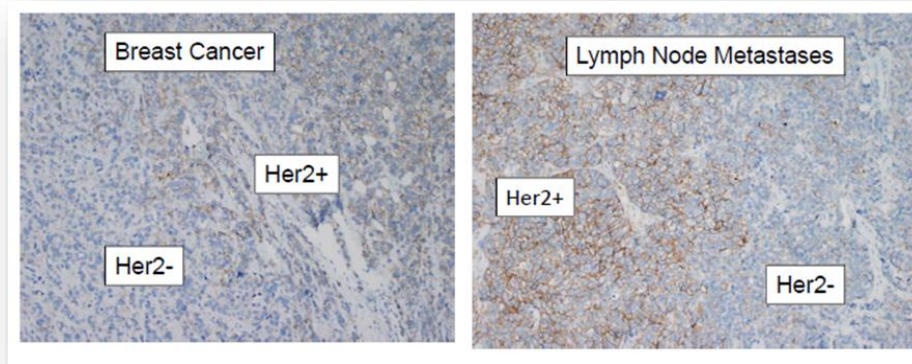


Figura 2: Heterogeneidad tumoral

Una biopsia en la zona HER2- reflejaría una imagen errónea del tumor. Adaptado de Mike Barret, 2013

El diagnóstico de cáncer de mama fue pionero en el uso de biomarcadores histológicos: grado nuclear, tasa de replicación, grado de necrosis, invasión linfovascular, presencia de linfocitos, etc.). Muy tempranamente se introdujeron, además, biomarcadores inmunohistoquímicos: p53 mutado, Ki67, Receptores Hormonales, HER-2, etc. como se ha mencionado previamente. Y más recientemente marcadores moleculares: FISH de HER2, o los análisis de expresión génica múltiple previamente citados (Oncotype© o Mamaprint©).

Como resultado se ha producido no solo una mejoría en la supervivencia de esta enfermedad, sino además una disminución de los daños relacionados con los tratamientos (al establecerse criterios muy precisos para estratificar a las pacientes de cara a uno u otro tratamiento, neoadyuvancia, cirugías limitadas, ganglio centinela, etc.). El hecho, paradigmático en el diagnóstico del cáncer de mama, es que subyaciendo a biopsias patológicamente indistinguibles, se han descrito nuevas características, hasta ahora no visibles, que definen claramente enfermedades clínicamente distintas. En la Figura 3 vemos un ejemplo idealizado de las preparaciones histológicas con hematoxilina-eosina de tumores de mama de tres pacientes diferentes que son anatomopatológicamente indistinguibles. Sin embargo, la evolución clínica de las tres pacientes es bien diferente, como muestran las curvas de supervivencia actuarial.

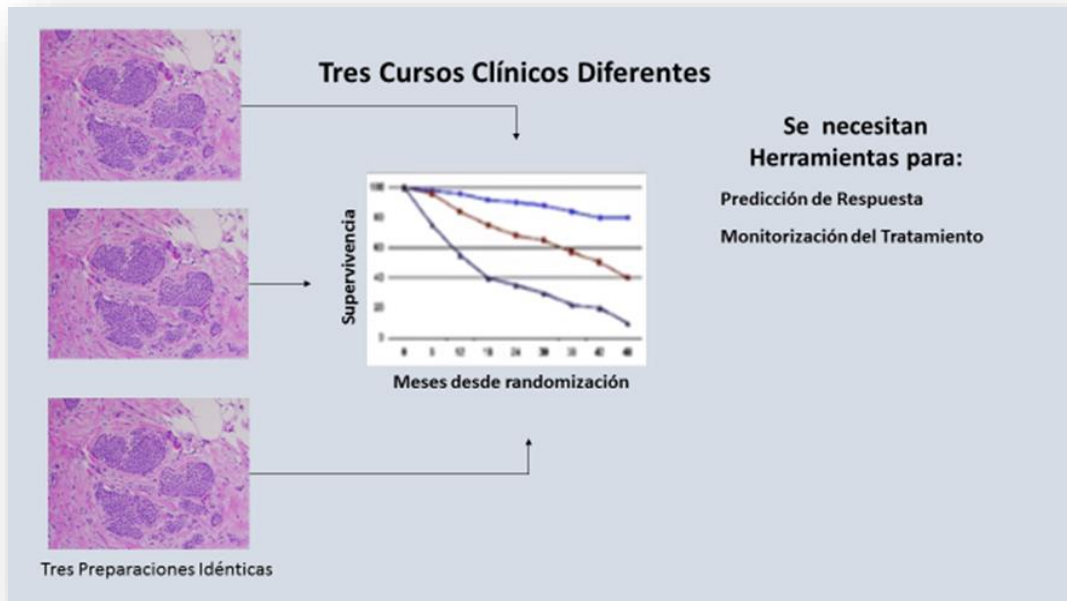


Figura 3: Heterogeneidad subyacente

Tres biopsias aparentemente idénticas de tres pacientes cuya evolución clínica, sin embargo, es completamente diferente. Adaptado de John A. Martignetti, 2016

A la caracterización de estas propiedades subyacentes se le ha denominado medicina personalizada o de precisión, y ha podido desarrollarse gracias a las técnicas de biología molecular, fundamentalmente la PCR (polymerase chain reaction) y la secuenciación automatizada de ADN.

Pero el papel de estos biomarcadores no se limita al diagnóstico, sino que también son útiles al identificar nuevas dianas terapéuticas, añadiendo un elemento más de precisión a los tratamientos (Tabla 1). El hito de esta estrategia lo marco la introducción del Imatinib (Hoffmann et al. 2017) como tratamiento dirigido a una diana específica, molecularmente identificada: el producto híbrido del nuevo gen producto de la translocación BCR-Abl (en la Leucemia Mieloide Crónica) o la introducción del Trastuzumab (Dall, Koch et al. 2017) en el cáncer de mama con HER2 amplificado. Estos éxitos se han ido extendiendo a otros tipos tumorales, destacando el caso del carcinoma no microcítico de pulmón portador de mutaciones puntuales en EGFR (Rosell et al. 2017; Saxon et al. 2017) o de traslocaciones EML4-ALK (Zhang, Shiratsuchi et al. 2017), del melanoma con mutaciones en BRAF (Bruno, Martinuzzi et al. 2017) o del adenocarcinoma colorrectal con mutaciones en K-RAS o N-RAS (Rodríguez-Salas, Dominguez et al. 2017). En todos estos, casos no solo se realiza un diagnóstico y pronóstico más preciso, sino

que al disponerse de fármacos dirigidos a las dianas mencionadas, los tratamientos son mas efectivos (Figura 4).

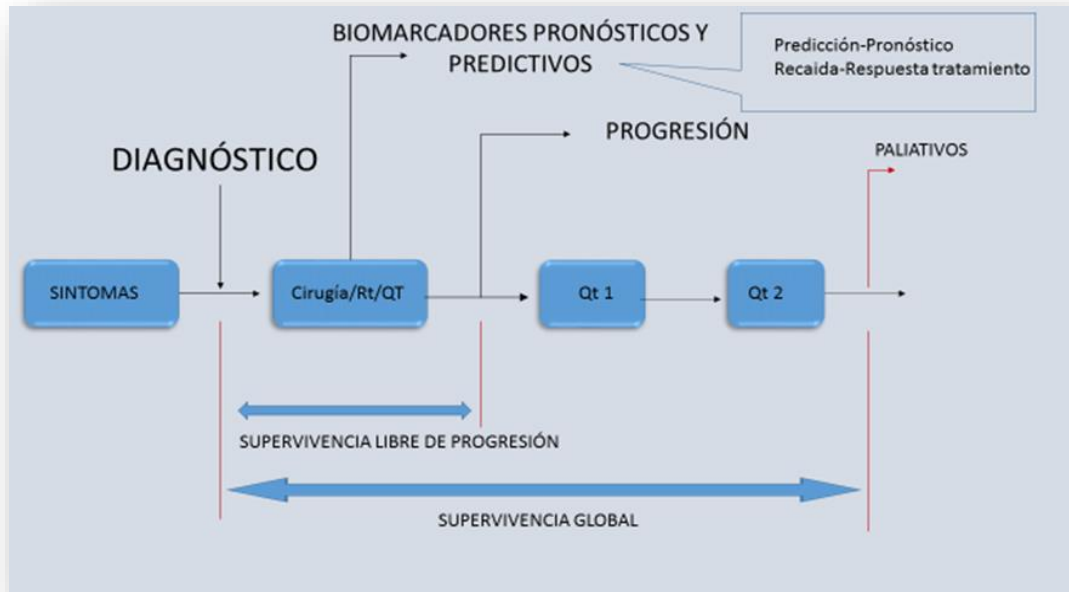


Figura 4: Momentos de intervención

Distintos papeles de un biomarcador, como la biopsia líquida, en cada momento de la evolución de una enfermedad tumoral genérica. Se muestra la historia natural habitual de un cáncer. Adaptado de A, Martignetti 2016

Por otra parte, estos nuevos biomarcadores, sobre todo los genómicos, han mostrado una complejidad subyacente en cada tumor hasta ahora desconocida. Se trata de la denominada heterogeneidad inter e intra-tumoral, o la heterogeneidad genotípica entre tumor primario y metástasis (Spremlli and Dexter 1983). Incluso se ha observado heterogeneidad temporal, es decir, fluctuaciones poblacionales en un mismo tumor a lo largo del tiempo (McGranahan and Swanton 2017, Miyamoto, Ting et al. 2017). Ante estos hechos, las biopsias convencionales se muestran insuficientes (Brock et al. 2009; Huang et al. 2017) (Figura 5).

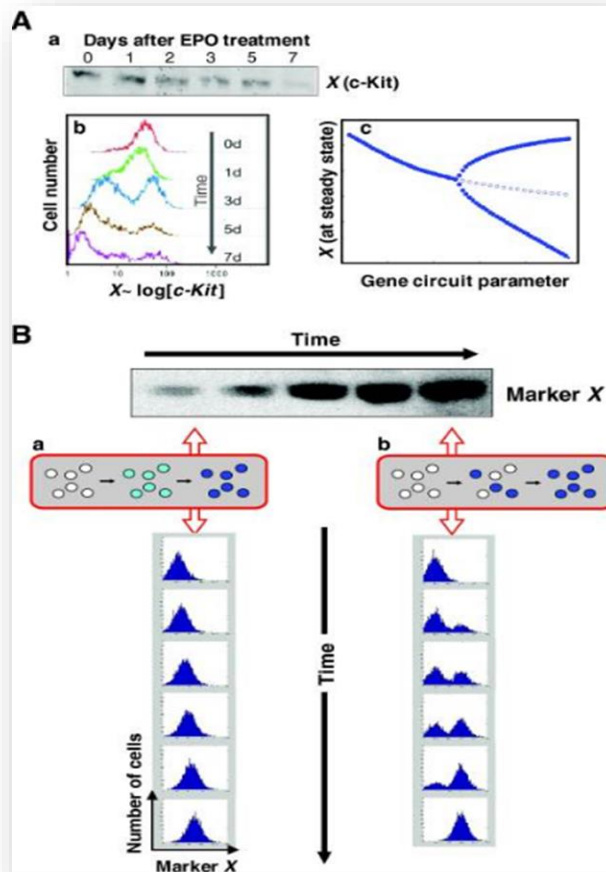


Figura 5: Heterogeneidad no detectada por las técnicas convencionales.

Por Western se observa una intensidad decreciente de la banda. La misma muestra por citometría, en b, refleja la presencia de dos poblaciones. En c la línea continua representa el promedio que oculta la bifurcación de dos fenotipos. (B) El mismo fenómeno, en a una transición brusca (on-off) en b una transición con dos poblaciones. El fenómeno queda oculto en Western. Adaptada de Sui Huang, 2009.

En esta figura se puede observar como muchas técnicas moleculares, las basadas en PCR (amplificación en cadena de polimerasa) o los Western Blot (electroforesis y transferencia de proteínas) no son capaces de diferenciar la heterogeneidad intratumoral debido a su propio diseño, basado en análisis promedio o poblacional. En las técnicas convencionales muchos fenómenos esenciales para entender la evolución de la enfermedad y su tratamiento, permanecen ocultos, precisándose nuevas estrategias y tecnologías para detectarlas. En la Figura 5, por ejemplo, se observan los resultados de un western blot que expresan un incremento progresivo de señal. Sin embargo, en un estudio citométrico de la misma proteína en

poblaciones celulares se observan fenómenos de clonalidad en el tiempo: aparecen dos poblaciones celulares no identificables por western.

Tabla 1: Tipos de biomarcadores.

Todas estas categorías pueden ser asumidas por la biopsia líquida. Adaptado de Johnatan D. (Jonathan 2014).

Tipo de Biomarcador	Definición	Ejemplo
<b>Diagnóstico</b>	Identifica presencia de enfermedad y su origen	Biopsia tradicional
<b>Pronóstico</b>	Categorización de los pacientes por su riesgo de progresión/recidiva. Define la historia natural del proceso	Mamaprint®, Estado funcional (ECOG), presencia de ganglios en axila en Ca. Mama
<b>Predictivo</b>	Categorización por probabilidad de responder a un tratamiento	EGFR en Ca. Pulmón, K-RAS en ca. Colon, HER2 en Ca. Mama, Oncotype®
<b>Farmacodinámico</b>	Evaluación dinámica de la respuesta a un tratamiento determinado	Tensión Arterial, Radiología, Dolor
<b>Surrogate endpoint</b>	Sustituye un endpoint clínico. Son un subgrupo de los Farmacodinámicos	Supervivencia Global Supervivencia libre de enfermedad

En otra línea de trabajo, que aporta un concepto nuevo de heterogeneidad funcional (Alizadeh et al. 2015), se ha demostrado que existen distintas subpoblaciones celulares dentro del mismo tumor tanto con capacidad metastásica, como no metastásicas (probablemente la mayoría pertenecen a esta última clase) . La existencia de las primeras (las metastásicas) fundamenta la hipótesis de las Stem Cell tumorales (células madre tumorales). Finalmente, otro elemento que se añade al concepto de heterogeneidad tumoral es la ya mencionada hipótesis de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en el tumor primario (Gerlinger, Rowan et al. 2012).

## 1.4 Biopsia líquida

La práctica médica oncológica tiene que actuar y adoptar decisiones en este ámbito de complejidad molecular, celular, tisular y clínica, previamente descrito, con el objetivo de definir con exactitud la situación de un paciente determinado y adoptar la mejor opción terapéutica para él y en ese momento particular. Para ello, las fuentes de información del clínico deben ser fiables, sensibles y específicas. Los tratamientos oncológicos tienen un índice terapéutico muy bajo (ratio dosis terapéutica/dosis tóxica), por lo que la precisión de la información tiene que ser muy alta, y, además, debe tener continuidad en el tiempo.

La denominada biopsia líquida, conceptualmente, cumple con todos estos requisitos. Por ello podría cambiar de forma radical el enfoque diagnóstico y terapéutico del cáncer, así como la monitorización clínica de esta enfermedad.

Bajo este concepto se reúnen dos enfoques estratégicos distintos: uno dirigido a las células tumorales circulantes (CTCs –Circulating Tumor Cells-) y el otro dirigido a los ácidos nucleicos circulantes, generalmente al ADN (cfDNA –circulating free DNA- o ctDNA –circulating tumor DNA-). Estas células circulantes y sus “materiales” derivan, o bien del tumor primario o bien de las propias metástasis. En este último caso se suelen denominar células tumorales diseminadas (DTC). En muchas ocasiones las biopsias clínicas tradicionales, es decir, la obtención directa de material tumoral, son impracticables. Esto suele ser habitual, por ejemplo, en el cáncer de pulmón, principalmente en estadios I o II, es decir, estadios muy iniciales (Figura 6).

Una segunda ventaja de la biopsia líquida sobre la tradicional es la posibilidad de determinar el fenotipo tumoral en el tiempo, es decir, la evolución del tumor. Esto último es esencial cuando se administra un tratamiento, ya que permite monitorizar su efectividad, así como las posibles resistencias que pudieran aparecer en el curso del mismo. La detección de estos fenotipos celulares resistentes permite no solo evitar toxicidades innecesarias, sino también ajustar individualmente el tratamiento antes de que la enfermedad progrese.

Tabla 2: Ventajas de la biopsia líquida

CARACTERISTICAS	BIOPSIA LÍQUIDA	BIOPSIA TISULAR
<b>Invasiva</b>	No	Si
<b>Idónea para repetir</b>	Si	No
<b>Estabilidad de la muestra</b>	Si	Tras procesamiento
<b>Monitorización longitudinal</b>	Si	No
<b>Coste</b>	Bajo (según técnica)	Alto
<b>Tiempo de procesamiento</b>	Corto	Largo
<b>Tasas de fallo</b>	Bajas	Altas (según localización)
<b>Material disponible para post-procesamientos</b>	Amplio	Escaso
<b>Dolor/Riesgo</b>	No	Si
<b>Ingreso Hospitalario</b>	No	Según localización/Riesgo

En tercer lugar, la biopsia líquida permite determinar la enfermedad residual microscópica. Esto es importante en dos situaciones clínicas: en tratamientos adyuvantes o tras una cirugía con intención radical (denominadas resecciones tumorales R0) o en la detección temprana de recaídas.



## 1. Introducción

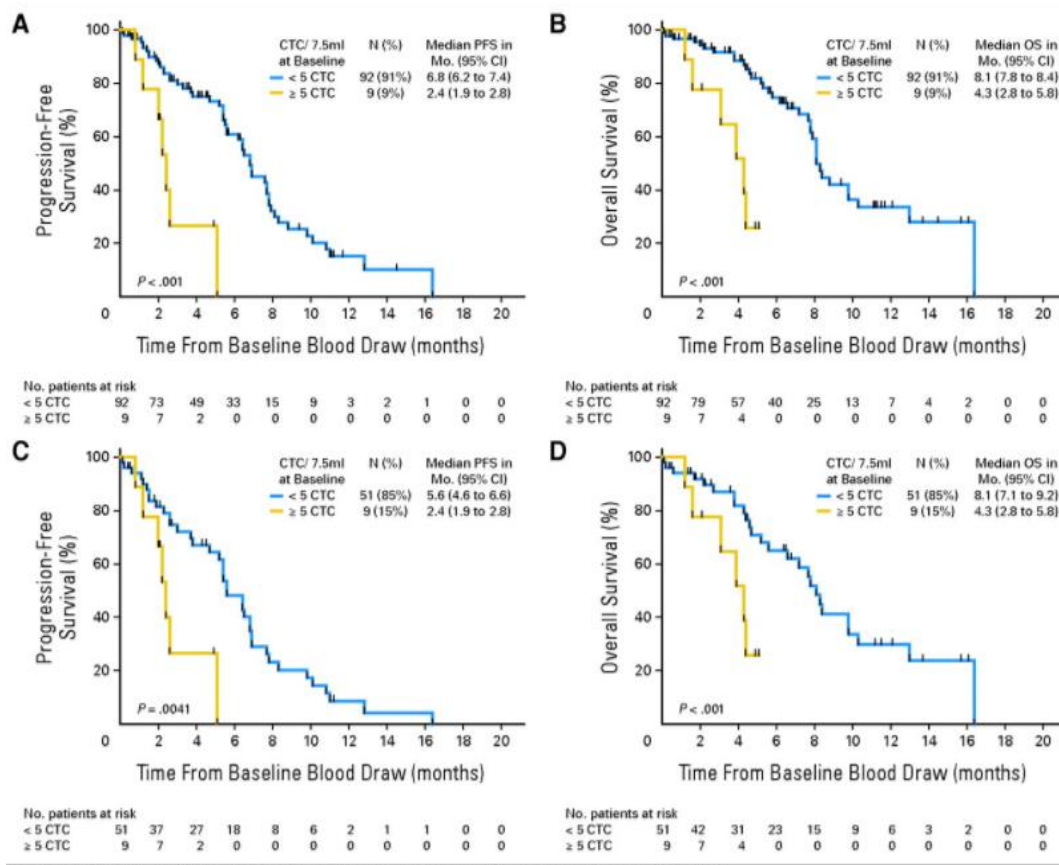


Figura 6: Curvas de supervivencia en función del número de CTCs

Supervivencia libre de enfermedad y global en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico estadio III-IV (A y B) y solo estadio IV (C y D) en función del número de células tumorales detectadas en sangre (más –azul- o menos de 5 –amarillo-). Adaptado de Mathew G. Krebs, 2011

Finalmente, su papel podría ser esencial en la definición e “end-points” (objetivos clínicos para evaluar la efectividad de tratamientos, por ejemplo, la supervivencia global, o la supervivencia libre de enfermedad) o su sustitución (surrogate end-points) por criterios más precoces y manejables tanto en clínica convencional como en el desarrollo de nuevos fármacos (ensayos clínicos). La Tabla 2 esquematiza las ventajas de la biopsia líquida frente a la tisular y en la Tabla 3 se definen algunos conceptos aplicables a la misma.

En resumen, de los múltiples puntos de vista descritos puede deducirse que el análisis de las células y del ADN tumoral circulante puede constituirse en plataforma para superar las limitaciones de los actuales métodos de diagnóstico y seguimiento del paciente oncológico.

Pero tanto, el ADN como las CTCs tumorales son muy escasas (CTCs:  $1/10^6$  o  $1/10^9$ , cfDNA: 5-16 ng/mL en sanos, 1157 ng/mL en pacientes con cáncer de colon,

ambas cantidades son promedios) (Schwarzenbach et al. 2008), por lo que la introducción de nuevas plataformas sensibles y específicas es imprescindible. Las disponibles en la actualidad son complejas y centralizadas, precisando personal especializado para su implementación.

Por otro lado, los criterios de selección celular en dichas plataformas deberían ser lo más universales posible (dirigidas a marcadores o “propiedades” tumorales genéricas), debido precisamente a la heterogeneidad intrínseca de dichas células. En cuanto al ADN, el problema principal de su detección es que precisa el conocimiento previo de la característica que se busca (mutación, translocación, etc.) que caracteriza al tumor primario, por lo que son precisas tecnologías capaces de analizar este ADN en las células circulantes.

Tabla 3: Definiciones

<b>Marcador Biológico</b>	<b>Un signo físico o de laboratorio que se asocia a un proceso patológico y que tiene un valor pronóstico o diagnóstico putativo</b>
<b>Surrogate end-point</b>	<b>Un biomarcador que sirva como un sustituto de un end-point clínicamente significativo y del cual se espera que prediga el efecto de una intervención terapéutica.</b>
<b>End-point clínico</b>	<b>Una valoración clínicamente significativa de cómo el paciente, siente y sobrevive</b>

## 1.5 SERS: Surface Enhanced Raman Spectroscopy

La espectroscopia Raman de dispersión en superficie (SERS, Surface Enhanced Raman Spectroscopy) es una técnica que combina la espectroscopía láser con las características (resonancia de plasmones localizada-LSPR) de nanoestructuras metálicas. Esta interacción láser-plasmón resulta en un aumento de la señal Raman de los sistemas moleculares cercanos a tales nanoestructuras (Kotanen, Martinez et al. 2014). El espectro Raman se basa en los fenómenos de dispersión inelástica de la luz monocromática (generalmente laser) en rango visible, infrarrojo o

ultravioleta. La luz dispersada por el analito está relacionada con los modos vibracionales que caracterizan su estructura molecular, lo cual es muy específico de cada material. Los cambios conformacionales de la molécula en estudio ocasionan espectros específicos. La mejoría que la técnica SERS aporta al Raman puede alcanzar hasta 14 órdenes de magnitud con respecto a las señales convencionales de dispersión Raman (RS) de las moléculas. El espectro obtenido es la firma vibratoria de la molécula, y por lo tanto, contiene toda la información estructural de dicha molécula en estudio. De este modo, la espectroscopia SERS combina niveles de detección con especificidad de una sola molécula con una rápida adquisición de datos sin requisitos especiales o preparación de muestras. Todas estas características hacen de la SERS una técnica con potencial aplicabilidad en campos tan diversos como la ciencia de los materiales, la química analítica o la biomedicina.

Cuando una fuente de luz ilumina una molécula interaccionando con la nube electrónica de sus enlaces, el fotón incidente excita uno de los electrones hasta un estado virtual (Figura 7) antes de relajarse otra vez a un estado vibracional de menor energía. La mayoría de los fotones son dispersados elásticamente (radiación denominada de Rayleigh), es decir con la misma longitud de onda que los fotones incidentes. Sólo una pequeña fracción de la luz (aproximadamente 1 en 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> fotones) es dispersada ópticamente a frecuencias diferentes de la de los fotones incidentes (efecto Raman). Si el fotón resultante es de inferior frecuencia, entonces se genera una línea que se denomina Stokes, en el lado rojo del espectro incidente. En el caso de que la molécula se encontrara ya en un estado vibracional excitado, los fotones incidentes serán desplazados a frecuencias más elevadas (azul) del espectro, generando una línea denominada antiStokes

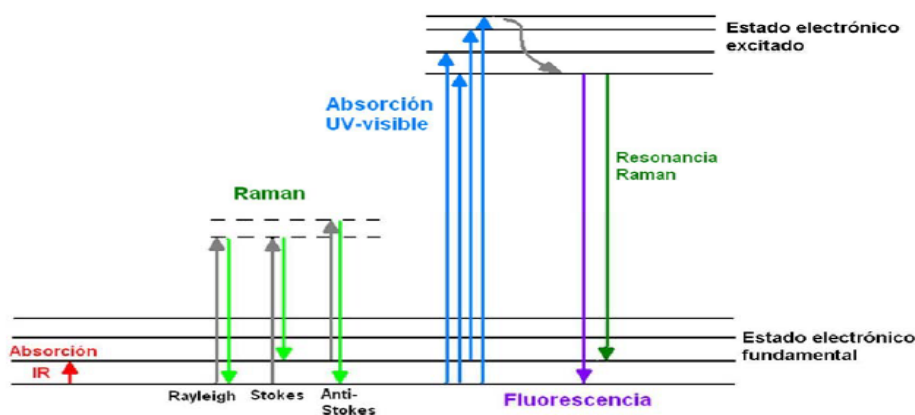


Figura 7: Fundamentos de los espectros Raman y Fluorescente.

Se acepta que al fenómeno SERS contribuyen dos mecanismos: el mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (TC). El mecanismo EM debe estar presente en toda la experiencia SERS suficientemente intensa, mientras que el mecanismo CT puede o no participar, dependiendo de las condiciones.

Desde el punto de vista biológico, la ventaja de esta metodología frente a la fluorescencia convencional es que no son precisos complejos marcajes y el uso de anticuerpos intermedios, como en el caso de las inmunohistoquímicas. Por otra parte, la fluorescencia convencional presenta una banda mucho más ancha que el espectro SERS, lo cual implica, además, que aparece una gran superposición de frecuencias entre los distintos fluoróforos, lo que le resta definición y limita las posibilidades de usar múltiples determinaciones simultáneas. Por último, la señal de fluorescencia no está estructurada, es continua, por lo que transmite muy poca información, mientras que el espectro SERS está muy estructurado, constituyendo una firma molecular muy precisa, incluso de mínimos cambios en la estructura molecular (Figura 8).

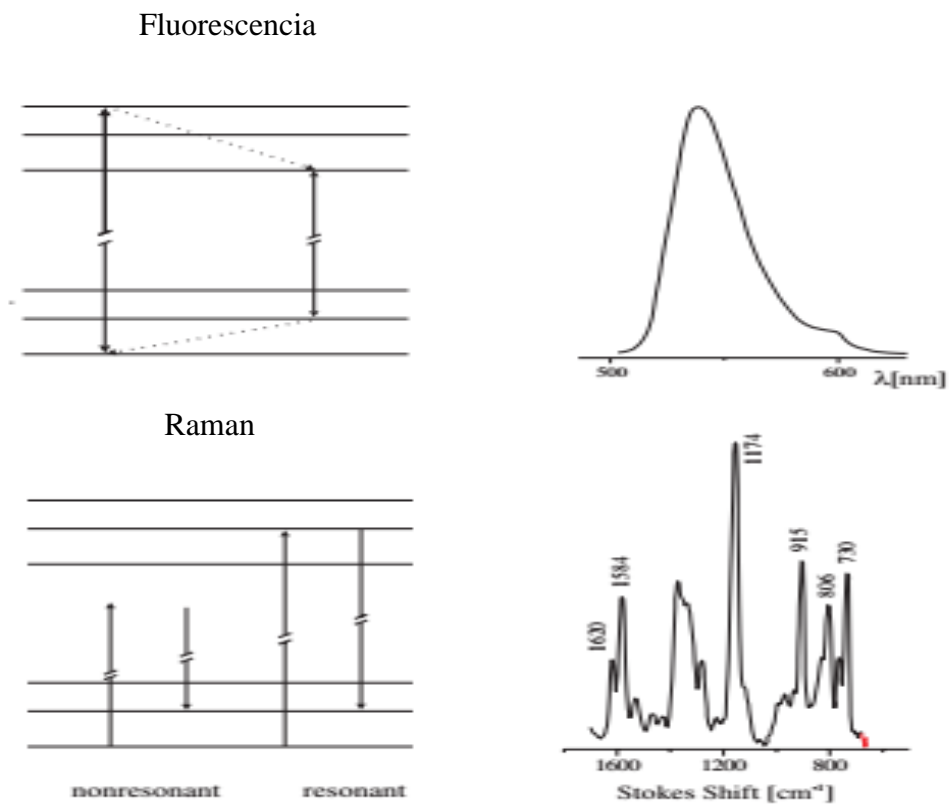


Figura 8: Diferencias entre los espectros Raman y Fluorescente.

Todas estas características, añadido a su simplicidad técnica y bajo coste, son las que justifican la elección de esta técnica como metodología de dos de los objetivos propuestos, es decir, la detección de mutaciones características del cáncer de colon (K-RAS) en ácidos nucleicos circulantes (primer artículo) y la detección de proteínas específicas (segundo artículo) todo ello en el contexto de estrategias específicamente diseñadas para las biopsias líquidas.

### 1.6 Efecto Warburg

Otto Warburg (1883-1970), midiendo el consumo de lactato, glucosa y oxígeno de los tumores, comprobó que, en relación con las células sanas, las células tumorales consumían cantidades mayores de glucosa. Y esto ocurría independientemente de la presencia o no de oxígeno. Al fenómeno se le denominó “glicolisis aerobia” o fermentación en condiciones de aerobiosis y, posteriormente, efecto Warburg. Este investigador pensó que, ya que este fenómeno parecía común a todos tipos de células tumorales, el origen del cáncer estaría en una “lesión” de las mitocondrias (en las que se produce la respiración celular aeróbica; es decir, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa –OXPHOS-). Posteriormente el fenómeno se describió en otros tipos celulares no tumorales, pero de rápida proliferación (fibroblastos en los procesos de cicatrización, por ejemplo). Otro fenómeno específico y universal de las células tumorales, fue descubierto por Herbert Grace Crabtree (efecto Crabtree) y consiste en la disminución del consumo de oxígeno con el aporte de glucosa en dichas células a diferencia de las normales, en las cuales el fenómeno se invierte. En definitiva, las células malignas se caracterizan por una reprogramación genética o epigenética de su metabolismo (Ngo et al. 2015, Xu et al. 2015, Danhier et al. 2017, Schwartz et al. 2017).

El efecto Warburg ha sido el fundamento de la tecnología diagnóstica denominada PET (Tomografía por Emisión de Positrones), técnica radiológica (Figura 9) que utiliza un contraste consistente en 2-Fluoro-2-Desoxi-D-Glucosa (FDG) (Boellaard et al. 2015). Las células tumorales incorporan ávidamente y a través de receptores específicos (GLUT) dicha molécula en contraste con los tejidos normales. Pero pese a las elevadas tasas de incorporación de glucosa, la fosforilación de la misma impide

que sea liberada al medio (acumulándose en el interior celular) y, además, interrumpe la glicolisis incrementando aún más la demanda de glucosa. El radical 2-hidroxilo de la molécula de glucosa es necesario para continuar el proceso de glucólisis, por lo que, al igual que ocurre con la 2-desoxi-D-glucosa, la sustitución de dicho hidroxilo por hidrógeno en la FDG impide su metabolización en las células y por ello la FDG-6-fosfato formada no entra en la ruta glicolítica hasta el decaimientos de la radiactividad (transformándose el átomo de F en H)

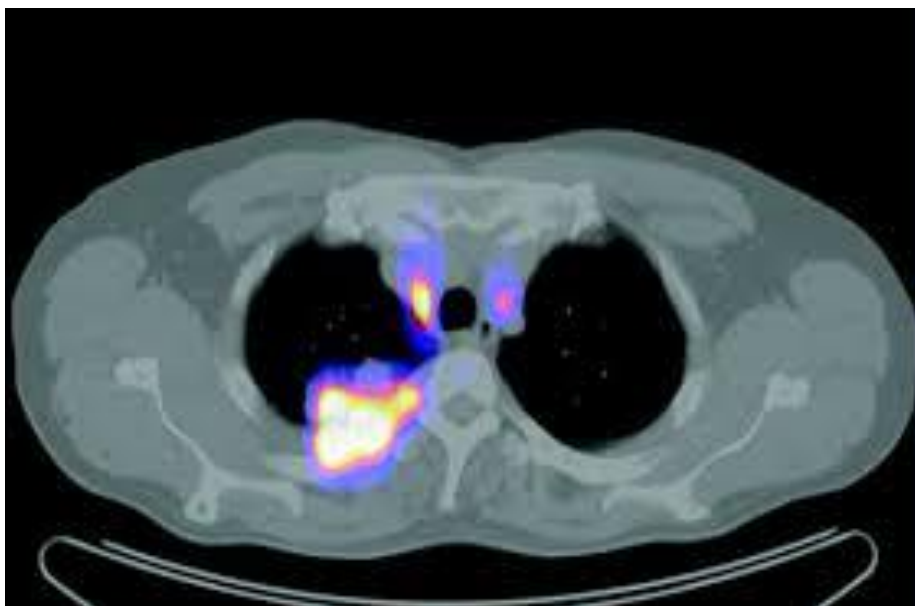


Figura 9: Tomografía por Emisión de Positrones (PET). Imagen PET de un cáncer de pulmón, con una pequeña adenopatía mediastínica.

Como resultado, la distribución de  $^{18}\text{F}$ -FDG es un buen reflejo de la distribución del consumo y fosforilación de glucosa en las células del cuerpo. En el cuarto artículo de esta tesis, se plantea la hipótesis del uso de este efecto para la detección de células en el torrente circulatorio. Se diseñó experimentalmente un modelo para optimizar las condiciones de consumo diferencial de glucosa (deoxiglucosa marcada con un fluoróforo) en las células malignas y se demostró su efectividad mediante citometría de flujo (O'Neil et al. 2005, Millon et al. 2011, Chen, Zhang et al. 2015).

Por otro lado, se explora la hipótesis de manipular el efecto Warburg mediante el aumento de oxígeno (hiperoxia) en el microambiente celular para incrementar la captación de glucosa por las células malignas, y se demostró dicho fenómeno.

## 1.7 Optofluídica

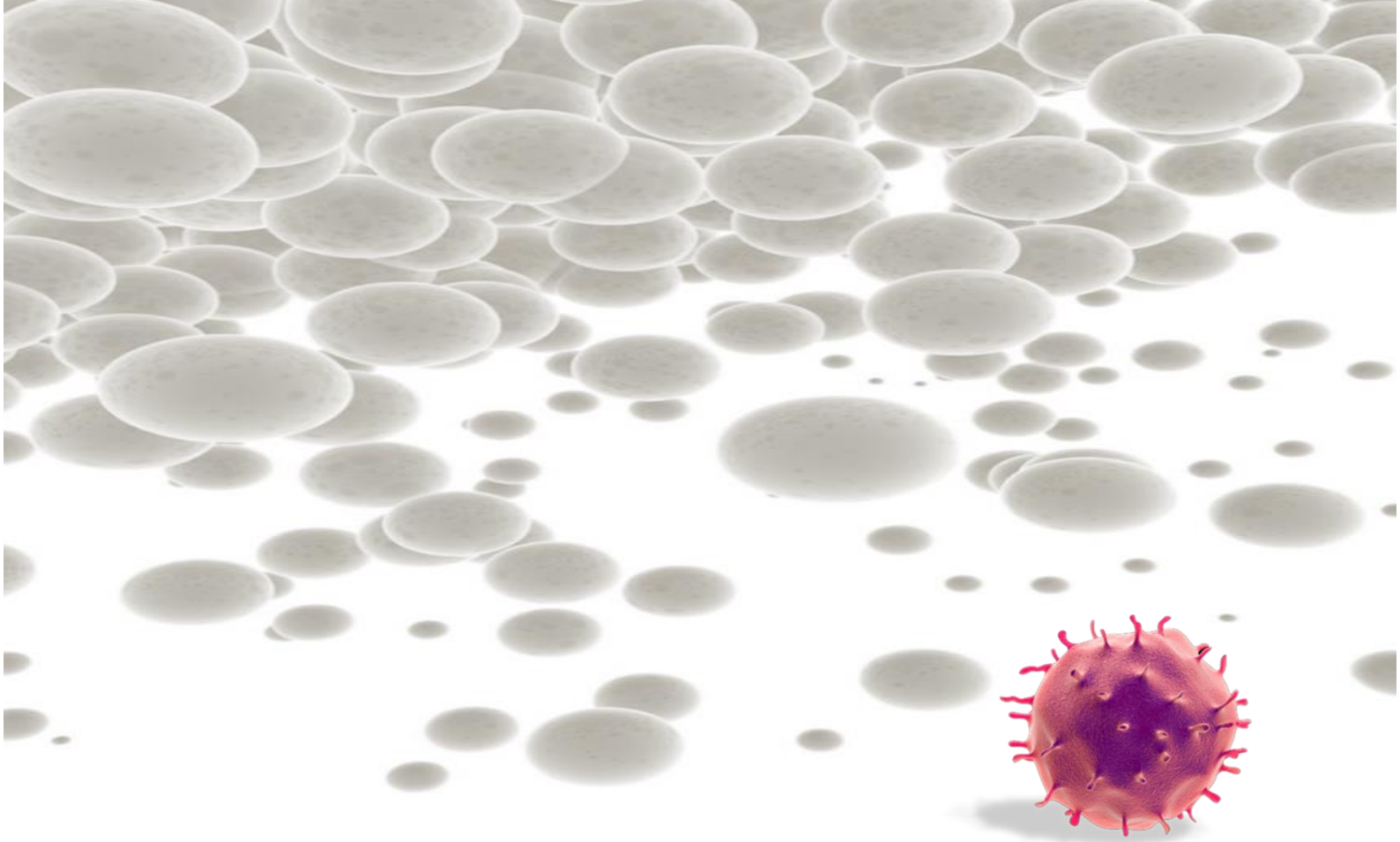
Microfluídica se ha definido, generalmente, como el estudio del flujo de fluidos y transporte de sustancias en los mismos, en dimensiones entre 100 nm y 100  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, el término “optofluídica” apareció por primera vez en 1985 en un artículo de Jones (Jones 1985) en el que revisaba el uso de fibras ópticas como sensores y sistemas, incluyendo el control neumático de microválvulas (Jonathan 2014). Las posibilidades tecnológicas de construir redes de microcanales han hecho crecer las posibilidades de diseño de dispositivos con uso diagnóstico. El concepto derivado de esta tecnología es “lab-on-a-chip”, que transmite la idea de implementar de forma sencilla y portable la complejidad del laboratorio. El desarrollo de nuevos biomarcadores moleculares en oncología, incluida la biopsia líquida, encuentra una barrera crítica en los procesos de validación clínica y reproducibilidad. Esto se debe esencialmente a que las tecnologías disponibles hasta ahora requieren, por su complejidad, coste y tamaño, personal especializado, y esto las hace inaccesibles a la práctica clínica general. Es decir, no están próximas al paciente. Es de destacar que, pese a los enormes esfuerzos de investigación en ese terreno, solo hay un dispositivo aprobado por la FDA norteamericana (Food and Drug Administration) para la caracterización de células tumorales circulantes (CellSearch®).

Con la excepción de unas cuantas unidades centralizadas, la mayoría de las áreas sanitarias, con recursos generalmente limitados, no cuentan con la infraestructura necesaria para apoyar tecnologías tan especializadas.

En el segundo artículo de esta tesis doctoral se desarrolla un dispositivo optofluídico para detectar células tumorales circulantes a partir de una muestra de sangre. Su efectividad se compara con la citometría de flujo, resultando equivalentes. En el diseño se utilizan dos marcadores específicos para la detección de dichas células tumorales, en este caso células de cáncer de mama.







## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

OBJETIVO  
GENERAL

OBJETIVOS  
ESPECÍFICOS

En la introducción se han descrito las limitaciones fundamentales de las biopsias tradicionales para obtener toda la información que requeriría un diagnóstico de precisión adecuado a un tratamiento individualizado y, al mismo tiempo, adaptado a la evolución temporal del cáncer.

La biopsia líquida representa un concepto capaz de superar dichas limitaciones, pero actualmente aún no está validada clínicamente. La razón es que no se ha

implementado aún ninguna tecnología o estrategia reproducible que aborde el objeto de estudio (células, ADN o proteínas) teniendo en cuenta sus propiedades o marcadores genéricos en lugar de dianas específicas. La mayoría de las propuestas precisan de una definición previa del objetivo. Por otro lado, las técnicas disponibles son complejas y centralizadas, lo que al impedir su uso en el punto de asistencia oncológico (por ejemplo, hospitales de día) ha bloqueado o dificultado la posibilidad de realizar ensayos de tamaño suficiente para la validación clínica.

## 2.1 Hipótesis de Trabajo

1. Las células malignas presentan una tasa de consumo de glucosa más alto que las células sanas. Esta propiedad debería proporcionar un método general y específico para detectar células malignas en sangre periférica mediante glucosa marcada.
2. El metabolismo de las células malignas privilegia las rutas biosintéticas (glicolisis, síntesis de biomasa) a la producción de energía (ATP, fosforilación oxidativa) a diferencia de las células sanas. La introducción de un microambiente hiperóxico debería incrementar la diferencia entre el consumo de glucosa entre ambos tipos de células. La confirmación de este hecho, incrementaría la sensibilidad de una biopsia líquida basada en la hipótesis primera.
3. La espectroscopia SERS y la tecnología optofluídica, por sus características de bajo coste, simplicidad de manejo y alta sensibilidad y especificidad, aplicadas a la detección de células tumorales circulantes (CTCs) y sus productos, representarían una ventaja frente a los procedimientos convencionales.
4. Dado que las células mononucleares circulantes (PBMC) no están activadas (están en fase de ciclo celular G0-G1), no presentan proteínas relacionadas con la activación. Si en un extracto de PBMC aparecen dichas proteínas (c-MYC), éstas se correlacionarán con la presencia de células tumorales circulantes (habitualmente en fase G2-M). La detección de c-MYC sería un marcador de dichas células (CTCs).

5. La presencia de mutaciones en el ADN modifica de forma específica su conformación espacial en condiciones definidas. La espectroscopia SERS podría reflejar dichos cambios, siendo aplicable a la detección de mutaciones en el ADN circulante tumoral (ctDNA)

### 2.2 Objetivo General

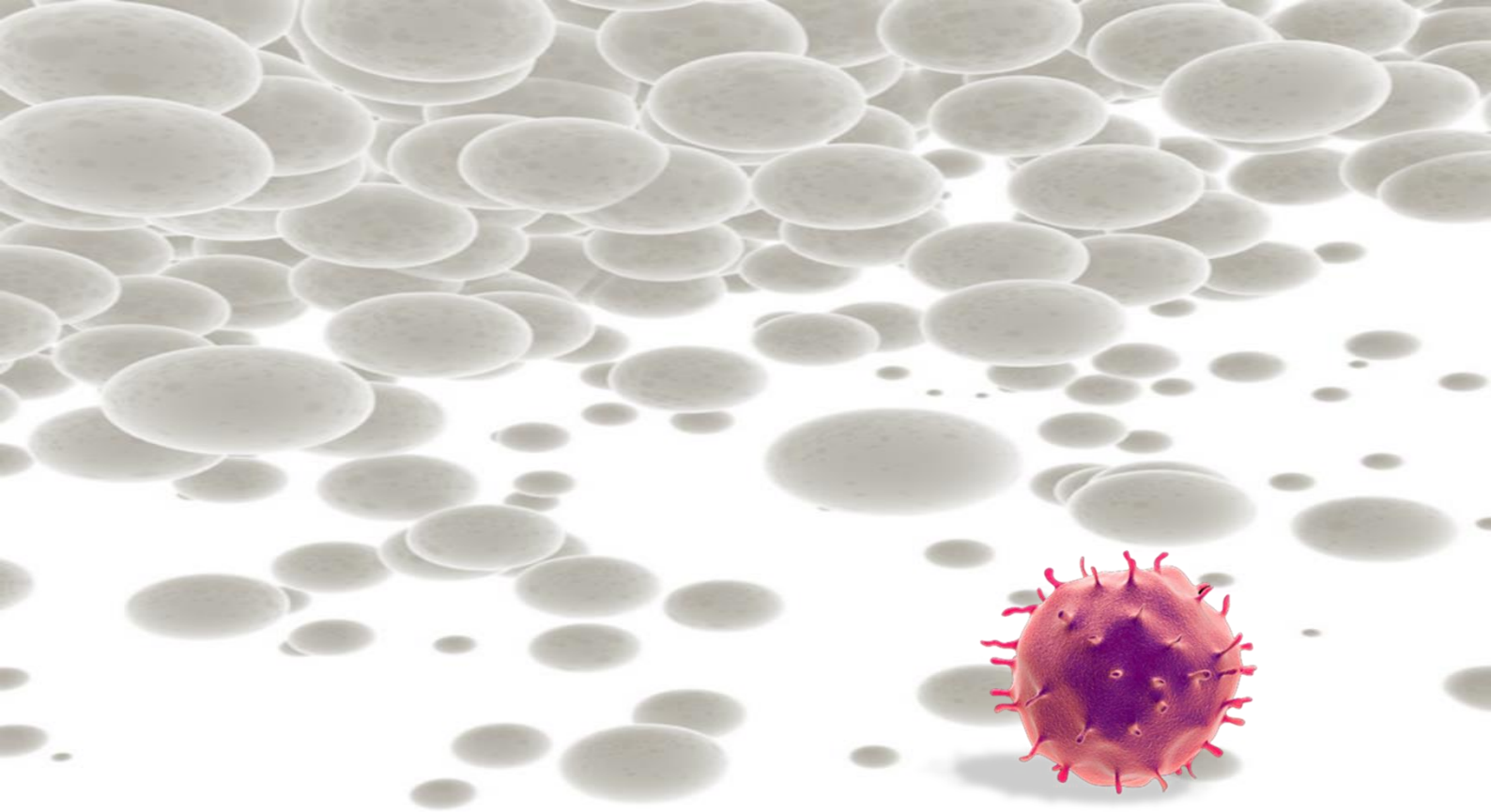
Desarrollar nuevas estrategias tecnológicas portables, sensibles y específicas capaces de detectar y caracterizar células tumorales circulantes (CTCs) y proteínas específicas derivadas de las mismas, orientadas a características universales del cáncer, así como capaces de detectar ácidos nucleicos (ctADN) portadores de mutaciones específicas de tumor.

### 2.3 Objetivos Específicos

1. Desarrollar de un método rápido, simple y sin marcajes, que combinando la técnica SERS con un análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA), permita el análisis de fragmentos de ADN largos con una sensibilidad de una sola base y demostrarlo en la detección de mutaciones puntuales típicas de cáncer de colon en el gen K-RAS
2. Detectar la presencia de c-MYC derivado de células tumorales circulantes mediante la construcción de un receptor capaz de transducir dicha presencia mediante modificaciones específicas en un espectro SERS
3. Correlacionar la cuantificación de la proteína c-MYC derivada del procedimiento anterior, con la presencia de células tumorales, tanto de líneas celulares como de muestras de sangre real de pacientes con cáncer, demostrando la posibilidad de detectar dichas células

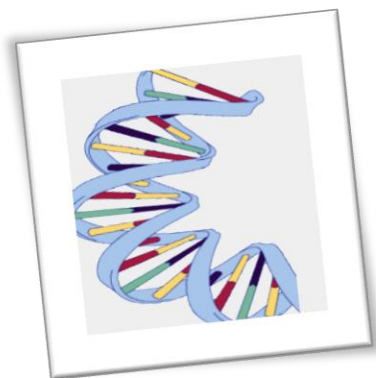
mediante un procedimiento de discriminación genérico o universal (amplificación de c-MYC)

4. Diseñar un dispositivo microfluidico de flujo 3D, donde todas las ópticas estén integradas en el chip, para la cuantificación de fluorescencia de CTCs en muestras reales de cáncer de mama.
5. Detectar células tumorales circulantes aprovechando la propiedad universal de las células malignas denominada efecto Warburg.
6. Demostrar la posibilidad de manipular el efecto Warburg mediante la modificación de la concentración de oxígeno en el microambiente tumoral y en la muestra de biopsia líquida.



## 3 ESTUDIO I

BIOPSIA LÍQUIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS



3.1 Clasificación Conformacional de las Mutaciones Puntuales de K-Ras mediante SERS para el Diagnóstico del Cáncer

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

REFERENCIAS

### 3.1.1 Resumen

La determinación de la existencia de mutaciones puntuales en los oncogenes RAS (KRAS, NRAS, HRAS) y menos habitualmente BRAF, es una práctica habitual en oncología clínica, previa a la elección de tratamiento en enfermedades como el cáncer colorrectal. De hecho, el tratamiento mismo se basa en el resultado de dicha determinación. Las técnicas existentes para dicho análisis, basadas en PCR o secuenciación, requieren una infraestructura compleja, personal especializado y, habitualmente, su centralización. En este capítulo se presenta el diseño teórico y experimental de una nueva técnica basada en la tecnología SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) y la correspondiente quimiometría necesaria para la detección de mutaciones. El procedimiento de análisis se basa en la hipótesis de que las mutaciones puntuales imponen conformaciones espaciales específicas a la molécula (transcrito) de K-RAS (141 pares de bases). Los resultados obtenidos muestran que dicha metodología es capaz de identificar de modo inequívoco la clasificación de las diferentes mutaciones que habitualmente aparecen en dichos genes. Además de ser una metodología precisa, añade la ventaja, frente a las tecnologías existentes, de ser sensible, rápida, directa y barata, por lo que se adecúa a las necesidades actuales de validación analítica y clínica de las biopsias líquidas de ctDNA.

### 3.1.2 Introducción

#### 3.1.2.1 Los oncogenes RAS

La familia RAS de proto-oncogenes está formada por tres genes funcionales con estructura y secuencia similares (H-Ras, N-Ras y K-Ras) (1). En particular, la proteína de unión a GTP codificada por K-Ras se sitúa en el centro de muchas vías de transducción de señales, controlando mecanismos de crecimiento y diferenciación celular (2). Las mutaciones de un solo nucleótido en K-Ras (siendo los codones 12 y 13 del exón 2 los sitios mutados más frecuentemente, y siendo el codón 17 del mismo exón mutado infrecuentemente pero también relevante

clínicamente) (3) producen respuestas altamente oncogénicas con mayor incidencia en el cáncer colorrectal, pulmonar y en el cáncer de páncreas (4). En el cáncer colorrectal actualmente se aplican tratamientos específicos ajustados al estado mutacional de K-RAS y N-RAS (5), siendo obligada su determinación en esta enfermedad (según las guías del National Comprehensive Cancer Network) en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, la determinación de las mutaciones puntuales K-RAS y N-RAS es esencial tanto en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer colorrectal (5). En el futuro, con tecnologías más accesibles y generalizables, posiblemente tendrá un papel también en la monitorización de los tratamientos, en el seguimiento y en el diagnóstico de recidivas.

#### 3.1.2.2 Análisis de mutaciones puntuales mediante SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy)

Durante los últimos años, la caracterización de ácidos nucleicos (ANs) mediante la técnica sin marcaje denominada SERS ha evolucionado rápidamente (6). Sin embargo, la detección de mutaciones puntuales ha estado hasta ahora limitada a pequeños fragmentos (secuencias menores de 25 nucleótidos, 25 nt) (6). En estos fragmentos cortos, los cambios introducidos en el espectro SERS de ácidos nucleicos por la sustitución de una sola base están principalmente relacionados con el incremento relativo de intensidad de las características vibracionales adscritas a la nueva base en relación con las asociadas a la base eliminada (6). Sin embargo, para grandes fragmentos de ANs esta clase de cambios vibracionales, introducidos en el espectro SERS por una sola mutación afectando a una sola base, es indetectable. Afortunadamente, el espectro SERS de ANs no es la suma meramente ponderada de las contribuciones individuales de cada subunidad estructural (7).

El hecho de que la composición de las bases juegue el papel principal en la definición del perfil vibratorio del AN, estará indicando, además, que las estructuras secundarias y terciarias que resultan del enlace de hidrógeno, apilamiento de anillos y plegado de cadena, estarían también confiriendo una segunda capa de diferenciación espectral característica. En condiciones no desnaturizantes, fragmentos de ADN de cadena sencilla (ssDNA) pueden doblarse en geometrías conformacionales de tres dimensiones (3D) únicas, moldeadas por interacciones



intramoleculares y delineadas por la secuencia de la nucleobase específica de la molécula considerada (8).

Llamativamente, incluso las sustituciones de una sola base pueden producir cambios en la estructura secundaria que pueden llegar a ser detectables mediante técnicas de monitorización de la movilidad diferencial de fragmentos de ADN en electroforesis en gel no desnaturalizante (9). Precisamente esta característica sentó las bases para el desarrollo de la técnica conocida como polimorfismos de conformación de una sola hebra (SSCP), ampliamente utilizado en biología molecular como tecnología de análisis mutacional (9-10). La longitud de la cadena sencilla (ssDNA) juega un papel clave en la sensibilidad de la técnica de SSCP para discriminar el cambio de una sola base, siendo aproximadamente entre 100 a 600-nt (nucleótidos) el rango de tamaño óptimo (10). De hecho, mientras que la sustitución de una sola base tiene menor probabilidad de perturbar significativamente el estado de plegamiento general en una cadena (ssDNA) excesivamente larga, por su parte, los fragmentos demasiado pequeños muestran una capacidad reducida para formar estructuras estables y reproducibles (11).

### 3.1.3 Objetivos

En este trabajo, se explora el concepto de SSCP para desarrollar un método rápido, simple y sin marcajes, que combina la técnica SERS con un análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA), para discriminar fragmentos de ADN largos con una sensibilidad de una sola base. Este enfoque de SERS sin marcaje, basado en el cambio conformacional del ADN inducido por una mutación puntual en lugar de en la composición de base, supera las limitaciones intrínsecas de los métodos directos de SERS que se habían notificado previamente por lo que se limitaban a la detección de mutaciones puntuales en cadenas muy cortas, limitando de este modo su utilidad en la práctica biológica o clínica real.

Este trabajo se plantea probar el potencial de esta técnica mediante el uso experimental de fragmentos largos (141-nt) del gen K-Ras (12) conteniendo las diferentes mutaciones puntuales clínicamente relevantes y, por otro lado apoyar los resultados experimentales con modelos teóricos (13).



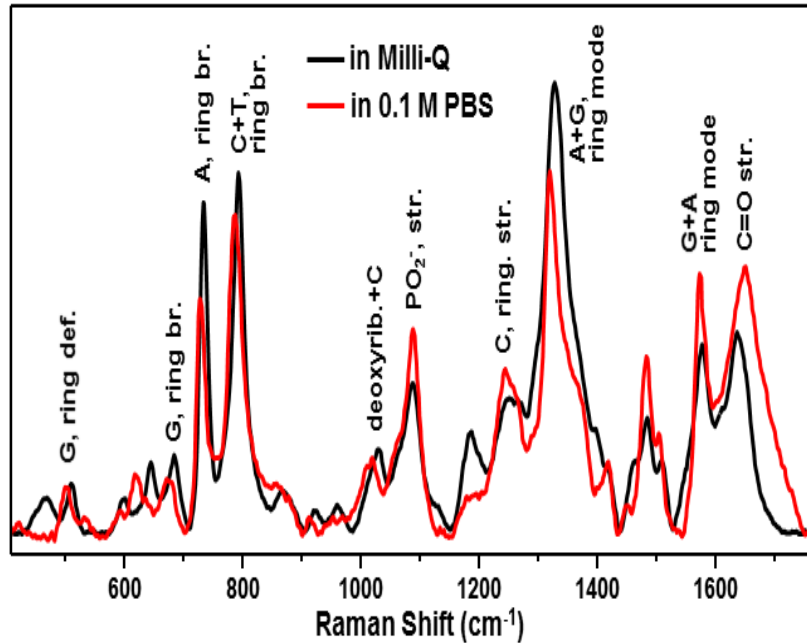


Figura 10: Espectros SERS obtenidos bajo distintas concentraciones de sal.

Figura 1: Espectros SERS de los fragmentos de ssADN de 141 nt (WT141) a baja y alta concentración de sal.

### 3.1.4 Resultados y discusión

El denominado ssDNA largo consiste en una cadena lineal de nucleótidos de diámetro delgado y alta flexibilidad que, en condiciones fisiológicas, normalmente forma dominios apilados intercalados con otros dominios de configuración aleatoria espiral (14). Sin embargo, en una solución baja en sal ( $\leq 2$  mM NaCl), las repulsiones electrostáticas dominantes entre los fosfatos cargados negativamente de la columna vertebral de la molécula evitan en gran medida que las nucleobases de ssDNA, con secuencia relativamente aleatoria, se aproximen y se emparejen mediante enlaces de hidrógeno (15).

Esta reorganización estructural se refleja claramente en el espectro de SERS de una hebra 141-nt (tipo salvaje, WT141) (Figura 10). Este fue obtenido mediante la adición de cantidades equimolares de ssADN, bien disuelto en agua Milli-Q o en PBS 0,1 M, a un coloide constituido por AgNP @ Sp (Figura S1).

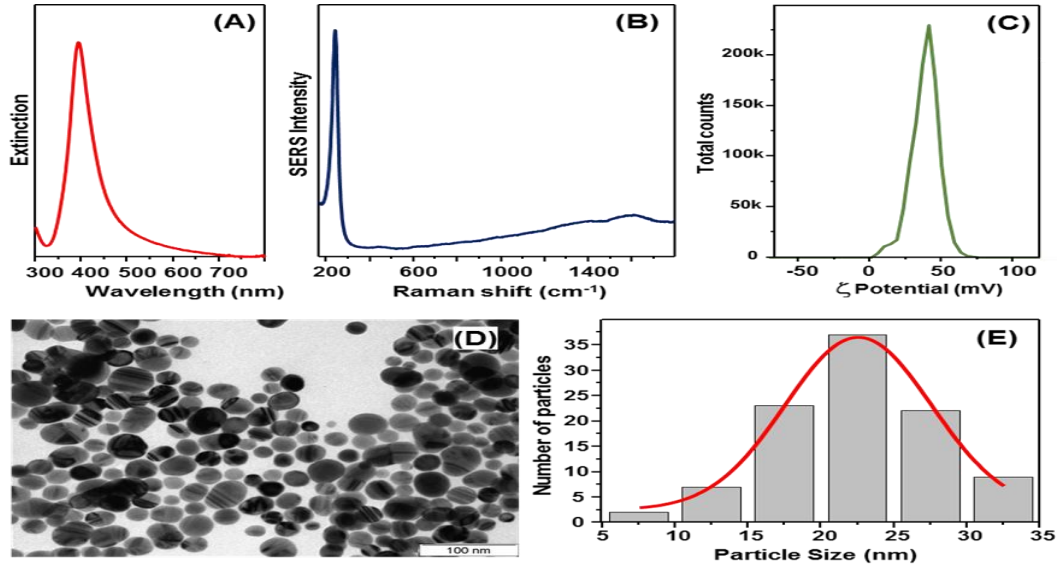


Figura 11: Espectro de extinción de los coloides AgNP, espectro SERS y Potencial.

*Figura S1:* (Información Suplementaria) (A) Espectro de extinción de los coloides AgNP @ Sp (LSPR centrado a aproximadamente 393 nm). (B) Antecedentes El espectro SERS de AgNP @ Sp agregado con MgSO-4 solución acuosa 0,1 M (MgSO-4 actúa como un electrolito "pasivo" que promueve la agregación de nanopartículas sin adsorber sobre la superficie metálica) (14)-información suplementaria-La característica intensa en ca. 241  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a  $\nu(\text{AgCl})$ . (C)  $\zeta$  diagrama de distribución potencial de AgNP @ Sp (el potencial corresponde a  $41,0 \pm 1,5$  mV). El pH coloidal a granel es  $\sim 6$ . (D) micrografía TEM representativa de los coloides AgNP @ Sp preparados evaporando aprox. 100  $\mu\text{l}$  de dispersión coloidal diluida sobre rejillas de cobre recubiertas con formvar. (E) Histograma de diámetros de nanopartículas ( $22,5 \pm 5,0$  nm).

Estos incluyen, entre otros, el desplazamiento hacia el rojo de los modos de "estiramiento" del carbonilo a aproximadamente  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , lo cual es informativo de la formación de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, así como el desplazamiento al azul de los modos de "respiración" en anillo (ring stretching vibration) a aproximadamente  $680, 730$  y  $790 \text{ cm}^{-1}$  (correspondientes a los residuos de guanina, adenina y citosina + timina, respectivamente) que están asociados con el apilamiento de bases (6). Por lo tanto, cuando se disuelven fragmentos de ssDNA en la solución salina AgNP @ Sp (NaCl)  $<1$  mM, dichos fragmentos se configuran inicialmente en formas alargadas (15), tras lo cual son

adsorbidos en las nanoesferas catiónicas de la solución, formando una envoltura en torno a las mismas. Estas actúan como agentes de compactación (17).

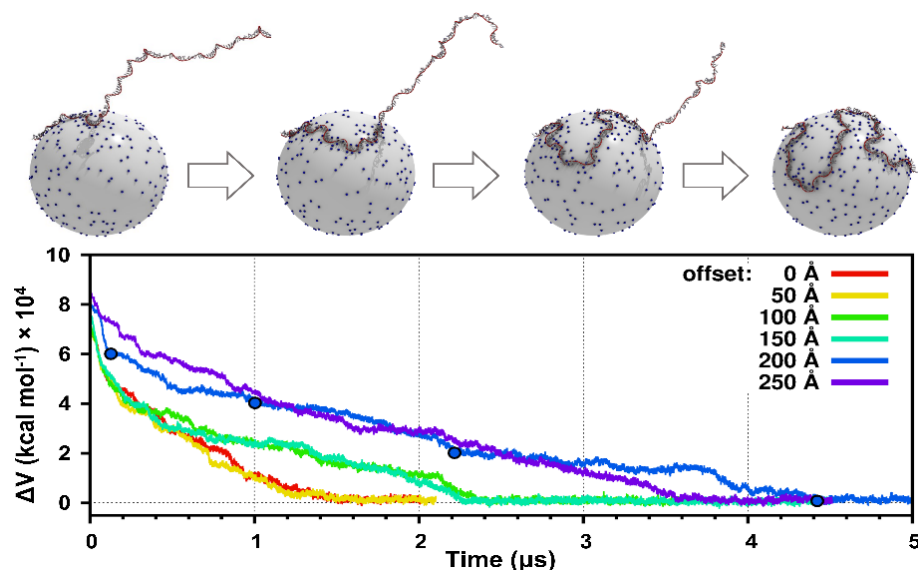


Figura 12 : Plegamiento de la molécula de ADN

Figura 2 Dinámica molecular del proceso de plegamiento de la molécula de ADN sobre la nanopartícula (WT141) a baja concentración de sal. Se representa la energía electrostática frente al tiempo en tres condiciones geométricas iniciales.

El tamaño relativo de la cadena en relación con el tamaño de la nanopartícula debe jugar un papel importante en la determinación de la conformación final del ADN sobre el objeto en 3D. Esto se refleja bien en las simulaciones de dinámica molecular (MD) de la unión de largos segmentos 141-nt y cortos 20-nt a nanopartículas catiónicas de aproximadamente 23 nm de diámetro. La Figura 12 muestra la energía electrostática de los sistemas de cadena 141-nt / AgNP @ SP a baja concentración de sal en función del tiempo.

Se estudiaron un total de seis geometrías de partida, que se diferenciaban por la posición de la nanopartícula con respecto al eje de la secuencia de una sola cadena (desplazamiento 0 - 250 Å desde el centro hasta el final). Como puede verse, la energía electrostática disminuye rápidamente en el tiempo con un decaimiento aproximadamente exponencial para todas las geometrías investigadas. Las configuraciones representativas extraídas de una trayectoria demuestran que la meseta energética corresponde a estados en los que toda la hebra única se envuelve completamente sobre la superficie de la nanoesfera. Este comportamiento debe ser comparado con simulaciones equivalentes realizadas con una alta concentración de sal (Figura S3),

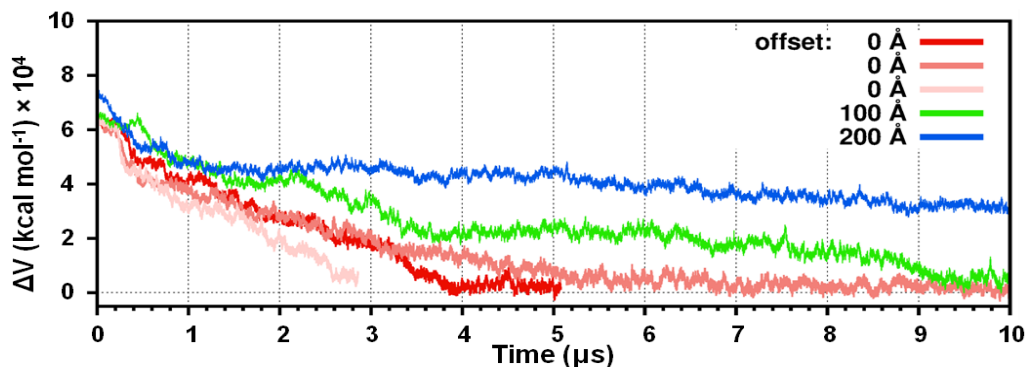


Figura 13: Simulación de la adsorción del ssDNA de 141 pb

Figura S3: Simulación dinámica molecular del proceso de adsorción y envoltura de ssDNA 141-nt a alta concentración de sal. La diferencia en la energía electrostática se representa en función del tiempo para tres geometrías de arranque diferentes. La simulación correspondiente a un desplazamiento de 0 Å se repitió tres veces (curvas rojizas).

mostrando que, en este caso, se requieren tiempos mucho más largos para converger la energía. En un caso (offset = 200 Å), el proceso de envoltura no se completó en el tiempo total de simulación (10 μs), reflejando en este caso un proceso de adsorción sustancialmente menos eficiente. Por el contrario, el proceso de unión de ssDNA de 20-nt a baja concentración de sal resultó ser sencillo, con las hebras cortas rápidamente relajándose sobre la superficie inmediatamente después de establecer interacciones favorables con las cargas positivas superficiales (Figura S4).

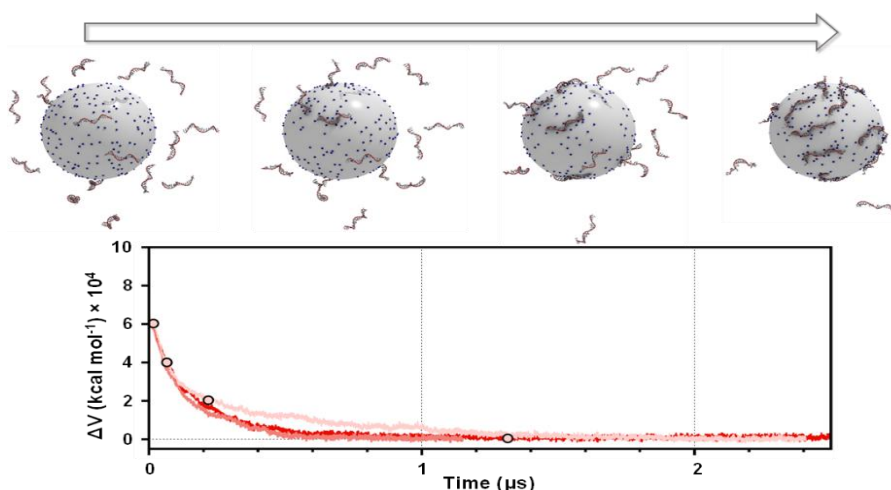


Figura 14: Simulación de la adsorción de ssDNA de 20 pb.

Figura S4: Simulación de dinámica molecular del proceso de adsorción y envoltura de ssDNA 20-nt a baja concentración de sal. Se informan configuraciones representativas para el número de ejecución 3.





Tabla 5: Secuencias de bases de ADN de cadena única de 35 nt (*Tabla S2*)

ssDNA	Base sequence (5'-3')
WT <sub>35</sub>	CT <b>GGT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT1 <sub>35</sub>	CT <b>GAT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT2 <sub>35</sub>	CT <b>GTT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT3 <sub>35</sub>	CT GGT <b>GAC</b> GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT4 <sub>35</sub>	CT <b>AGT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT5 <sub>35</sub>	CT <b>TGT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT6 <sub>35</sub>	CT <b>CGT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT7 <sub>35</sub>	CT <b>GCT</b> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG
MT8 <sub>35</sub>	CT GGT GGC GTA GGC AAG <b>AAT</b> GCC TTG ACG ATA CAG

En particular, la interacción electrostática eficiente entre el esqueleto de fosfato cargado negativamente del ADN y los ligandos de espermina, unidos a la superficie metálica, permite la rápida agregación de nanopartículas en agrupaciones estables y altamente SERS-activas en suspensión, dando lugar a espectros SERS intensos, bien definidos y reproducibles, independientemente de la longitud de la cadena (6, 16).

La Figura 16 muestra los espectros de SERS resultantes de muestras de ssDNA de 20-nt. Los espectros fueron corregidos en la línea base y normalizados a la banda de extensión de fosfato a aproximadamente  $1089\text{ cm}^{-1}$ , que es en gran parte insensible al apilamiento de la base o a la temperatura (19).

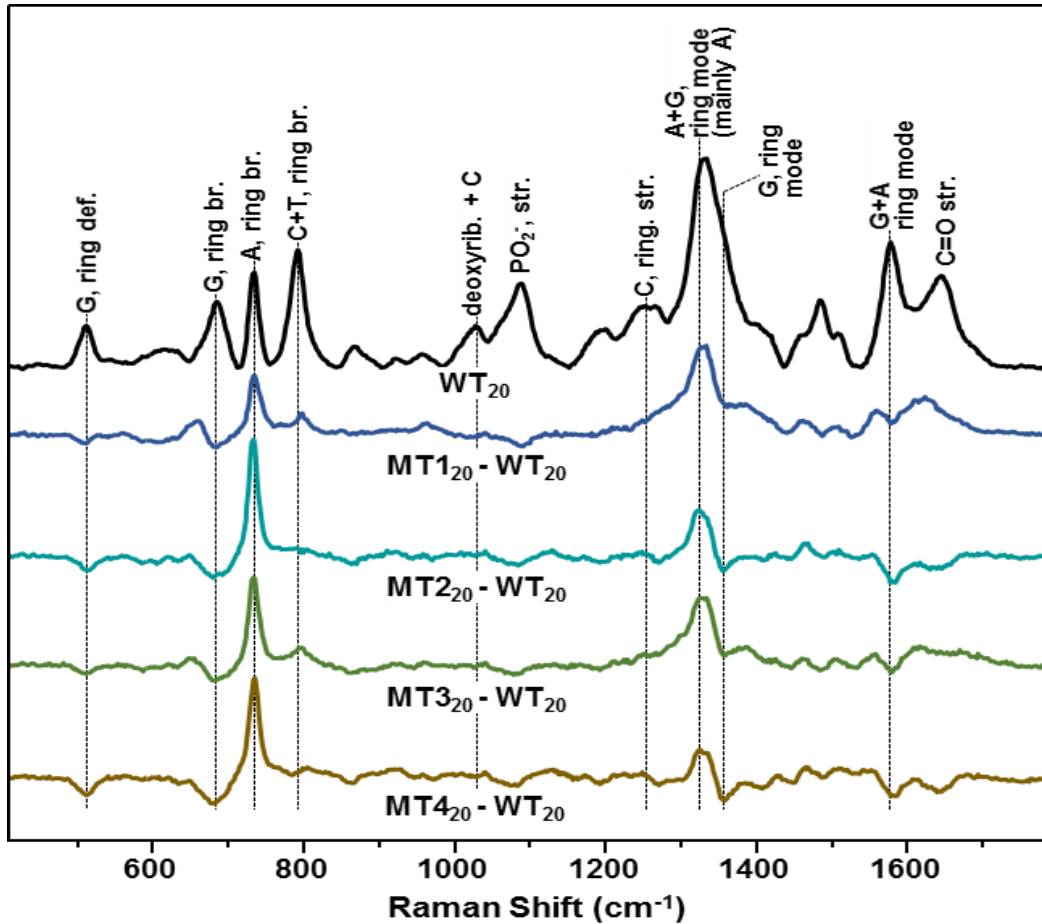


Figura 16: Resultados promedio de 54 espectros.

*Figura S6:* SERS de WT20 y los espectros de SERS MT120-WT20, MT220-WT20, MT320-WT20 y MT420-WT20 restablecidos digitalmente. Antes de la resta, todos los espectros se normalizaron a la banda  $\nu\text{PO}_2$  a aprox.  $1089\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros ilustrados se obtienen promediando 54 espectros de 18 réplicas independientes por muestra (3 mediciones por cada réplica). La concentración de ADN se mantuvo constante a  $2\text{ }\mu\text{g}$  por  $100\text{ }\mu\text{l}$  de coloides. La figura incluye una asignación tentativa vibratoria de las principales bandas SERS de WT20 en AgNP @ Sp coloides sobre la base de nuestros trabajos anteriores (1, 16) y los datos presentados en la literatura (17).

Las firmas (patrones) SERS de estos fragmentos cortos presentan diferencias evidentes, que están dominadas en su mayor parte por alteraciones de las intensidades relativas atribuibles a la composición de base heterogénea. La comparación directa de los datos SERS a través de la espectroscopia SERS de diferencia (Figura S6) ayuda a visualizar estos cambios, generando espectros de diferencia SERS que contienen características positivas y negativas, respectivamente asociadas con las nucleobases introducidas y reemplazadas.

La identificación de la sensibilidad de una sola base se logra tal como se ha descrito previamente en la literatura (6). Sin embargo, la capacidad de discriminación del



SERS directo se evidencia claramente cuando se realiza un análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA), método de clasificación bien establecido y estadísticamente robusto, sobre los conjuntos de datos generados por SERS, a partir de las muestras de ssDNA de 20 nt. De hecho, las predicciones de clase calculadas por el modelo supervisado por PLS-DA y que abarcan 54 espectros por muestra (Figura S7) muestran que no sólo los grupos de muestras de ssDNA de 20-nt con diferente composición base (WT20, MT120, MT220 y MT420) se pueden distinguir con sensibilidad y especificidad del 100%, pero también para fragmentos que difieren sólo en la secuencia de bases (MT320 y MT420). En este último caso, las diferencias espectrales son más sutiles que para muestras con diferente composición base; sin embargo, PLS-DA asigna las muestras en dos clases estadísticamente cerradas pero aún diferenciables. Esto es consistente con los estudios Raman normales que mostraron cómo la secuencia de la base potencialmente puede añadir una capa adicional de diferenciación espectral entre las firmas Raman de ADN con idéntica composición de base, pero diferente estructura primaria (7).

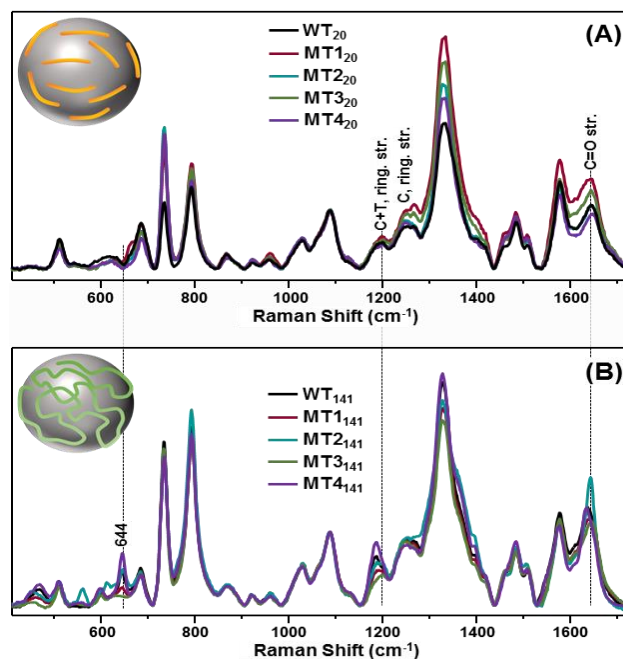


Figura 17: Espectros SERS a 25°C.

Figura 3: Espectro SERS de fragmentos de A) 20 nt y B) 141 nt de ssADN. Se trata del promedio de 54 espectros de 18 réplicas por muestra (tres medidas por réplica). Ambas soluciones a 25 grados C.

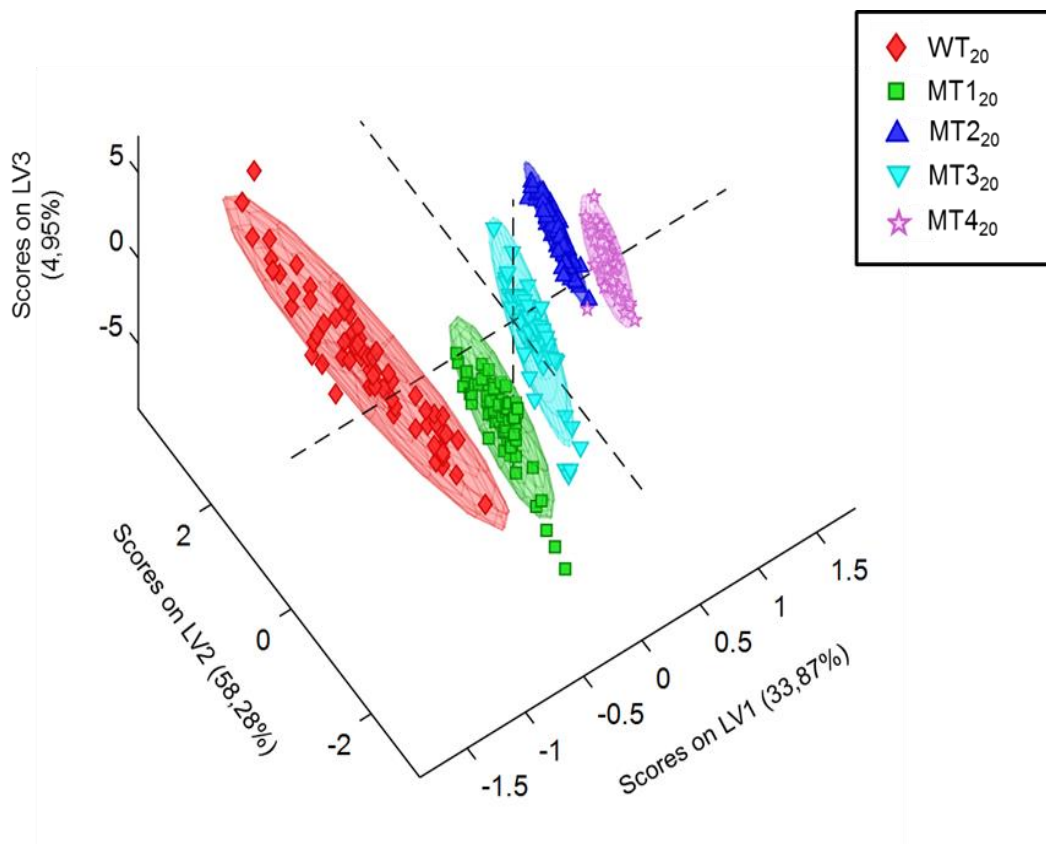


Figura 18: PLS-DA. Cada espectro es un punto.

Figura S7: PLS-DA gráfico de las variables latentes (LV) de los primeros tres LV obtenidos a partir de SERS datos espectrales de 20 nt ssDNA muestras (54 repeticiones por muestra). Cada espectro está representado por un punto de datos.

La extensión del ssDNA de 20-nt a 35-nt produjo resultados muy diferentes. La desaparición del polimorfismo de una sola base sobre dicha longitud de cadena suprime la capacidad del método SERS directo para detectar la sustitución de la base, independientemente del tipo y posición de la mutación (Figura S8). Por consiguiente, el modelo PLS-DA ya no clasifica las muestras en clases estadísticamente diferentes (Figura S8B). Llamativamente, cuando las mutaciones puntuales se incluyen en fragmentos de 141 nt, el espectro SERS revela de forma consistente perfiles vibratorios bien distinguibles (Figura S9), proporcionando potencia discriminatoria total y con sensibilidad de base única (Figura S7 y S8).

### 3. Estudio I

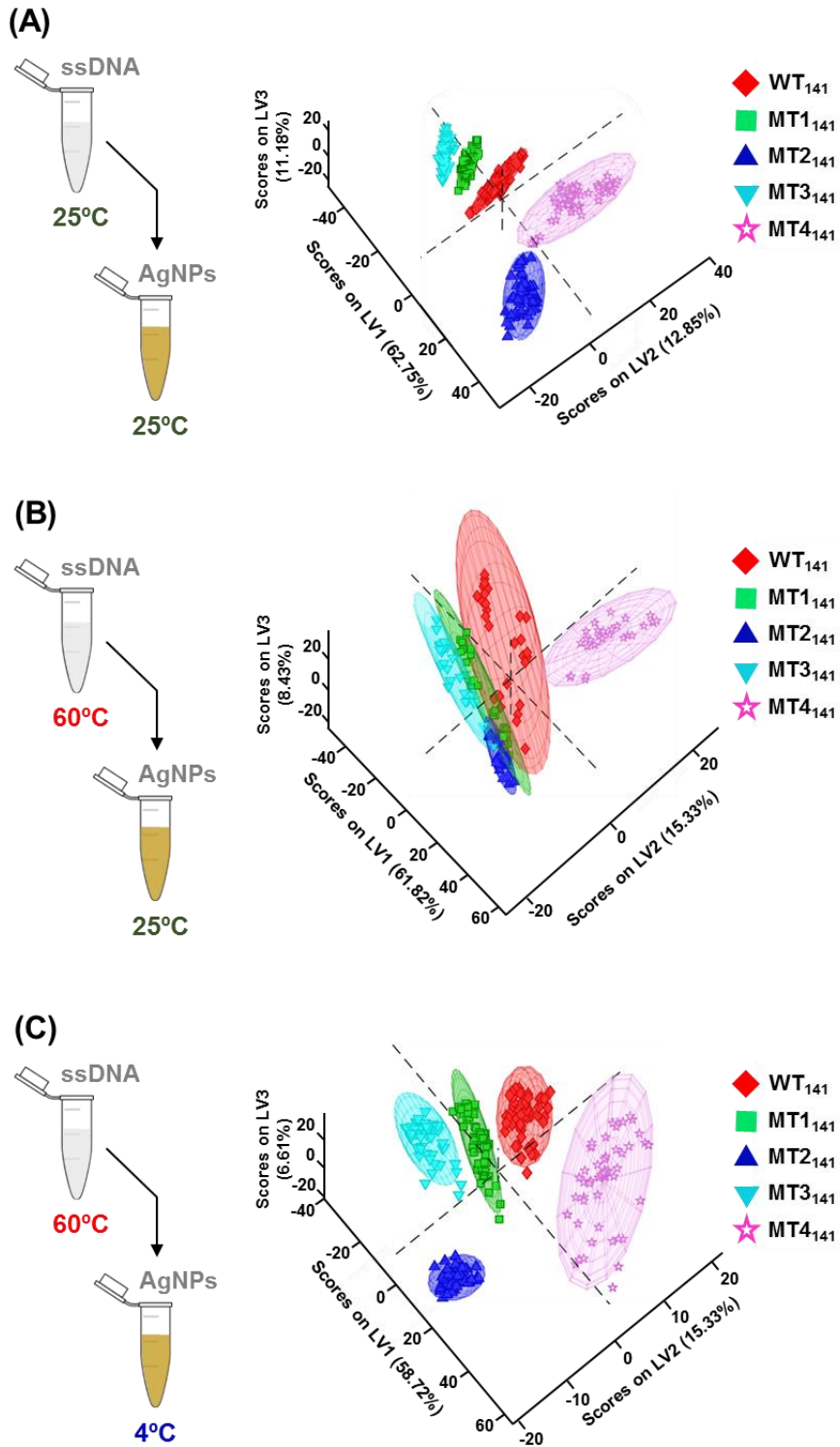


Figura 19: Variables latentes.

Figura S8: Se representan las tres primeras variables latentes (LV). Cada espectro es denotado por un punto en una elipse que representa el 95% de confianza.

Surge una banda de mediana intensidad a aproximadamente  $644\text{ cm}^{-1}$ , que se ha atribuido al estirado de anillo A + G débilmente acoplado con vibraciones de desoxirribosa (19). Esta banda es típica de una conformación C3'-endo / anti-nucleósido, un marcador espectral asociado a una forma A del ADN, (8). Esta, sin embargo, todavía coexiste con la intensa banda de "respiración" (breathing-ring) de anillo G a aproximadamente  $\sim 684\text{ cm}^{-1}$ , característica de la conformación C2'-endo / anti de la columna vertebral de la forma B (10, 22). Este dato muestra la existencia de una transición desde la geometría de la columna vertebral regularmente ordenada de tipo B, tal como se revela en el ssDNA corto de 20-nt y 35-nt (Figura 3 y Figura S8A), a un conjunto más amplio de diferentes conformaciones para 141-nt fragmentos. Un cambio similar en la conformación del ADN se pudo objetivar en los estudios Raman de empaquetamiento viral del bacteriófago  $\Phi\text{X174}$  a partir de su genoma de cadena sencilla en solución libre de proteínas (19). Del mismo modo, podemos sugerir que las restricciones geométricas impuestas por la interacción con nanopartículas catiónicas pueden reducir el grado de orden de la estructura secundaria en el ADNs largo. Por otra parte, de manera diferente a lo observado para las hebras cortas, los cambios espectrales en el análisis SERS de los fragmentos de ssADN de 141-nt ssDNA no se muestran únicamente como alteraciones en las intensidades relativas de bandas, sino también como importantes variaciones de pico, anillos de estiramiento C + T a aproximadamente  $1180\text{ cm}^{-1}$  y otras variaciones asociadas a carboxilo (aproximadamente centrado en  $1640\text{ cm}^{-1}$ ).

También se realizó un análisis PLS-DA en estos espectros que condujeron a la clasificación de los cinco diferentes fragmentos.

Para definir el impacto de la sustitución de una sola base en los fragmentos ssADN largos (141 nt) se procedió al análisis directo mediante SERS de distintas variantes en el codón 12 (específicamente G<sub>A</sub>, G<sub>T</sub> y G<sub>C</sub>, Figura S10). Del mismo modo, se utilizó el análisis PLS-DA para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los espectros SERS. Para dichas secuencias con una sola base de sustitución, los resultados mostraron un 100% de sensibilidad y especificidad (Figura S11). El resultado del análisis vibratorio es consistente con la imagen proporcionada por las simulaciones MD. En esta, los filamentos cortos se extienden sobre la nanopartícula de una manera lineal, percibiendo la superficie metálica como casi plana. Bajo este escenario, las diferencias conformacionales entre las

hebras se minimizan y la discriminación entre sus perfiles SERS correspondientes se basa en gran medida en las contribuciones ponderadas de las nucleobases individuales. De manera diferente, cuando la longitud del ssDNA se agranda hasta el punto en el que se fuerza al fragmento a doblarse alrededor del nanobjeto, en ese punto se pierde la homogeneidad geométrica de la hebra, lo cual se refleja en los cambios en los espectros SERS dichos fragmentos.

Como control, se realizó un análisis de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP) con los fragmentos de 141 nt (Figura S12).

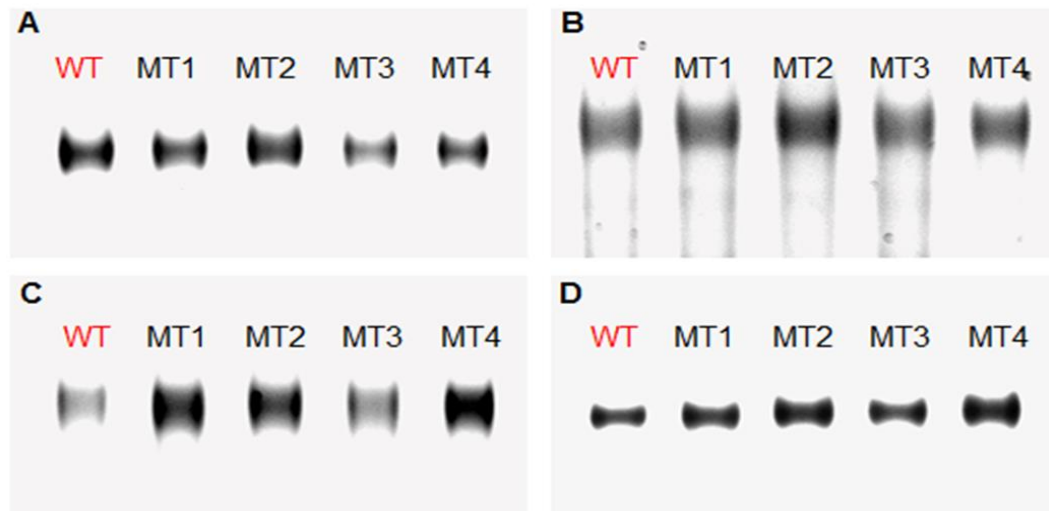


Figura 20: Electroforesis SSCP.

*Figura S12:* Análisis de fragmentos 141 nt ssDNA WT141, MT1141, MT2141, MT3141, y MT4141 en diferentes condiciones experimentales. (A) 60 ng /  $\mu$ l de ADN tratado térmicamente, 3 horas a 150 V; (B) 40 ng /  $\mu$ l de ADN tratado térmicamente, 3 horas a 150 V; (C) 20 ng /  $\mu$ l de ADN tratado térmicamente, 3 horas a 150 V; y (D) 20 ng /  $\mu$ l de ADN no tratado térmicamente, 10 minutos a 34 V y las siguientes 6 horas a 62 V.

La electroforesis SSCP de las cadenas de ADN es extremadamente sensible a un gran conjunto de parámetros experimentales que se optimizan rutinariamente de una manera empírica (9-10). En consecuencia, se llevaron a cabo varias medidas de SSCP en diferentes condiciones, lo que permitió finalmente resolver dobles y triples puntos de mutación, pero no sustituciones de una sola base (Figura 11D).

Aunque no se puede descartar que un proceso de optimización más extendido permitiría la identificación de un conjunto específico de condiciones

experimentales más adecuadas para la discriminación exitosa de SSCP de todas las secuencias investigadas, los resultados que aquí se presentan demuestran claramente que la eficacia del método propuesto (SERS) para diferenciar las mutaciones puntuales es mucho más simple y reproducible. Para definir esta última, se analizó la posible dependencia de la sensibilidad discriminativa del método SERS de variables experimentales clave. Específicamente, y dado que el agente de compactación (nanopartículas) y la fuerza iónica son parámetros fijos en los experimentos SERS descritos, se seleccionó la temperatura (T), como la variable experimental ya que T es bien conocido por afectar a la estructura ordenada de largo ssDNA (21). Los espectros de SERS ilustrados en la Figura 3B y estadísticamente clasificados en la Figura 19 se obtuvieron mezclando partes alícuotas de soluciones de ssDNA y coloides a 25° C. Por otra parte, cuando las soluciones de ssDNA fueron previamente tratadas térmicamente a 60° C durante 15 minutos y luego directamente añadidas a los coloides catiónicos (mantenidos a 25° C), se observó una disminución general de la eficacia de la discriminación (22). En consecuencia, la sensibilidad se recupera en gran medida cuando los fragmentos tratados térmicamente se mezclan con coloides a 4° C. De hecho, es esperable que las bajas temperaturas favorezcan la compactación eficiente del fragmento de ADN (21) sobre la superficie metálica. En cualquier caso, vale la pena destacar que los perfiles espectrales SERS no sufrieron alteraciones importantes sobre tales cambios de temperatura grandes (Figura S13). Esto indica que la interacción electrostática de la cadena flexible ssDNA con nanopartículas catiónicas sigue siendo la principal fuerza motriz que conduce a la estructura final de mayor orden, por lo tanto proporcionando al método SERS una alta robustez frente a la variabilidad intrínseca de condiciones de prueba normales.

### 3.1.5 Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado una nueva estrategia basada en la técnica SERS sin marcaje para la detección de mutaciones puntuales en grandes fragmentos de ADN. Esta metodología recoge el concepto en el que también se basa la técnica de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP), explotando los grandes

cambios conformacionales que las sustituciones de una sola y múltiples bases imponen a las cadenas largas de una sola cadena.

El potencial de esta técnica sensible, rápida, directa y barata para el diagnóstico se demostró en la clasificación inequívoca de mutaciones clínicamente relevantes en el oncogén K-RAS. Es preciso validar, tanto experimental como clínicamente en ensayos prospectivos, su aplicación clínica como biopsia líquida. En la actualidad aún no hay ninguna tecnología validada.

#### 3.1.6 Información suplementaria

##### 3.1.6.1 Materiales

Todos los materiales se han seleccionado de la más alta pureza disponible y obtenida de Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Se compraron oligonucleótidos de ssDNA 20-nt y 35-nt purificados por HPLC de Eurofins Genomics (Esbjerg, Dinamarca). El ADN de 141 nt purificado por HPLC se adquirió de ATDBio (Southampton, RU). Se prepararon disoluciones madre de 200  $\mu\text{M}$  de cada fragmento de ssDNA disolviéndolas en agua Mili-Q (18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  a 25  $^{\circ}\text{C}$ ) y se almacenaron a -20  $^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.6.2 Preparación de Nanopartículas de Plata Cargadas Positivamente (AgNP @ Sp)

Se sintetizaron nanopartículas de plata revestida con espermina (AgNP @ Sp) según descripciones previas (1). 20  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{AgNO}_3$  0,5 M y 7  $\mu\text{L}$  de una solución de tetrahidrocloreuro de espermina 0,1 M se añadieron progresivamente a 10 ml de agua Milli-Q. A continuación, se añadieron rápidamente 250  $\mu\text{L}$  de una solución 0,01 M de  $\text{NaBH}_4$  recién preparada bajo agitación vigorosa a la mezcla. El medio de reacción viró rápidamente a amarillo profundo, indicando la formación de nanopartículas de plata. La mezcla se agitó suavemente durante otros 5 minutos



antes de almacenarse durante la noche en la oscuridad. El sedimento visible en la parte inferior del vial fue eliminado de la muestra. Los coloides AgNP @ Sp así preparados proporcionan normalmente una respuesta plasmónica con una excelente reproducibilidad de lote a lote (sólo pueden requerirse ajustes menores de la concentración total de nanopartículas). Es importante destacar que los viales de vidrio utilizados para la reacción y el almacenamiento de las partículas se recubrieron previamente con polietilenimina (PEI, promedio de Mw aproximadamente 25.000), mediante inmersión en una solución acuosa de PEI al 0,4% v / v (durante la noche), seguido de lavados con agua fresca Mili-Q y secado con N<sub>2</sub>. El PEI infiere una carga positiva a las superficies de vidrio que impide la deposición de las nanopartículas de plata catiónicas. La concentración final de nanopartículas (aproximadamente 1,0 nM) se calculó de acuerdo con la ley de Lambert-Beer usando un coeficiente de extinción de  $54,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  obtenido de la bibliografía (2).

### 3.1.6.3 Mediciones SERS

Las muestras de SERS se prepararon mezclando 150  $\mu\text{l}$  de AgNP @ Sp 1,0 nM con diferentes alícuotas de ssDNA a concentraciones fijas (0,31, 0,54 y 4,37 mg / ml respectivamente para 20, 35 y 141 m), hasta una concentración final de ssDNA de 0,02 mg / ml para todas las secuencias. Las soluciones acuosas de secuencias de 141 nt se calentaron a 60 ° C durante 15 minutos antes de su adición a los coloides. Mediante este suave tratamiento, se facilita la extensión de la cadena y el ADNss tiende a una conformación más lineal, tal como se describió previamente (3). En el caso de muestras preparadas utilizando AgNP @ Sp frío, los coloides se mantuvieron durante 1 h en el frigorífico (4 grados C) antes de la adición de secuencias de 141 nt(4). Todas las muestras se dejaron equilibrar al menos 3 horas antes de efectuarse las mediciones SERS (5) las bandas SERS muestran algún grado de fluctuaciones en términos de intensidades relativas en torno a los primeros 60 min tras la adición de ADN a los coloides) Se realizaron 18 réplicas y se midió tres veces cada una(es decir, se adquirieron 54 espectros por muestra de ssDNA). Se ensayaron múltiples lotes de nanopartículas, obteniéndose resultados consistentes y reproducibles.



#### 3.1.6.4 Análisis SSCP

La técnica denominada "polimorfismo de conformación de una sola hebra" (SSCP) se aplicó, como control, a la detección de los polimorfismos genéticos en las secuencias 141-nt mutantes de ADN (MT1 - MT4). Las condiciones para la electroforesis SSCP deben determinarse experimentalmente (*ad hoc*) en condiciones rigurosamente controladas ya que muchos factores pueden influir en su sensibilidad y su optimización es altamente empírica (6). Se preparó un gel al 8% de acrilamida / bis (formato de gel de 8,6 x 6,7 x 0,1 cm) según publicaciones previas (7). Brevemente, se mezclaron 2,6 ml de solución de acrilamida al 40% / bis (37,5: 1), 1,3 ml de TBE 10x, 0,91 ml de glicerol al 100%, 8 ml de agua Milli-Q, 130 µl de persulfato de amonio al 10% y 13 µL de TEMED El gel se dejó polimerizar durante aproximadamente 3 horas. En el caso de los tres primeros conjuntos de medidas (Figura S11A-C), el ADN se desnaturizó previamente a 95°C durante 7 minutos y luego se puso en hielo durante unos 5 minutos. Para el último experimento (Figura S11D), el ADN no fue tratado térmicamente. A continuación, se mezclaron 5 µl de ADN mutante (60, 40 y 20 ng / µl) con 10 µl de una solución que contenía formamida al 95% y EDTA 20 mM (pH = 8). Se repitió el mismo protocolo para el ADN de tipo salvaje y se sometió a electroforesis con 1 × TBE a 4°C durante 3 y 6 horas, a 150 y 62 V, respectivamente. Una vez completada la ejecución, el gel se tiñó con SyBr Gold (Molecular Probes - dilución 1: 10,000) en solución tampón TBE 1X durante aproximadamente 20 minutos. La visualización y las fotografías de los resultados de tinción se tomaron colocando el gel dentro del transiluminador UV.

#### 3.1.6.5 Instrumentación

Para las mediciones SERS se utilizó un microscopio confocal Renishaw InVia Reflex equipado con un láser de 532 nm. El láser se centró en la muestra coloidal en suspensión utilizando una lente macro (longitud focal de 30 mm, potencia del láser en la muestra de 6,9 mW). Todos los espectros de SERS mostrados en las

figuras se obtuvieron promediando las respuestas de SERS de 3 réplicas diferentes por cada muestra (20 acumulaciones, tiempo de exposición de 10 s). Los espectros UV-vis se registraron utilizando un espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific Evolution 201. Las imágenes TEM se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011. Las muestras TEM (microscopía de transmisión) se prepararon por secado de 100  $\mu$ l de suspensión de coloides sobre redes de cobre de 200 mallas recubiertas con carbón Formvar. Las mediciones del potencial  $\zeta$  (estabilidad de la dispersión coloidal) se realizaron con un Nano Zetasizer Malvern. Las imágenes digitales del gel de electroforesis se tomaron con una cámara Chemi XL1.4 (Syngene, Cambridge, UK).

#### 3.1.6.6 Métodos computacionales

La regresión de mínimos cuadrados parciales es un procedimiento que se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices (X e Y), es decir, un enfoque de variable latente para modelar la estructura de covarianza en estos dos espacios. Un modelo de PLS trata de encontrar el sentido multidimensional en el espacio de X que explica la dirección de la máxima varianza multidimensional en el espacio Y. El Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) fueron llevados a cabo mediante el PLS Toolbox (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA) para MATLAB (Mathworks, Inc., Natick MA). Ambos PCA y PLS-DA, fueron precedidos por un paso de preprocesamiento que incluyó Smoothing (SavGol, Filter Width 7), substracción de la línea de base (ordenadores cuadrados ponderados automáticos, orden 3), normalización (media MSC) y centrado medio. Todos los espectros se analizaron en el intervalo de 400-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.1.6.7 Análisis de los datos

El análisis multivalente de los datos espectrales SERS para todas las secuencias de ssDNA se realizó por primera vez por PCA, técnica de clasificación no supervisada. PCA permite reducir el número de variables en un número menor de características

clave no correlacionadas conocidas como Componentes Principales (PCs) (8). Estas PCs representan la mayor diferencia de todo el conjunto de datos y por lo tanto el primer PC implica la mayor varianza de los datos, el segundo implica la varianza máxima restante y progresivamente. La máxima diferencia entre las clases de datos se obtuvo mediante la rotación de los componentes PCA. A continuación, se utilizó PLS-DA para mejorar aún más las diferencias entre las clases ssDNA. Esta herramienta de clasificación supervisada se basa en el método de regresión PLS, donde los conjuntos de variables observadas se modelan mediante variables latentes (LV). Como el PCA, implica una reducción dimensional de las variables, aunque en este caso existe un conocimiento previo de los datos. Todos los modelos de PLS-DA fueron validados por el método de Venetian Blinds ( $w / 10$  divisiones y 1 muestra por división) (9), generalmente utilizado si hay un gran número de objetos aleatoriamente distribuidos. La calidad y la robustez de los modelos PLS-DA se evaluaron mediante valores  $R^2$  (el coeficiente de determinación  $R^2$  se define como una proporción "explicada" de la varianza "total" de la variable dependiente) que oscilaron entre 0.7-0.9 en PLS-DA, así como PCA (valores cercanos a 1 que indica un buen grado de ajuste). La sensibilidad y la especificidad de los espectros de SERS clasificados se midieron como sigue;

- Sensibilidad =  $N$  muestras asignadas a una clase / muestras verdaderas pertenecientes a la clase.
- Especificidad =  $N$  muestras no clasificadas como pertenecientes a la clase /  $N$  muestras que verdaderamente no pertenecen a la clase.

#### 3.1.6.8 Simulaciones de dinámica molecular

El propósito de las simulaciones de dinámica molecular (MD) fue investigar la adsorción de ADN monocatenario en una nanopartícula cargada positivamente. El campo de fuerza SIRAH se utilizó para modelar una secuencia de ssDNA completamente flexible a través de una representación de grano grueso (CG) y electrostática (10). Se modeló una nanopartícula hueca de aproximadamente 20 nm de diámetro, ordenándose uniformemente los sitios de interacción ligeramente repulsivos en la superficie de la esfera (capa interna,  $\epsilon = 0,2$  kcal mol<sup>-1</sup>,  $r_0 / 2 = 3$

Å), mientras que las moléculas de espermina adsorbidas se aproximaron a través de una distribución móvil de perlas positivamente cargadas (capa externa,  $\epsilon = 0,2$  kcal mol<sup>-1</sup>,  $r_0 / 2 = 2,5$  Å). La densidad de carga superficial se escogió de tal manera que se ajustara a un potencial  $\zeta$  de +40 mV a una concentración de sal monovalente de 0,15 M ya una temperatura de 298 K (1 grupo cargado por 4,52 nm<sup>2</sup>). La masa asignada a las perlas de nanopartículas fue de 323,6040 para partículas no cargadas, imitando una cartografía CG de tres a una (es decir, tres veces la masa de un átomo de plata) y 50,5875 para partículas cargadas (es decir, una cuarta parte de la masa de una molécula de espermina). Para asegurar que se conservara una forma esférica durante las simulaciones, la capa interna de la nanopartícula se mantuvo fija, mientras que a la capa externa se permitió una flexibilidad radial completa.

Esta configuración de doble capa facilitó la adecuada valoración de los cambios dinámicos en la distribución de la carga local, los cuales son esenciales para comprender correctamente las interacciones electrostáticas entre nanopartículas catiónicas y grupos de fosfato del ADN. Este marco experimental es similar al descrito por otros autores.

Para las simulaciones dinámicas se utilizó el programa Amber14 (12). Para la descripción del solvente (13) se empleó modelo de Born-generalizado, y las concentraciones de sal se valoraron mediante el procedimiento de Debye-Huckel. La dinámica de Langevin se realizó a la temperatura de 298 K, utilizando un coeficiente de fricción de 50 ps<sup>-1</sup>, que imita la frecuencia de colisión de agua. Las ecuaciones de los movimientos se integraron cada 20 fs (11,12).

Se comenzó con un modelo de la secuencia de ssDNA de 141 nt, inicialmente en una conformación helicoidal y a una distancia de 50 Å de la superficie de una nanopartícula situada en el centro de la secuencia (sistema WT141 / AgNP @ SP, offset = 0 Å). Entonces, se construyeron cinco configuraciones alternativas del mismo sistema, desplazando el centro de la nanopartícula a lo largo del eje ssDNA con un tamaño de paso de 50 Å, dando lugar a desplazamientos que van desde 50 a 250 Å. Todas las seis geometrías de partida se simularon con baja concentración de sal, mientras que sólo las configuraciones correspondientes a un desplazamiento de 0 (tres simulaciones independientes replicadas), 100 y 200 Å se simularon con alta concentración de sal. Todas las simulaciones se continuaron hasta que el ssDNA envolvió de forma completa la nanopartícula y en un tiempo de simulación total de

10  $\mu$ s. El proceso de adsorción de ssDNA corto (sistema 20-nts / AgNP @ SP) se estudió, en cambio, colocando 18 fragmentos a una distancia comprendida entre 50 y 200 Å de la nanopartícula en orientaciones y posiciones aleatorias (Figuras 2 y S2-S3).

#### 3.1.6.9 Reproducibilidad de los espectros SERS

La reproducibilidad espectral es un factor clave para determinar la aplicación exitosa de SERS (sin marcajes) en el análisis de ADN. Se sabe que los coloides agregados de nanopartículas producen grupos con una actividad SERS alta, pero con un control limitado sobre su geometría final, tamaño y distribución. Si bien esta falta de control sobre las características geométricas del conjunto de agregados afecta a la intensidad absoluta SERS, el impacto sobre el perfil espectral final puede minimizarse mediante la utilización de promedios (15). Este es el caso del presente estudio, donde los espectros de SERS son adquiridos interrogando suspensiones coloidales con una lente de distancia de trabajo larga, adoptando una disposición experimental donde un gran número de racimos mediados por ADN, bajo movimiento continuo browniano dentro del volumen de dispersión del objetivo, son examinados simultáneamente por el láser. Una segunda característica clave que contribuye a la alta reproducibilidad espectral se basa en el hecho de que el ADN actúa como un agente de agregación de nanopartículas individuales, así como un agente estabilizador muy eficaz de los clústeres así formados. De hecho, como se muestra en los espectros de extinción correspondientes, al alcanzar el equilibrio de agregación, los coloides agrupados muestran una estabilidad impresionante durante un largo tiempo con cambios espectrales mínimos. Esto es particularmente importante, ya que permite medir la muestra en el equilibrio.

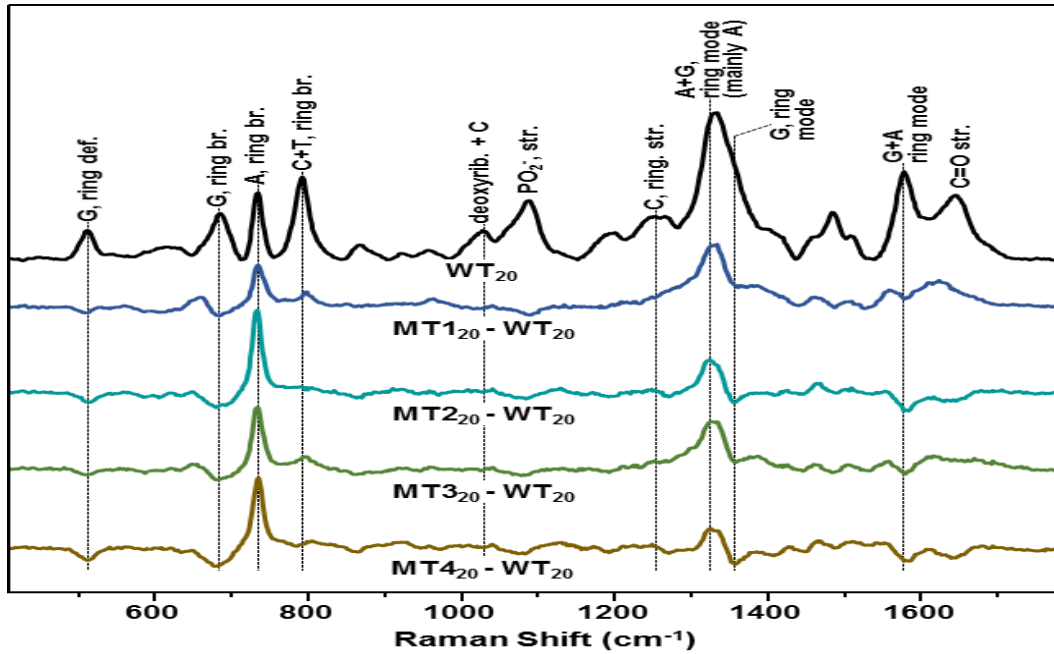


Figura 21: Promedio de espectros SERS de los fragmentos de ADN WT y MUT.

*Figura S6:* SERS de WT<sub>20</sub> y los espectros de SERS MT<sub>120</sub>-WT<sub>20</sub>, MT<sub>220</sub>-WT<sub>20</sub>, MT<sub>320</sub>-WT<sub>20</sub> y MT<sub>420</sub>-WT<sub>20</sub> restablecidos digitalmente. Antes de la resta, todos los espectros se normalizaron a la banda  $\nu$ PO<sub>2</sub>- a aprox. 1089 cm<sup>-1</sup>. Los espectros ilustrados se obtienen promediando 54 espectros de 18 réplicas independientes por muestra (3 mediciones por cada réplica). La concentración de ADN se mantuvo constante a 2  $\mu$ g por 100  $\mu$ l de coloides. La figura incluye una asignación tentativa vibratoria de las principales bandas SERS de WT<sub>20</sub> en AgNP @ Sp coloides sobre la base de nuestros trabajos anteriores (1,16) y los datos presentados en la literatura (17).

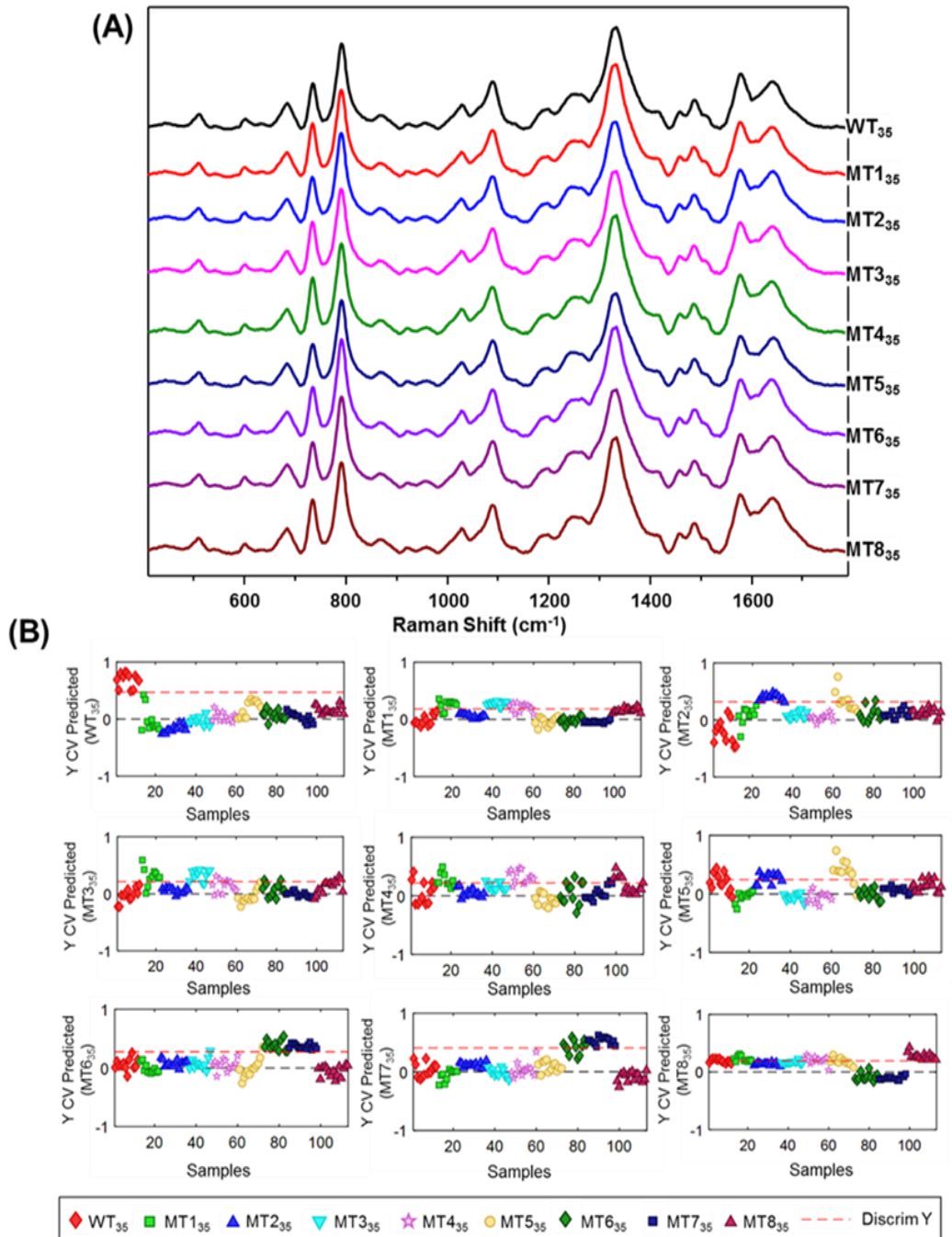


Figura 22: Predicción de la pertenencia de espectros a una clase específica.

*FiguraS8:* (A) espectros de SERS de ssDNA de 35-mer. Todos los espectros se normalizaron a la banda  $\nu$ PO2- a aprox. 1089 cm<sup>-1</sup>. Los espectros ilustrados se obtienen haciendo un promedio de 15 espectros DNA. La concentración se mantuvo constante a 2  $\mu$  g por 100  $\mu$  l de coloides. (B) Análisis de datos espectrales por PLS-DA y predicha. Cada gráfico predice si una muestra (15 espectros SERS) pertenece o no a la clase especificada. La línea roja horizontal corresponde al nivel de umbral de predicción de clase calculado.

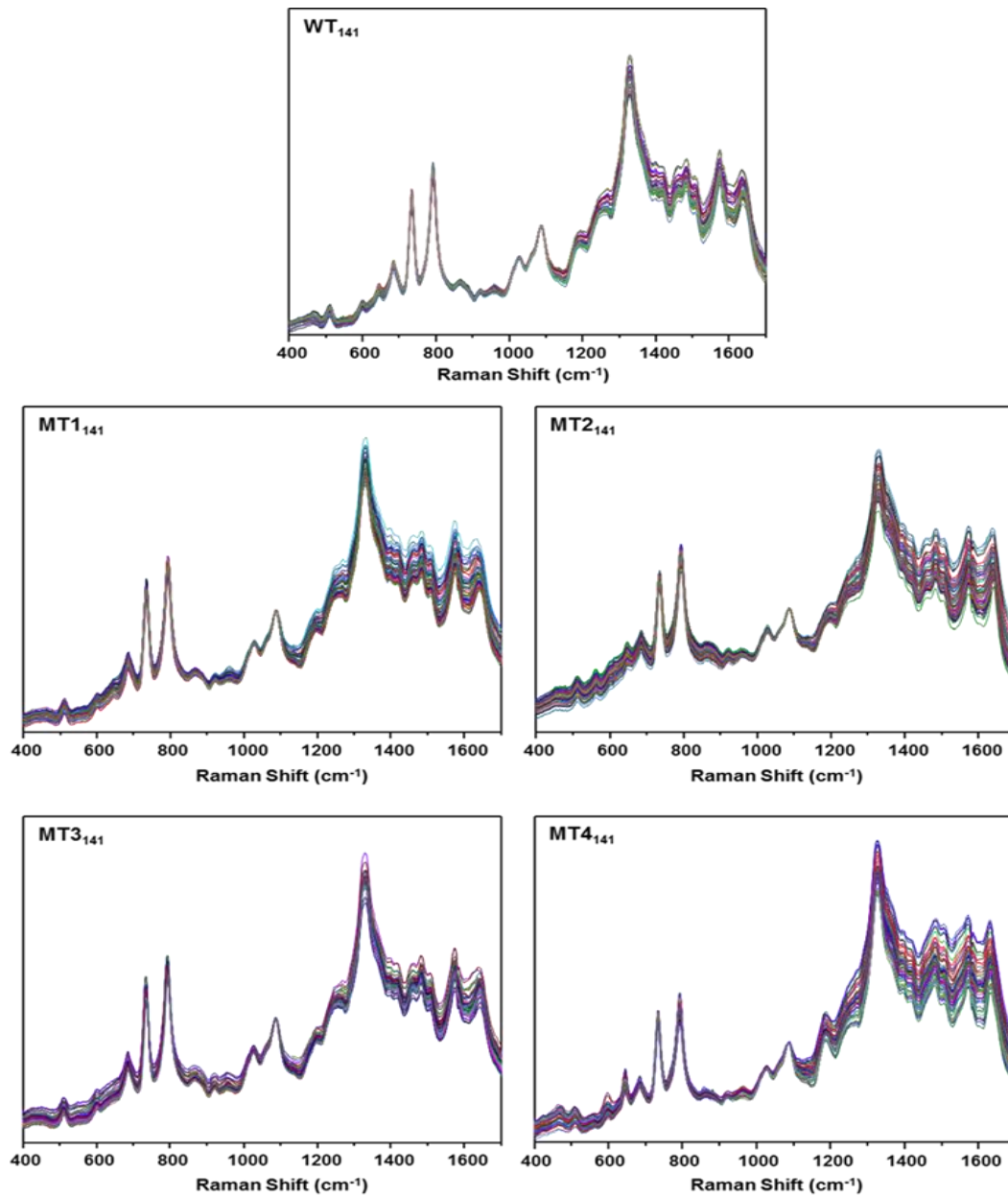


Figura 23: SERS de fragmentos de 141 pb, WT y MUT.

*FiguraS9:* SERS de ssDNA 141 nt (WT, MT1-4). Las mediciones se realizaron mediante la adición de una alícuota de la solución de ssDNA a los coloides a 25°C. La concentración de ADN se mantuvo constante a 2 µg por 100 µl de coloides.



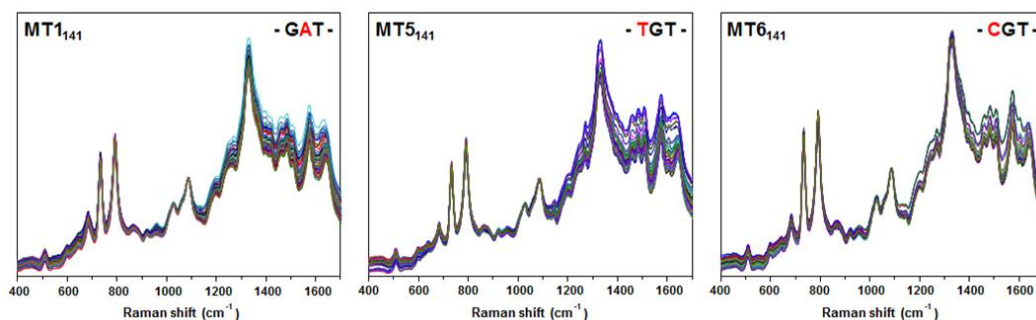


Figura 24: Espectros SERS de fragmentos de 141pb mut y wt.

*Figura S10:* espectros SERS de ssDNA 141-nt (WT, MT1, MT5 y MT6). Las mediciones se realizaron mediante la adición de una alícuota de la solución de ssDNA a los coloides a 25°C. La concentración de ADN se mantuvo constante a 2 µg por 100 µl de coloides. Las mutaciones puntuales en el codón 12 se destacan en rojo.

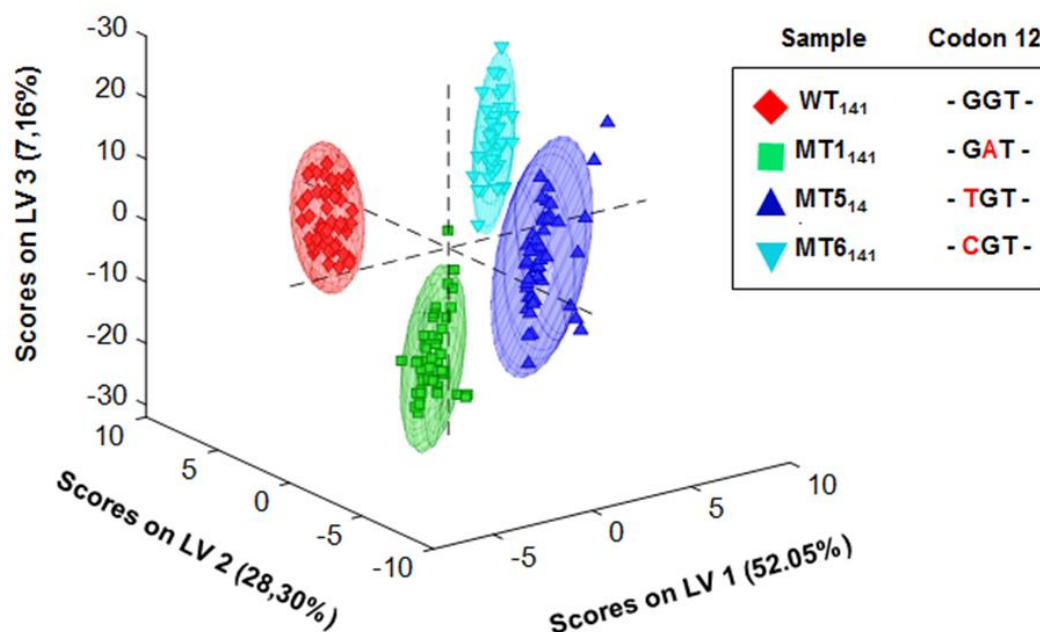


Figura 25: Análisis PLS-DA a partir de los datos espectrales de MUT en fragmentos de 141 pb.

*Figura S11:* PLS-DA gráfico de las puntuaciones de la variable latente (LV) obtenido a partir de datos espectrales SERS de secuencias WT141 y 141-nt que contienen una única mutación en el codón 12: MT1141 (G → A), MT5141 (G → T) y MT6141 (G → DO). Los gráficos de puntuación se representan por las tres primeras variables latentes (LV) y cada espectro se denotan por un punto de datos dentro de elipses de confianza del 95%, su posición es característica para cada característica del espectro. Los espectros SERS analizados se adquirieron a partir de muestras preparadas mezclando una alícuota de solución de ssDNA a coloides a 25°C. Se obtuvieron 54 reproducciones por muestra en total.

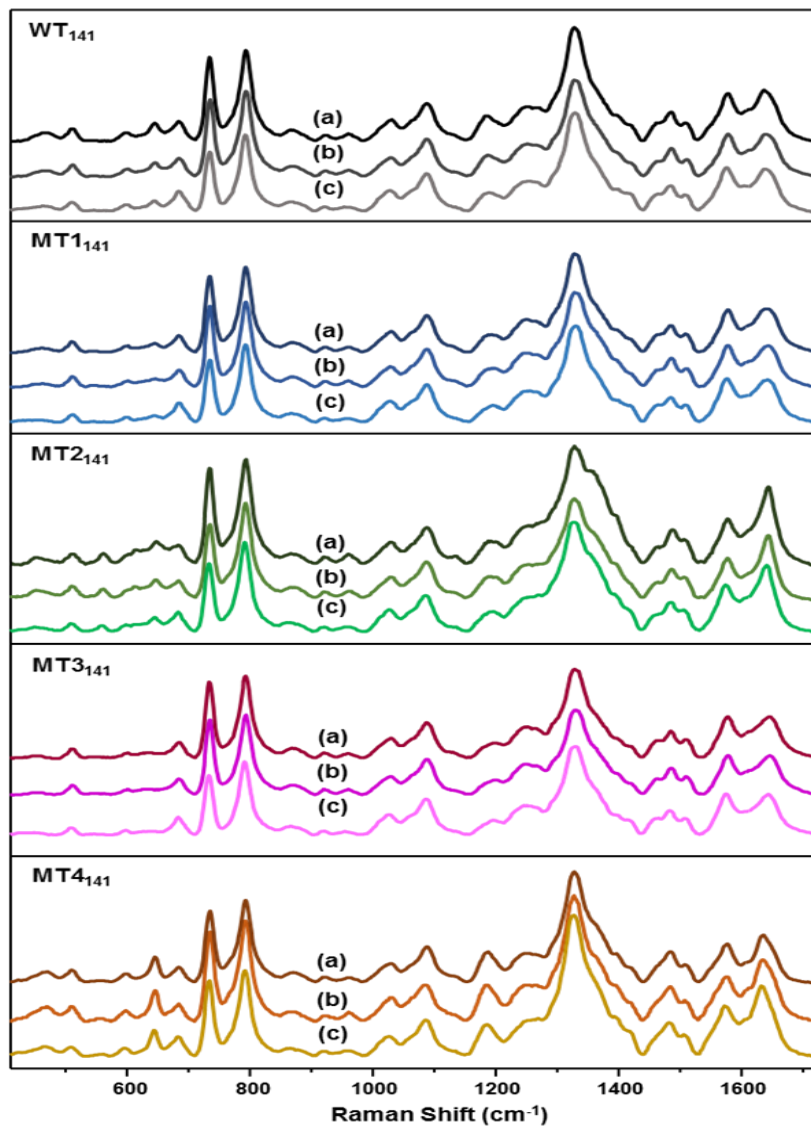


Figura 26: Espectros SERS de fragmentos de 141 pb en distintas condiciones.

*Figura S13:* Espectro SERS de 141-nt ssDNA. Todos los espectros se normalizaron a la banda  $\nu_{PO2}$  a aprox.  $1089\text{ cm}^{-1}$ . El análisis de SERS se realizó en diferentes condiciones experimentales: (a) no se añadió solución de ssDNA tratado térmicamente a coloides a temperatura ambiente, (b) se añadió solución de ssDNA a  $60^\circ\text{C}$  a coloides a temperatura ambiente, y (c) se añadió solución de ssDNA a  $60^\circ\text{C}$  a coloides a  $4^\circ\text{C}$ . Los espectros ilustrados se obtienen promediando 54 espectros de 18 réplicas independientes por muestra (3 mediciones por cada réplica). La concentración de ADN se mantuvo constante a  $2\text{ }\mu\text{g}$  por  $100\text{ }\mu\text{l}$  de coloides.

## Referencias

- 1 L. Goitre, E. Trapani, L. Trabalzini, S. F. Retta, *Ras Signaling: Methods and Protocols*, Human Press 2014, 1-18.
- 2 A. D. Cox, C. J. Der, *Small GTPases* 2010, 1, 2-27.
- 3 (a) J. L. Bos, *Cancer Res.* 1989, 49, 4682-4689; (b) M. Macaluso, G. Russo, C. Cinti, V. Bazan, N. Gebbia, A. Russo, *J. Cell. Physio.* 2002, 192, 125-130.
- 4 A. E. Karnoub, R. A. Weinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9, 517-531.
- 5 J.-M. Xu, X.-J. Liu, F.-J. Ge, L. Lin, Y. Wang, M. R. Sharma, Z.-Y. Liu, S. Tommasi, A. Paradiso, *J Exp Clin Cancer Res* 2014, 33, 1.
- 6 (a) E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2011, 50, 9058-9061; (b) L.-J. Xu, Z.-C. Lei, J. Li, C. Zong, C. J. Yang, B. Ren, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 5149-5154; (c) L. Guerrini, Ž. Krpetić, D. van Lierop, R. A. Alvarez-Puebla, D. Graham, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2015, 54, 1144-1148; (d) J. Morla-Folch, H.-n. Xie, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *ACS Nano* 2016, 10, 2834-2842.
- 7 H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biopolymers* 1999, 50, 656-666.
- 8 (a) A. J. Hobro, D. M. Standley, S. Ahmad, N. I. Smith, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 13199-13208; (b) J. M. Benevides, S. A. Overman, G. J. Thomas, *J. Raman Spectrosc.* 2005, 36, 279-299; (c) D. Serban, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biochemistry* 2002, 41, 847-853.
- 9 (a) T. Kusakabe, K. Maekawa, A. Ichikawa, M. Uesugi, Y. Sugiura, *Biochemistry* 1993, 32, 11669-11675; (b) V. K. Kakavas, K. V. Konstantinos, P. Plageras, P. Panagiotis, T. A. Vlachos, V. T. Antonios, A. Papaioannou, P. Agelos, V. A. Noulas, N. V. Argiris, *Mol. Biotechnol.* 2008, 38, 155-163.

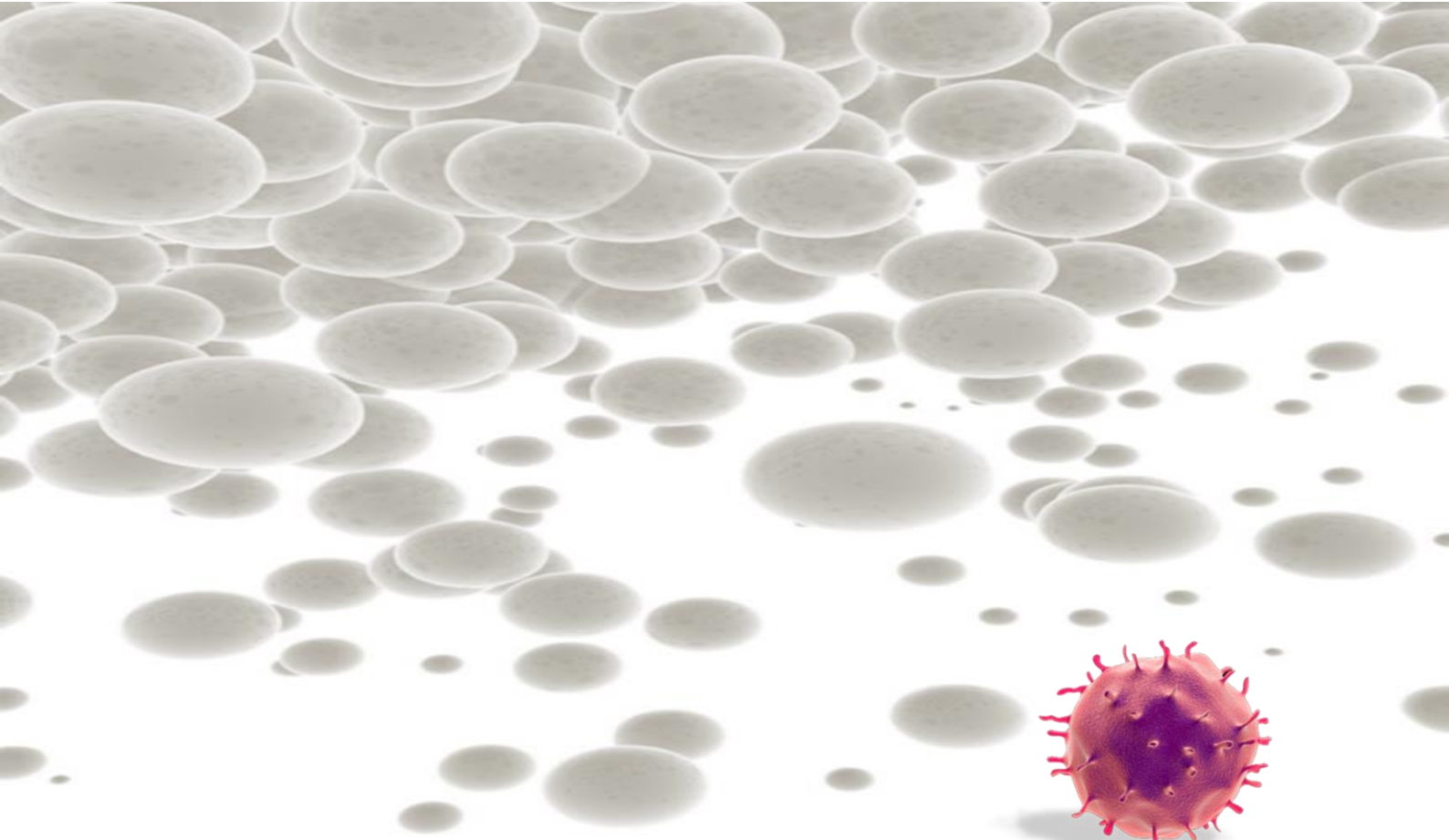
- 10 (a) K. Hayashi, *PCR Meth. Appl.* 1991, 1, 34-38; (b) A. J. Nataraj, I. Olivos-Glander, N. Kusakawa, W. E. Highsmith, *Electrophoresis* 1999, 20, 1177-1185.
- 11 V. C. Sheffield, J. S. Beck, A. E. Kwitek, D. W. Sandstrom, E. M. Stone, *Genomics* 1993, 16, 325-332.
- 12  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS8702>.
- 13 COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 14 A. Buhot, A. Halperin, *Phys. Rev. E* 2004, 70, 020902.
- 15 Y. Zhang, H. Zhou, Z. C. Ou-Yang, *Biophys. J.* 2001, 81, 1133-1143.
- 16 J. Morla-Folch, H.-n. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. Gómez-de Pedro, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2015, 54, 13650-13654.
- 17 A. Estevez-Torres, D. Baigl, *Soft Matter* 2011, 7, 6746-6756.
- 18 C. J. Allegra, R. B. Rumble, S. R. Hamilton, P. B. Mangu, N. Roach, A. Hantel, R. L. Schilsky, *J. Clin. Oncol.* 2016, 34, 179-185.
- 19 J. M. Benevides, P. L. Stow, L. L. Ilag, N. L. Incardona, G. J. Thomas, *Biochemistry* 1991, 30, 4855-4863.
- 20 K. Hayashi, D. W. Yandell, *Hum. Mutat.* 1993, 2, 338-346.
- 21 (a) M. Orita, Y. Suzuki, T. Sekiya, K. Hayashi, *Genomics* 1989, 5, 874-879; (b) Y. Suzuki, M. Orita, M. Shiraishi, K. Hayashi, T. Sekiya, *Oncogene* 1990, 5, 1037-1043.
- 22 A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N. J. Halas, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5523-5529

#### Referencias de la Información Suplementaria

- 1 M. Masetti, H.-n. Xie, Ž. Krpetić, M. Recanatini, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 469-476.

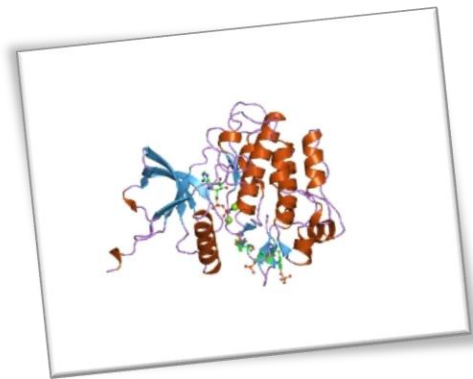
- 2 J. Yguerabide, E. E. Yguerabide, *Anal. Biochem.* 1998, 262, 157-176.
- 3 A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N. J. Halas, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5523-5529.
- 4 Z. Haidong, in *Hypertension: Methods and Protocols* (Eds.: J. P. Fennell, A. H. Baker), Humana Press, Totowa, NJ, 2005, pp. 149-158.
- 5 J. Morla-Folch, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *J. Phys. Chem. Lett.* 2016.
- 6 V. K. Kakavas, K. V. Konstantinos, P. Plageras, P. Panagiotis, T. A. Vlachos, V. T. Antonios, A. Papaioannou, P. Agelos, V. A. Noulas, N. V. Argiris, *Mol. Biotechnol.* 2008, 38, 155-163.
- 7 M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989, 86, 2766-2770.
- 8 H. a. W. Abdi, L. J. , *WIREs Comp Stat* 2010, 2, 433-459.
- 9 M. Barker, W. Rayens, *J Chemometrics* 2003, 17, 166-173.
- 10 A. Zeida, M. R. Machado, P. D. Dans, S. Pantano, *Phys. Rev. E* 2012, 86, 021903.
- 11 R. C. Van Lehn, A. Alexander-Katz, *Soft Matter* 2011, 7, 11392-11404.
- 12 D.A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, I. T.E. Cheatham, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, University of California, San Francisco. 2014.
- 13 (a) A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, *J. Chem. Theory Comput.* 2012, 8, 1542-1555; (b) A. Onufriev, D. Bashford, D. A. Case, *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 3712-3720.
- 14 E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2011, 50, 9058-9061.

- 15 R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, 2006.
- 16 (a) J. Morla-Folch, H.-n. Xie, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *ACS Nano* 2016, 10, 2834-2842; (b) A. Torres-Nunez, K. Faulds, D. Graham, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Analyst* 2016; (c) L. Guerrini, Ž. Krpetić, D. van Lierop, R. A. Alvarez-Puebla, D. Graham, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2015, 54, 1144-1148; (d) J. Morla-Folch, H.-n. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. Gómez-de Pedro, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2015, 54, 13650-13654.
- 17 (a) E. Taillandier, J. Liquier, M. Ghomi, *J. Mol. Struct.* 1989, 214, 185-211; (b) J. M. Benevides, S. A. Overman, G. J. Thomas, *J. Raman Spectrosc.* 2005, 36, 279-299; (c) J. M. Benevides, A. H. J. Wang, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, G. J. Thomas, *Biochemistry* 1989, 28, 304-310; (d) L. Movileanu, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biopolymers* 2002, 63, 181-194; (e) H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biopolymers* 1999, 50, 656-666; (f) P. Y. Turpin, L. Chinsky, A. Laigle, B. Jolles, *J. Mol. Struct.* 1989, 214, 43-70.



## 4 ESTUDIO II

### BIOPSIA LÍQUIDA DE PROTEÍNAS



#### 4.1 Reglas SERS de Selección de Superficie aplicadas a la Biopsia Líquida Proteómica en Muestras Reales: Detección eficiente de la Oncoproteína c-MYC

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

c-MYC

SERS Y REGLAS DE SELECCIÓN

OBJETIVOS

MODELO EXPERIMENTAL

MUESTRAS REALES

CONCLUSIONES

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

REFERENCIAS



### 4.1.1 Resumen

Los biomarcadores de cáncer basados en el estudio de sangre periférica, ya sean proteínas, ácidos nucleicos o las propias células tumorales (biopsia líquida), ofrecen herramientas extremadamente valiosas para el diagnóstico no invasivo y la monitorización de tumores. La proteína c-MYC, un factor de transcripción que ha mostrado estar desregulado en más del 70% de los cánceres humanos, puede ser un buen candidato para ser utilizado como una sólida firma proteómica para el cáncer. En primer lugar, por su universalidad y en segundo lugar por ser, su expresión alterada, independiente de las modificaciones fenotípicas de las células tumorales. Por otro lado, podría comportarse como un objetivo subrogado de la propia presencia de células tumorales en sangre periférica, cuando estas son muy escasas. En este sentido, este trabajo se plantea una nueva estrategia para la detección indirecta de células tumorales mediante una tecnología rápida, altamente específica y sensible basada en un ensayo SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) para la cuantificación de la proteína c-MYC en muestras de sangre real. El esquema de detección se basa en el uso de materiales plasmónicos híbridos específicamente diseñados y su funcionalización biológica mediante un receptor peptídico selectivo de cMYC que hace la función de transductor. Se utiliza la propiedad característica de la proteína c-MYC que consiste en heterodimerizarse con la proteína MAX a través de una corta región de reconocimiento mutuo. Esta secuencia, propia de MAX, es la que se utiliza como receptor de c-MYC (péptido receptor). Los eventos secundarios al reconocimiento de péptido / c-MYC se traducen en alteraciones medibles del espectro SERS asociado con la orientación molecular del transductor, de acuerdo con las denominadas reglas de selección superficial. La eficacia del sensor se demuestra en líneas celulares, donantes sanos y un paciente con cáncer.

### 4.1.2 Introducción

Las decisiones terapéuticas en oncología se basan clásicamente en la caracterización clínica de la enfermedad, es decir, el diagnóstico y estadiaje clínico, y en la caracterización histológica o anátomo-patológica. Actualmente, sin



embargo, cada vez tiene más peso en dichas decisiones, la caracterización molecular de los tumores. Son casos paradigmáticos de esto el cáncer de mama, donde la determinación del estado de amplificación de HER2/neu es obligado, o en el caso del adenocarcinoma de colon, donde también es obligado el análisis molecular de los genes K-RAS y N-RAS, como hemos descrito en el capítulo anterior. Tradicionalmente, estos análisis, incluidos los moleculares, se realizan sobre tejidos sólidos obtenidos a través de una biopsia invasiva en el momento del diagnóstico. Sin embargo, las biopsias de tejido son habitualmente difíciles, ya que son costosas, dolorosas o potencialmente arriesgadas para el paciente.

Así, el desarrollo de métodos no invasivos para detectar y monitorizar tumores es una necesidad básica en oncología. Los biomarcadores sanguíneos (biopsia líquida) (1) tienen un potencial considerable para el diagnóstico y la monitorización del cáncer. Dichas biopsias se basan en la detección de células tumorales circulantes (CTCs) (2), y ácidos nucleicos tumorales circulantes (3). La detección de proteínas circulantes relacionadas con los tumores ya se realiza desde hace muchos años. Se trata habitualmente de glicoproteínas u otra moléculas, los denominados "marcadores tumorales", bien producidos por los tumores o bien producidos por otros tejidos como respuesta a la presencia de tumores (CEA, CA125, etc.). Son marcadores muy poco sensibles y específicos, por lo que su uso no puede ser nunca independiente del contexto, y no son diagnósticos. Sin embargo, los patrones de expresión de proteínas intracelulares en las células tumorales circulantes, así como en las fracciones de células mononucleares de sangre periférica (linfocitos relacionados o no con la enfermedad) siguen siendo un aspecto en gran parte inexplorado (1).

Tabla 6: Tumores con amplificación de c-MYC.

<b>Amplificación de MYC</b>
<b>Linfomas no Hoddgkin (y no Burkitt)</b>
<b>Cáncer de mama</b>
<b>Cáncer de Próstata</b>

<b>Cáncer Gastrointestinal</b>
<b>Melanoma</b>
<b>Mieloma Múltiple</b>
<b>Leucemia Mieloide</b>
<b>Neuroblastoma</b>
<b>Carcinoma de pulmón Microcítico y no Microcítico</b>

#### 4.1.3 c-MYC

La proteína c-MYC es un factor de transcripción tipo cremallera de leucina constituido por una estructura en hélice-bucle-hélice (B HLH ZL) codificado por el correspondiente gen c-MYC, que desempeña un papel principal en la coordinación entre el metabolismo y el ciclo celular. Se ha demostrado que su expresión (proteína y transcrito) está elevada o desregulada en hasta el 70% de los cánceres humanos, en general sin alteraciones genómicas estructurales, si bien se puede asociar a translocaciones. Este es el caso de la translocación 8-14 que coloca al gen bajo el control de un promotor muy activo en los linfocitos (4). Se encuentra sobreexpresión con distintos significados, ya que no siempre la sobreexpresión se asocia a mal pronóstico o peor comportamiento tumoral. Es el caso del “adenocarcinoma de colon”, en el cual la sobreexpresión de MYC se asocia a buen pronóstico. MYC (sus formas L, N o C) se encuentran amplificadas en los tumores más frecuentes (mama, colon y pulmón) (Tabla 5).

A diferencia de otros proto-oncogenes cuya actividad depende de mutaciones, truncamientos o fusiones, la oncogenicidad del gen c-MYC suele ser secundaria a la pérdida de su control transcripcional que conduce, consecuentemente, a la sobreexpresión y acumulación de la proteína c-MYC (5). Por otra parte, dicha proteína no está asociada a la expresión de ningún programa fenotípico o funcional definido, sino que actúa como un "amplificador universal" de genes que ya están siendo expresados, al incrementar la transcripción en todos los promotores ya activos (6).

Por lo tanto, la evaluación de la concentración de esta proteína en extractos de células de la sangre podría mostrar niveles elevados si en la misma hubiera células tumorales con c-MYC sobreexpresado en sangre, pudiendo utilizarse de este modo la cuantificación de c-MYC como criterio (subrogado) para el diagnóstico y la monitorización de dichas células. Es destacable, además, que la expresión amplificada de c-MYC se asocia a la “transición epitelial mesenquimal (EMT)” característica que hace a las células tumorales circulantes indetectables por los procedimientos habituales de detección de marcadores epiteliales.

#### 4.1.4 SERS y reglas de selección

La identificación y cuantificación de proteínas en la sangre se realiza normalmente usando técnicas inmunológicas estándar tales como Western Blot (WB) o el ELISA. Aunque robustos, estos métodos son tediosos, largos, caros y, en el caso del WB, tienen baja sensibilidad.

En los últimos años, la espectroscopia de dispersión Raman amplificada por superficie (SERS) (7) está suponiendo una excelente alternativa para la detección, cuantificación y caracterización de biopolímeros. Las intensidades características del espectro Raman de una determinada molécula son modificadas cuando dicha molécula se aproxima a una superficie metálica. Estas modificaciones son conocidas como reglas de selección de superficie.

SERS se ha empleado directamente para la cuantificación ultrasensible de proteínas priónicas, proteínas fluorescentes amarilla y verde (GFP, YFP) y otras (8-11). La mayoría de estas determinaciones se realizaron en soluciones de laboratorio, ya que el análisis de marcadores de proteínas en muestras reales es extremadamente difícil. Esto se debe tanto a la complejidad intrínseca de las muestras reales, que comprende una miríada de componentes, como a la baja concentración ( $\sim$  pg / mL) o a la mala sección transversal SERS (cross section) (12) de las dianas.

Una posible solución se basa en la funcionalización de materiales plasmónicos con especies químicas (quimiorreceptores) que posean una elevada sección transversal de SERS, que, a su vez, mostrasen una alta afinidad de unión y especificidad para

la proteína diana.(12). Así, según este enfoque, la detección se determinaría por los cambios espectroscópicos en el espectro SERS del quimiorreceptor al unirse con el blanco (13). A esta estrategia pueden responder moléculas como los "aptámeros", "anticuerpos" o péptidos, que harían la función de "quimiorreceptores" con alta especificidad. (14). Sin embargo, estas moléculas se caracterizan a menudo por una bajísima actividad SERS lo cual limita su utilidad para la ultra detección directa requerida.

Este problema puede ser solventado mediante la modificación del receptor macromolecular, añadiéndole un motivo terminal con una sección transversal SERS elevada y que, al mismo tiempo, tenga afinidad por la superficie plasmónica para mediar la interacción entre el receptor y el sustrato metálico (14).

#### 4.1.5 Objetivos

- 1- Detectar la presencia de c-MYC mediante la construcción de un receptor capaz de transducir dicha presencia por las modificaciones específicas que dicha presencia induciría en su espectro SERS
- 2- Correlacionar la cuantificación de c-MYC derivada del procedimiento anterior, con la presencia de células tumorales, tanto de líneas celulares como de muestras de sangre real de pacientes con cáncer.

#### 4.1.6 Modelo experimental

Se diseñó y preparó un péptido conjugado SERS-activo denominado MB-H capaz de unirse a c-MYC (proteína) con alta afinidad y selectividad. Por otro lado, se sintetizaron nanoesferas de silicio homogéneamente recubiertas con nanopartículas de plata (SiO<sub>2</sub> @ Ag), que posteriormente fueron biofuncionalizadas con el quimiorreceptor (SiO<sub>2</sub> @ Ag @ MB-H1). Este "constructo" constituye el sistema que posteriormente fue utilizado con éxito para la cuantificación de la proteína c-

MYC, primero en laboratorio, con muestras sintéticas y líneas celulares, posteriormente con muestras reales de paciente con cáncer y donantes sanos.

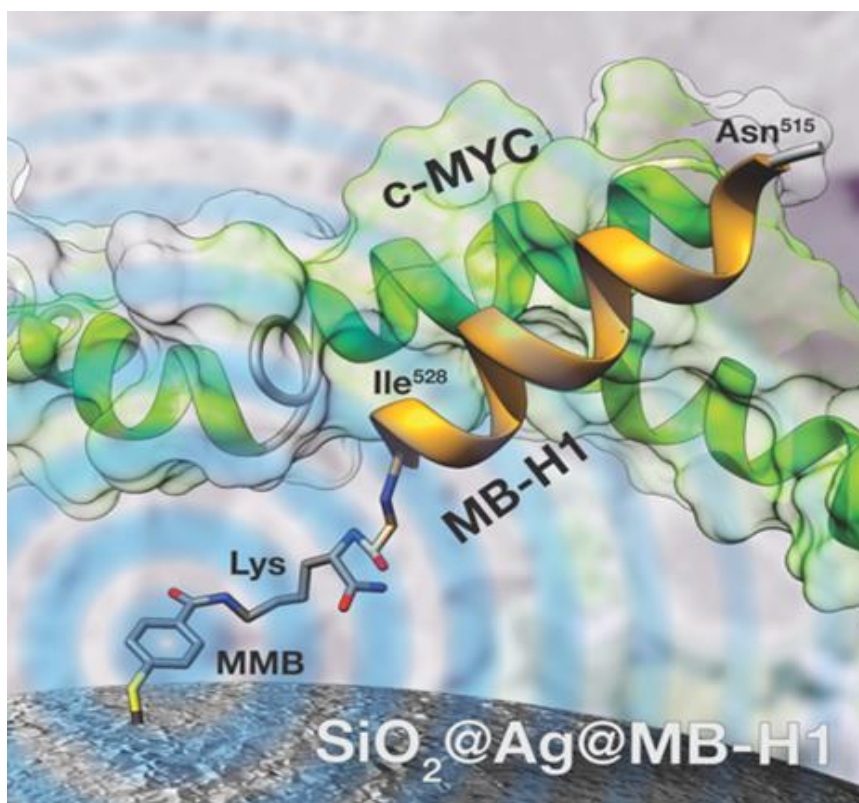


Figura 27: Estructura del constructo.

*Figura S-Final:* Estructura del péptido MB-H1 con su unión a la superficie de la nanopartícula (SiO<sub>2</sub>@Ag@) mediante MMB. c-MYC aparece en verde dimerizándose con el péptido.

El quimiorreceptor orgánico se basa en un doble péptido mutante (Ser520 → Ala, Phe522 → Ala) derivado de la hélice 1 (H1) de la región hélice-bucle-hélice de la proteína c-MYC (515-NELKRAFAALRDQI-528, H1) (S6A), el cual es sabido que interactúa con alta afinidad y selectividad con c-MYC (15). Para construir la sonda SERS, se unió ortogonalmente una unidad de 4-mercaptobenzoilo (MB) al grupo amino lateral de un residuo de Lys (Lisina) en el extremo C-terminal del péptido H1 (S6A). Dicha modificación no parece alterar la tendencia intrínseca del péptido a estructurarse helicoidalmente, ni sus propiedades de unión a c-MYC. La síntesis del péptido-conjugado MB-H1 se describe en materiales y métodos (Información Suplementaria). Las nanopartículas de plata con recubrimiento de citrato (AgNPs) de aproximadamente 65 nm de diámetro (Figuras S5A y B) se depositaron

electrostáticamente sobre microesferas (perlas o "beads") de sílice de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro ( $\text{SiO}_2 @ \text{Ag}$ ). Anteriormente, las microesferas de sílice cargadas negativamente se recubrieron secuencialmente con polielectrolitos (polietilenimina, PEI, positivo), ácido poliacrílico (PAA, negativo) y de nuevo PEI, utilizando el protocolo de ensamblaje capa por capa (LbL) (figuras S5C- E) (16). El espectro Ultra Violeta-Visible de los AgNPs preparados (Figura 1-A) mostró una resonancia plasmónica de superficie definida a 449 nm.

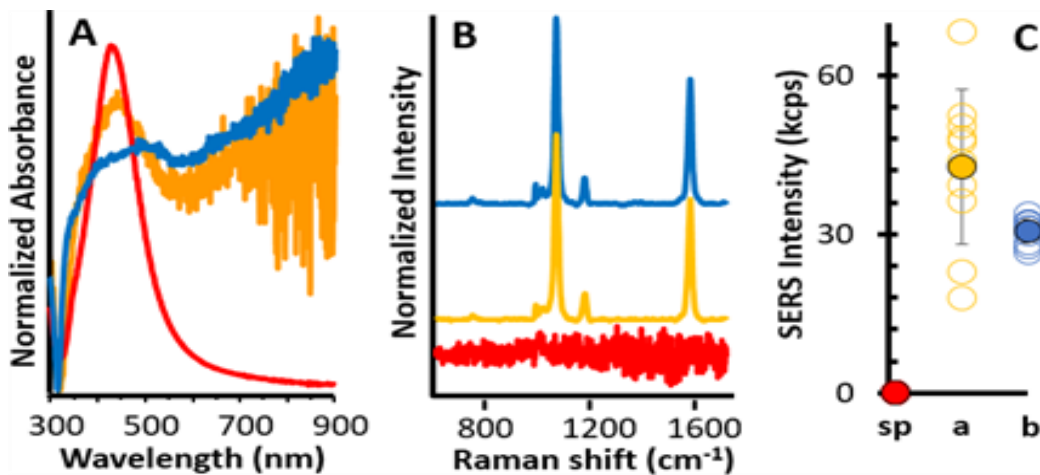


Figura 28: Espectros de la nanopartícula en sus distintas fases.

Figura 1: (A) Espectro UV-vis de la solución AgNPs (rojo), agregados en superficie (naranja) y anclados a superficie de perlas de vidrio (azul). (B) Espectro SERS de MB-H1 de no agregados (rojo) y agregados de AgNPs (naranja) sobre láminas de vidrio, y sobre  $\text{SiO}_2 @ \text{Ag}$  (azul). (C) Intensidades SERS correspondientes a la altura de los de los picos a  $1075 \text{ cm}^{-1}$ .

La deposición de nanopartículas sobre un soporte sólido da como resultado la aparición de una señal característica, intensa y amplía a una longitud de onda larga, que es un indicador del acoplamiento entre partículas. La huella digital de SERS de MB-H1 sobre las  $\text{SiO}_2 @ \text{Ag}$  se muestra en la Figura 1B (curva azul). Notablemente, las  $\text{SiO}_2 @ \text{Ag}$  ofrecen una amplia área superficial, una estrecha interacción adsorbente-adsorbato y una alta densidad de puntos calientes electromagnéticos, combinando así los beneficios de los coloides y las películas, superando las importantes limitaciones de ambos. Como controles negativos se utilizaron nanopartículas de plata (AgNP) sobre láminas de vidrio, además de microesferas (perlas). Cuando estas no se agregaron, no mostraron señal SERS



apreciable (Figura S6B). Sin embargo, cuando se agregaron, la señal SERS de los agregados sobre película o microesferas (perlas) fue idéntica, aunque con una mayor desviación estándar en la primera (Figura 1 B, C).

El tamaño grande de las nanoesferas permite su fácil localización con un objetivo de bajo aumento (por ejemplo,  $\times 5$ ) para el escaneo posterior, ya con un objetivo de mayor resolución (por ejemplo,  $\times 50$  o  $\times 100$ ) (Figura 2A). Además, por su tamaño, se puede reducir drásticamente la cantidad de material plasmónico necesaria para la detección, lo que, a su vez, mejora la sensibilidad aumentando el número de moléculas en relación con el de nanopartículas. Esto se ejemplifica en las Figura 2 B, C, que muestran que el SERS de MB-H1 puede discriminar cantidades hasta por debajo de 10 pM para una concentración de partículas de 2400 perlas / ml, mientras que cantidades de SiO<sub>2</sub> Ag aún más más bajas (240 perlas / ml) permiten la detección por debajo de 1 pM.

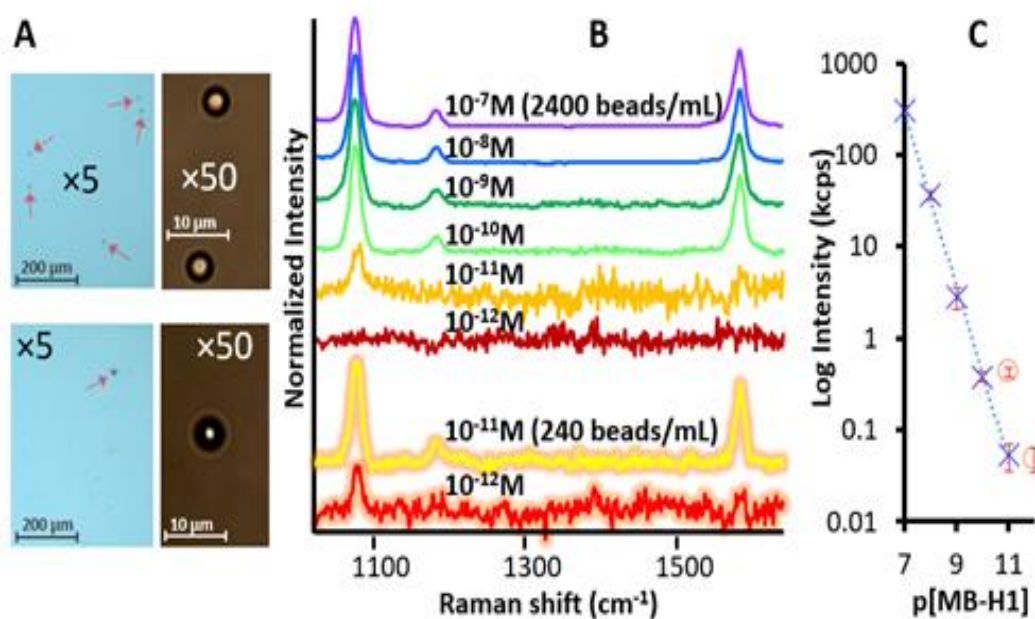


Figura 29: Espectros a diferentes concentraciones.

Figura 2: (A) Imágenes ópticas a baja ( $\times 5$ ) y alta ( $\times 50$ ) magnificación de las perlas desde alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión con concentración de 2400 (paneles altos) y 240 (paneles bajos) perlas/mL. (B) Espectro SERS de MB-H1 a diferentes concentraciones sobre SiO<sub>2</sub>@Ag (2400 perlas/mL y (resaltado) 240 perlas/mL). (C) Sus correspondientes intensidades a 1075  $\text{cm}^{-1}$ .

En principio, la captura de la proteína c-MYC por el complejo MB-H1 unido a perlas de SiO<sub>2</sub> @ Ag podría dar lugar a un gran conjunto de perturbaciones en el espectro SERS del motivo mercaptobenzoil (MB), que irían desde cambios sutiles

de sus características vibratorias hasta la aparición de nuevos picos. Para la interpretación de tales variaciones, se adquirieron previamente los espectros Raman y SERS del motivo sin péptido H1 (4-mercapto-N-metilbenzamida o MMB) y los de MB-H1 antes y después de la reacción con c-MYC (Figura 3A). Los espectros SERS de MMB y MB-H1 muestran patrones vibratorios similares, pero con algunas diferencias en intensidades relativas. Este resultado apunta hacia un ligero cambio de la orientación molecular del grupo mercaptobenceno sobre la superficie de la plata cuando se acopla con una molécula más grande tal como H1, en pleno acuerdo con las reglas de selección de superficie (17). Esta perturbación se amplifica cuando tiene lugar la unión del complejo con la proteína c-MYC, que es proporcionalmente muy grande.

Con el fin de identificar los modos de vibración del motivo mercaptobenceno más sensibles a las reorientaciones geométricas que este último experimenta en relación con la superficie, es decir, para identificar a partir del espectro SERS los cambios geométricos que tienen lugar en la molécula en las distintas condiciones experimentales, se realizaron cálculos mediante la DFT (Density Functional Theory-). Se trata de un método computacional que simplifica la complejidad de los cálculos cuánticos clásicos basados en la función de onda. La DFT obtiene sus predicciones a partir de la densidad tridimensional de las nubes de electrones, pues teóricamente estas son las que definirán la geometría de la molécula (18) (Figura3A). Se definen grupos puntuales (en geometría y cristalografía) a grupos de simetrías que mantienen constante por lo menos un punto fijo. Los resultados indican que MMB pertenece al grupo puntual C1 de simetría, lo que implica que no es planar. Sin embargo, y derivado de la interacción Plata/Tiol (unión de la molécula) (19) se puede asumir una orientación perpendicular sobre el metal (Ag) (20). Por otra parte, el campo eléctrico de superficie, E, presenta únicamente un componente normal (dirección Z en la Figura 3B) (21). Con base en estas consideraciones, el modo vibracional es proporcional al cuadrado del producto escalar del campo eléctrico y del momento dipolar derivado de dicho modo vibracional (22). Este escenario define, en teoría, dos grados de libertad para los cambios de orientación del anillo fenilo como consecuencia de sus interacciones con otras moléculas ( $\theta$  y  $\chi$  Figura 3B). El espectro Raman teórico de MMB muestra buena correlación con el experimental, lo que permite una asignación segura de los modos observados.



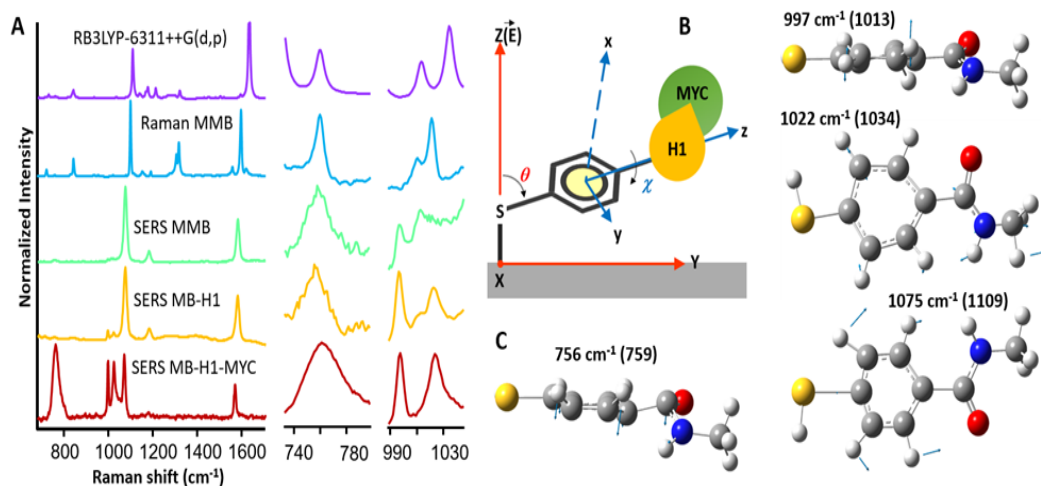


Figura 30: Funcionalidad del constructo y respuesta en presencia de c-MYC.

Figura 3: (A) Espectro Raman teórico y experimental de los espectros MMB y SERS de MMB, MB-H1 y MB-H1 en presencia de c-MYC, sobre SiO<sub>2</sub> Ag. También se muestra la ampliación de las ventanas espectrales entre 730-800 y 990-1050. (B) Modelo utilizado en la estimación de la orientación molecular. La orientación absoluta de la molécula sobre la superficie y la orientación relativa del anillo sobre la superficie están representadas por los ejes XYZ y xyz, respectivamente. (C) Asignación de modo vibratorio como se describe en los cálculos de DFT (valor teórico entre paréntesis).

Así, dicho espectro de MBB, muestra una intensidad baja de los modos fuera del plano, es decir, en relación con el plano del anillo, a 756 y 997 cm<sup>-1</sup> de MBB, indicando una orientación perpendicular del anillo frente a la superficie. La adición de H1 a MMB aumenta ligeramente la intensidad de estos modos, pero, y esto es lo destacable, este efecto se hace más notable cuando MB-H1 interactúa con c-MYC como consecuencia del tamaño masivo (57 kDa) de este último. De hecho, la presencia de estas intensificaciones en las bandas fuera del plano alcanzan el mismo nivel que la denominada "respiración del anillo" (1075cm<sup>-1</sup>) indicando una reorientación más plana del anillo en relación con la superficie. Datos también confirmados por el modo de estiramiento N-C a 1022 cm<sup>-1</sup> cuya señal es mínima en MB - H1 y elevada tras la unión con c - MYC.

Por otra parte, la utilización de esta metodología para la cuantificación de c-MYC debe partir del hecho de que el espectro SERS puede resultar tanto de la ocupación de todos los receptores disponibles (MB-H1) como solo de la ocupación de algunos, cuando estos exceden a la cantidad de c-MYC presente. En este último caso, contribuyen al espectro los dos estados: el ocupado y el no ocupado por c-MYC. Así, más que monitorizar las intensidades absolutas de las características bajo observación, la cuantificación de c-MYC se realizó mediante la ratio de

deformación CCH fuera del plano (Intensidad a  $756\text{ cm}^{-1}$ ) y el "anillo de respiración" sobre el plano ( $1075\text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.7 Muestras reales

La eficacia del sensor se demostró con líneas de células tumorales y muestras humanas reales. Para validar los resultados se utilizó un ELISA para la proteína c-MYC. El estudio fue presentado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación con Medicamentos del Grupo HM Hospitales y todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado por escrito.

La figura 4A muestra un esquema del protocolo seguido para la cuantificación de c-MYC, tanto por el método ELISA y como por SERS. Se obtuvieron muestras de sangre de dos donantes sanos y un paciente diagnosticado de adenocarcinoma ovárico (estadio IV) con alta carga tumoral. La paciente estaba en progresión en el momento de la recolección de la muestra. La presencia del tumor se confirmó histológicamente de acuerdo con los procedimientos habituales. Cada muestra de sangre periférica (8 ml) se procesó en las siguientes 24 h después de la extracción para obtener las células mononucleares mediante un proceso de separación por gradiente de densidad (Ficoll). Las células mononucleares recogidas de las muestras de sangre, así como las de una línea celular tumoral epitelial (MCF7) se lisaron y se centrifugaron. Posteriormente se extrajeron los sobrenadantes y, para ELISA, se valoró la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford. Los niveles de c-MYC se determinaron a continuación con un kit ELISA de c-MYC total humano. En el caso de SERS, SiO<sub>2</sub> @ Ag @ MB-H1 (240 perlas funcionalizadas con 100 pM de MB-H1, que es equivalente a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  moléculas por perla) se añadieron directamente a cada uno de los sobrenadantes hasta una concentración final de 200 perlas / ml. Después se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ l sobre placas de vidrio y las perlas se analizaron mediante SERS antes de la evaporación del disolvente.

La Figura 4B muestra el espectro SERS para ambos procedimientos de cuantificación con cantidades crecientes de c-MYC (en líneas finas punteadas), y para las muestras humanas reales (en líneas gruesas sólidas). Las curvas de calibración correspondientes obtenidas para cada método se presentan en la Figura

4C. En particular, en la validación del procedimiento frente al estándar (ELISA), tanto ELISA como SERS muestran coeficientes de correlación adecuados con límites de detección de c-MYC análogos, aunque existe una desviación estándar ligeramente mayor para el método óptico. Sin embargo, los resultados de SERS se obtienen en cuestión de minutos, en comparación con las preparaciones de 4-5 h requeridas para ELISA.

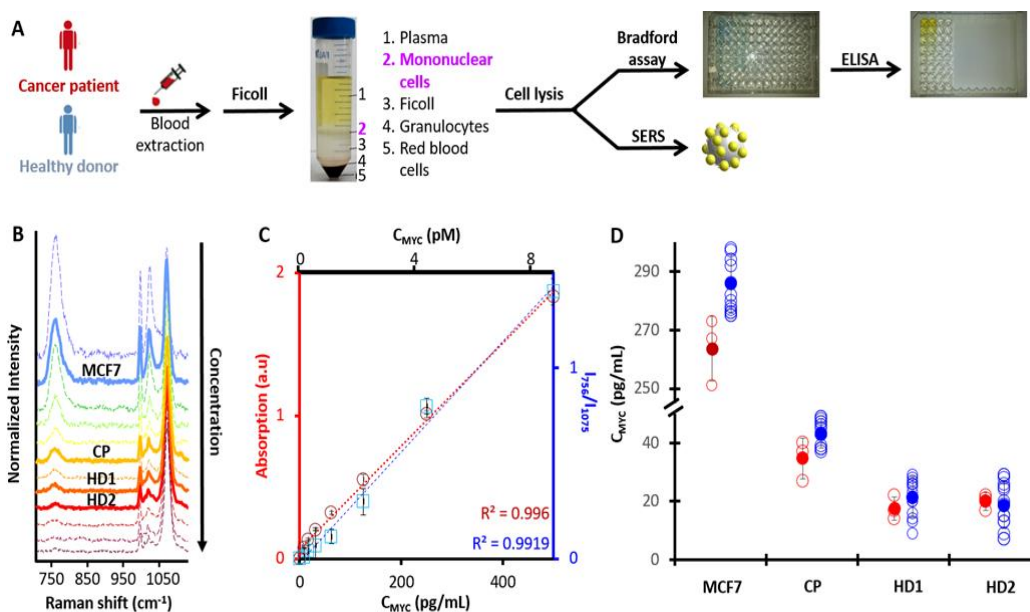


Figura 31: Protocolo en muestras reales.

Figura 4: (A) Protocolo para el aislamiento de células mononucleares en muestras de sangre humana de un paciente de cáncer y varios donantes sanos. (B) Espectros de SERS de SiO<sub>2</sub> @ Ag @ MB-H1 en presencia de concentraciones decrecientes de c-MYC (líneas punteadas finas) y de muestras reales (líneas sólidas gruesas). (C) Curvas de calibración para ELISA (rojo) y para el sensor óptico experimental (azul). (D) Resultados obtenidos para una línea de células tumorales epiteliales (MCF7), y muestras extraídas de un paciente con cáncer (CP) y dos donantes sanos (HD1 y HD2). ELISA en rojo, y sensor óptico en azul. Concentración de c-MYC por millón de células.

Con las muestras reales se obtienen resultados similares con ambos procedimientos (Figura 4D). Finalmente, la línea MFC7 produce valores mucho más altos que la muestra real, probablemente porque en ese caso todas las células del cultivo son cancerosas, donde en las muestras reales sólo una pequeña fracción son células tumorales.

#### 4.1.8 Conclusiones

En resumen, hemos desarrollado un ensayo rápido, altamente específico y sensible basado en SERS para la determinación de c-MYC en muestras de sangre real. La proteína c-MYC evaluada no es una proteína plasmática circulante. Se trata de una proteína nuclear, cuyo origen son las células circulantes mononucleares, entre las que se incluyen monocitos, linfocitos y células tumorales circulantes. Las primeras, normalmente células inactivadas, no presentan sobre-expresión de c-MYC, motivo que explica que los controles sanos muestren cifras bajas de esta proteína, mientras que los pacientes con alta carga tumoral y, consecuentemente, un elevado número de células tumorales circulantes, sí presentarían amplificación de c-MYC.

El sistema de detección se basa en el uso de materiales híbridos específicamente diseñados, que consisten en micropartículas de sílice más bien recubiertas homogéneamente con nanopartículas de plata que interactúan. Las superficies metálicas se funcionalizan con un péptido de unión a c-MYC modificado con una antena de 4-mercapto-N-metilbenzamida (MB-H1) que transduce los eventos específicos de reconocimiento de c-MYC en una alteración medible de la señal SERS de MB- H1. La deconvolución de la huella vibratoria del quimiorreceptor ha permitido identificar los modos vibratorios característicos afectados por la unión del complejo a c-MYC. La magnitud de tales cambios espectrales se correlacionó cuantitativamente con el contenido de c-MYC en medios biológicos complejos, es decir, en muestras reales.

#### 4.1.9 Información Suplementaria

##### 4.1.9.1 Materiales.

Todos los reactivos de síntesis de péptidos y derivados de aminoácidos se adquirieron de GL Biochem (Shanghai), Novabiochem o Iris Biotech GmbH. Se adquirieron aminoácidos como aminoácidos protegidos Fmoc con el esquema de protección de cadena lateral estándar: Fmoc-Lys (Boc) -OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-

Arg (Pbf) -OH, Fmoc-Asn (Trt) Fmoc-Glu (tBu) -OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp (tBu) -OH, Fmoc-Gln (Trt) -OH y Fmoc-Lys Alloc) -OH. DMF y TFA se adquirieron de Scharlau, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de Panreac y CH<sub>3</sub>CN de Merck. Citrato trisódico dihidratado ( $\geq 99,5\%$ ), ácido L-ascórbico ( $\geq 99,0\%$ ), nitrato de plata ( $\geq 99,9999\%$ ), sulfato de magnesio (99,5%), polietilimina ramificada (PEI, 25000) y el resto de los reactivos De Sigma-Aldrich. Se adquirieron perlas de sílice de 7,75  $\mu\text{m}$  de diámetro a partir de Microparticles GmbH. El c-MYC recombinante humano se adquirió en Creative BioMart. Todos los disolventes estaban secos y de grado de síntesis, a menos que se especificara específicamente, y todos los reactivos se usaron sin purificación adicional. Se usó agua Milli-Q ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) en todas las soluciones acuosas, y todos los cristales se limpiaron con agua regia antes de los experimentos.

#### 4.1.9.2 Instrumentación.

Las reacciones se controlaron mediante RP-HPLC con una LC / MS Agilent serie 1100 utilizando una columna analítica Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Los compuestos se detectaron por absorción de UV (220 y 270 nm). Las condiciones estándar para RP-HPLC analítico consistían en un régimen isocrático durante los primeros 5 min, seguido por un gradiente lineal de 5 a 95% de disolvente B durante 30 min a un caudal de 1 ml / min (A: agua con 0,1 % TFA, B: acetonitrilo con TFA al 0,1%).

La purificación por HPLC de fase inversa se realizó en una serie Agilent 1100 equipada con un sistema de bomba binaria y un detector UV-vis, usando una columna semimaborativa Phenomenex Luna C18 100A (250 x 21,2 mm, 10  $\mu\text{m}$ ). La purificación se llevó a cabo usando un régimen isocrático durante los primeros 5 min a 5% de disolvente B y luego gradientes lineales de 5% a 75% de disolvente B durante 30 min a un caudal de 3 ml / min (A: agua con 0,1 % TFA, B: acetonitrilo con TFA al 0,1%). Las fracciones que contenían los productos se liofilizaron y su identidad se confirmó mediante ESI-MS.

Los espectros UV-vis se registraron utilizando un espectrofotómetro UV-vis Thermo Scientific Evolution 201. La concentración de péptidos se calculó mediante

la ley de Lambert-Beer, utilizando un coeficiente de extinción de 11862 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 310 nm. La concentración de plata para AgNPs se calculó utilizando el coeficiente de extinción de 6,61 x 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (1-3).

Las micrografías electrónicas se registraron con microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM-1011 operando a 80 kV) y una microscopía electrónica de barrido ambiental (JEOL 6400) para la caracterización estructural de las muestras.

Los experimentos de SERS se realizaron usando un microscopio confocal Renishaw InVia Reflex equipado con una rejilla de 1200 ranuras mm<sup>-1</sup> para las longitudes de onda NIR, óptica de filtro de paso de banda adicional y una cámara 2D-CCD. Todos los espectros se adquirieron utilizando 785 nm de láser de excitación, mediante el enfoque del láser en la muestra con objetivos 5x o 50x.

#### 4.1.9.3 Procedimientos generales de síntesis de péptidos

##### 4.1.9.3.1 *HI*

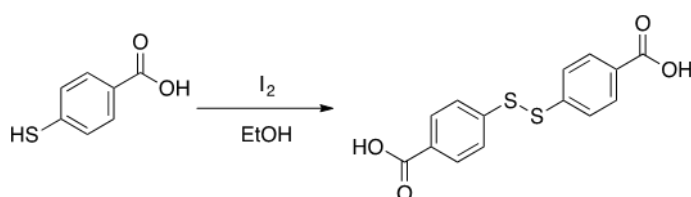
Se sintetizó como amida C-terminal (escala de 0,05 mmol usando la resina Rink Amide-ChemMatrix de Biotage: 0,46 mmol / g) en un sintetizador de péptido PS3 (Protein Technologies) siguiendo protocolos estándar de síntesis en fase sólida Fmoc. Los acoplamientos formadores de enlaces peptídicos se llevaron a cabo durante 50 minutos usando hexafluorofosfato de N, N, N', N'-tetrametil-O- (1H-benzotriazol-1-il) uronio (HBTU, 8 equiv), N, N-diisopropiletilamina (DIEA, 8,8 equiv.) en DMF (2,5 ml) y 8 equivalentes de los aminoácidos. Cada aminoácido se incubó durante 2 min en la mezcla de acoplamiento antes de ser añadido a la resina. Después de lavar con DMF, la desprotección del grupo protector Fmoc temporal se realizó tratando la resina con piperidina al 20% en solución de DMF durante 15 min.

##### 4.1.9.3.2 *Rotura y desprotección del péptido unido a resina*

El péptido unido a resina secado bajo argón (aproximadamente 0,025 mmol) se colocó en un tubo falcon de 50 ml y se suspendió en 2 ml del cóctel de escisión (100 µl de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 µl de agua, 50 µl de triisopropilsilano (TIS) y TFA a 2 ml), y la mezcla resultante se agitó durante 3 h. La resina se filtró y el filtrado de TFA

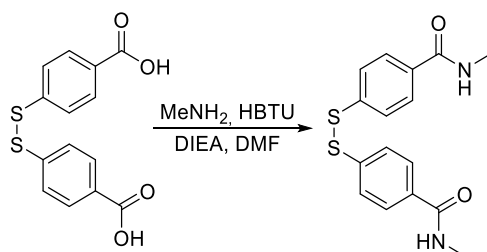
se concentró bajo una corriente de argón hasta un volumen de aproximadamente 1 ml, que después se añadió a éter dietílico enfriado con hielo (20 ml). Después de 10 min, el precipitado se centrifugó y se lavó de nuevo con 10 ml de éter enfriado con hielo. El residuo sólido se secó bajo argón, se volvió a disolver en CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O 1: 1 (1 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa semi - preparativa. Las fracciones recogidas posteriormente se liofilizaron y se almacenaron a -20°C.

#### 4.1.9.3.3 Síntesis de ácido 4,4'-disulfanodiildibenzoico



Se disolvió ácido 4 - mercaptobenzoico (20 mg, 0,13 mmol) en EtOH (1,3 ml), se añadió gota a gota una solución saturada de I<sub>2</sub> en EtOH hasta que apareció un precipitado. La solución se centrifugó y el precipitado se disolvió en DMSO. El producto se precipitó de nuevo en EtOH, se centrifugó y se secó a alto vacío. El ácido 4,4'-disulfanodiildibenzoico fue identificado como el producto deseado por ESI-MS (15 mg, 75% de rendimiento). ESI - MS [MNa + ] calculado para C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> = 329,36, encontrado = 329,0.

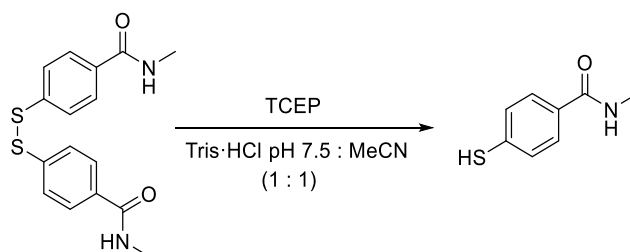
#### 4.1.9.3.4 Síntesis de 4,4' - disulfanodiilbis (N - metilbenzamida)



Se disolvieron 250 mg de ácido 4,4'-disulfanodiildibenzoico (0,82 mmol) en DMF. A continuación, se añadieron HBTU (744 mg, 1,96 mmol), DIEA (838  $\mu$ L, 4,9 mmol) y metilamina sobre la solución anterior y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de confirmar la obtención del producto deseado

por análisis HPLC-MS, se evaporó DMF a vacío. A continuación, el producto bruto de reacción se purificó directamente mediante cromatografía preparativa de fase inversa (15 - 75% de MeOH, TFA al 0,1% / H<sub>2</sub>O, TFA al 0,1%, 30 min) y las fracciones apropiadas se recogieron y liofilizaron para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco (52 mg, 0,16 mmol, 19% de rendimiento). ESI - MS [MH<sup>+</sup>] calculado para C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> = 333,07, encontrado 333,1 [MH<sup>+</sup>] +, 355,0 [MNa<sup>+</sup>] +, 665,1 [M<sub>2</sub>H<sup>+</sup>] +.

#### 4.1.9.3.5 Síntesis de 4-mercapto-N-metilbenzamida

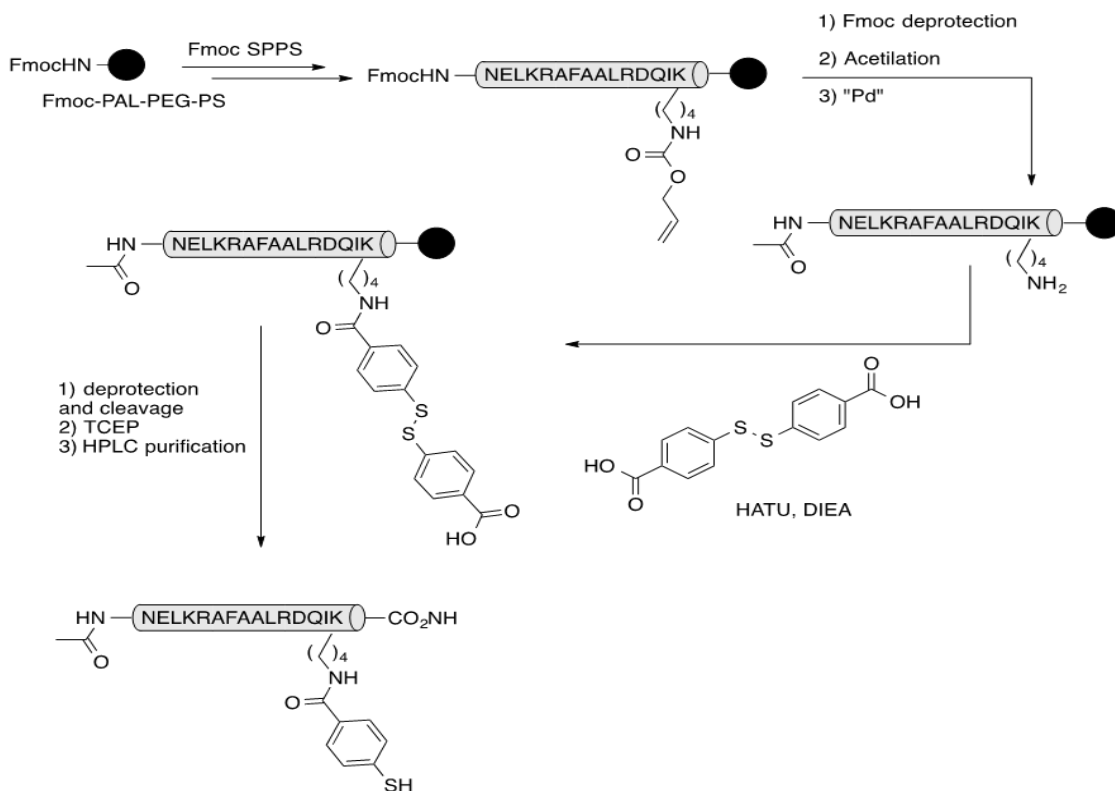


Para la síntesis de 4-mercapto-N-metilbenzamida, se disolvieron 8 mg de 4,4'-disulfanodiilbis (N-metilbenzamida) (0,024 mmol) en 1 ml de una solución 0,2 M de clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina TCEP) en Tris-HCl 20 mM pH 7,5: CH<sub>3</sub>CN (1: 1). La mezcla se agitó a ta durante 1 h. El crudo se purificó después mediante HPLC de fase inversa semi-preparativa y las fracciones apropiadas se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido blanco (3 mg, 0,018 mmol, rendimiento 75%).

#### 4.1.9.3.6 Síntesis de péptidos MB-H1

Para la síntesis del péptido conjugado con 4-mercaptobenzamida se utilizó una estrategia de Fmoc SPPS modificada con un esquema de protección de grupo extendido. El residuo de Lys se introduce como un derivado protegido con Alloc, que permite su desprotección selectiva de la cadena lateral (catálisis de Pd) y derivatización con ácido 4,4'-disulfanodiildibenzoico en la fase sólida como se muestra a continuación:





#### 4.1.9.4 Acetilación del extremo N-terminal del péptido y desprotección de la cadena lateral Lys (Alloc) protegida ortogonalmente

Una vez que el péptido se ensambló completamente en la fase sólida, el grupo Fmoc se desprotegió, y después se acetiló la amina N-terminal. Para este fin, se trataron 0,05 mmol de la resina con 3 ml de una solución de Ac<sub>2</sub>O al 20% en DMF / DIEA 0,195 M en DMF (2:1) durante 20 min. Después de la acetilación N-terminal, la cadena lateral del residuo Lys (Alloc) se desprotegió selectivamente para fijación específica.

##### 4.1.9.4.1 Síntesis y funcionalización de perlas de *sio2* @ *ag*

-Síntesis de nanopartículas de plata esféricas estabilizadas con citrato

Se produjeron nanopartículas esféricas de plata de aproximadamente 65 nm de diámetro mediante una modificación del protocolo previamente comunicado (1,2)

En resumen, 250 ml de agua Milli-Q se calentaron a reflujo bajo fuerte agitación magnética. Una vez que hierve enérgicamente, se añadió una mezcla que contenía ácido ascórbico (250  $\mu$ l, 0,1 M) y citrato trisódico (3,41 ml, 0,1 M). Después de 1 minuto, se inyectó una solución que contenía AgNO<sub>3</sub> (744  $\mu$ l, 0,1 M) y MgSO<sub>4</sub> (559  $\mu$ l, 0,1 M), previamente incubada durante 5 min a temperatura ambiente, en el recipiente de reacción bajo agitación vigorosa. Se continuó la ebullición y agitación durante 30 minutos para asegurar la reducción de los precursores. Durante este tiempo, el color de la solución cambió rápidamente de incoloro a amarillo, y gradualmente en naranja oscuro.

-Perlas de sílice revestidas con polielectrolitos

La conocida técnica capa por capa (LbL) (4) se usó para recubrir las perlas de SiO<sub>2</sub> con 3 capas alternas de PEI, PAA y PEI proporcionando una carga neta positiva sobre la superficie de la partícula. Para conseguir esto, se añadieron gota a gota 0,5 ml de una solución de perlas de SiO<sub>2</sub> (50 mg / ml) a 25 ml de una solución acuosa de PEI (2 mg / ml) previamente sonicada durante 30 min. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 h y luego se centrifugó dos veces (3190 rcf -relative centrifugal force-, 20 min) y se redispersó con agua Milli-Q para eliminar el exceso de polielectrolito (4). Se aplicó el mismo procedimiento para las otras 2 capas de poli (ácido acrílico) (PAA) e PEI, utilizando 2 mg / ml de PAA, 6 mM de NaCl y 2 mg / ml de PEI.

#### *4.1.9.4.2 Montaje de nanopartículas de plata sobre perlas de sílice.*

Los AgNPs se limpiaron por centrifugación (5400 rpm, 20 min) y se redispersaron en agua Milli-Q, hasta una [Ag<sup>0</sup>] final =  $2,3 \times 10^{-4}$  M. Este ciclo de lavado permite eliminar el exceso de citrato que dificulta parcialmente la adhesión de AgNPs sobre perlas de sílice, preservando al mismo tiempo la estabilidad coloidal global. Las perlas de sílice envueltas en polielectrolito se recubrieron con AgNPs añadiendo gota a gota, bajo sonicación, 800  $\mu$ l de la solución de perlas de sílice en un matraz que contenía una solución de AgNPs (133 ml, [Ag<sup>0</sup>] = 0,23 mM). A continuación, la mezcla se sometió a vórtex durante 30 s y se dejó en sedimentación durante la noche. Después de esto, la muestra se centrifugó 3 veces (550 rcf, 5 min) y se redispersó en 2 ml de agua Milli-Q para conseguir una concentración final de perlas de SiO<sub>2</sub> de 1 mg / ml.

#### 4.1.9.4.3 Conjugación de MB – H1 con perlas de $\text{SiO}_2@Ag$ .

Distintas soluciones 5 ml de de MB-H1 (200, 20, 2 nM, 200, 20 y 2 pM, respectivamente) en Tris-HCl 10 mM pH7,5, NaCl 100 mM fueron añadidas sobre alícuotas de 5 ml de una solución de perlas 20  $\mu\text{g}$  /  $\text{SiO}_2@Ag$  en Tris HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl a 100 mM y las mezclas resultantes se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, se calculó la concentración final de las soluciones de  $\text{SiO}_2@Ag$  de las soluciones (aproximadamente  $2,4 \times 10^4$  perlas / ml) con un hemocitómetro.

#### -Muestras para caracterización SERS

Las nanopartículas de plata (20  $\mu\text{L}$   $10^{-6}$  M en plata) fueron recubiertas por centrifugación sobre un portaobjetos de vidrio a baja concentración de partículas. Además, se agregaron en una película gotas de una solución concentrada (10  $\mu\text{L}$   $10^{-3}$  M en plata) y se secaron al aire.

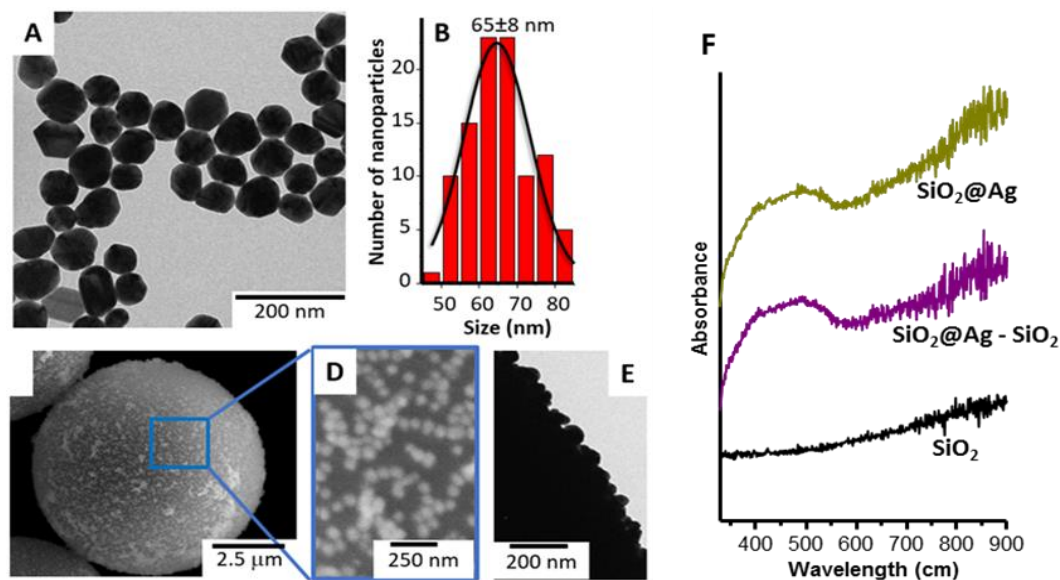


Figura 32: Preparación de las nanopartículas.

Figura S5: (A) Imagen TEM y (B) distribución de tamaños de los AgNPs según se prepararon. (C y D) SEM y (E) imágenes TEM de AgNPs recubriendo perlas de sílice de 8  $\mu\text{m}$ . (F) espectros de UV-Vis de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{SiO}_2@Ag$  (0,2 mg / ml) y el correspondiente espectro.

#### 4.1.9.4.4 Preparación de muestras celulares y humanas

##### -Cultivo de líneas celulares MCF-7

Se utilizó la línea celular de cáncer MCF-7 como un control positivo de la expresión de c-MYC. Las células MCF-7 se mantuvieron en medio EMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% e insulina humana al 0,1% y se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en una atmósfera humidificada.

##### -Muestras humanas.

Las muestras fueron proporcionadas por una paciente diagnosticada de un adenocarcinoma de ovario en estadio IV, en progresión en el momento de la donación de la muestra. La presencia de la enfermedad se confirmó histológicamente de acuerdo con normas habituales.

##### -Extracción de células mononucleares de sangre periférica.

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes sanos y se procesaron en las siguientes 24h. 8 ml de sangre de cada donante se diluyeron 1:2 con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y se dispusieron cuidadosamente en una capa de 15 ml de Ficoll-Paque Plus (de Ge Healthcare LifeSciences). Las muestras se centrifugaron durante 40 minutos a 400 g para separar las poblaciones celulares. Se recogieron las células mononucleares (PBMC) y se lavaron con 1x PBS y finalmente se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en una atmósfera humidificada.

##### -Extracción de proteínas.

Las PBMC y MCF-7 se contaron de forma similar y se recogieron en un matraz utilizando tripsina al 0,25% de EDTA y se centrifugaron a 170 g durante 5 min. Los sedimentos de células se suspendieron en 0,2 ml de tampón de lisis, conteniendo HEPES 50 mM, NaCl 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% v / v,

Triton X - 100 al 1% y 0,01 ml de cóctel inhibidor de proteasas de Sigma-Aldrich). El paso de lisis se llevó a cabo durante 1 h a 4°C, haciendo girar los tubos cada 15 min para separar las membranas celulares. Los lisados se centrifugaron a 13.000 g durante 10 min a 4 ° C y los sobrenadantes que contenían proteína se mantuvieron a -80 ° C hasta su uso.

##### *4.1.9.4.5 Cuantificación de la proteína total y c-MYC*

La concentración de proteínas de los lisados se cuantificó con el ensayo de proteína de Bradford. Los niveles de oncoproteína c-MYC humana se determinaron con un kit de ensayo inmunoabsorbente (ELISA) ligado a enzima c-MYC humano total (de LifeSciences). Las muestras se diluyeron 1:10 - 1: 100 y se incubaron durante 3 h con un anticuerpo anti-c-MYC primario, seguido de una incubación de 30 minutos con un anticuerpo marcado con HRP secundario. Se añadió sustrato de HRP durante 30 minutos y se midió la absorbancia con un lector de placas Multimode Tristar 2S. Todos los patrones y lisados se ensayaron por triplicado y las concentraciones de proteínas se extrapolaron a partir de las curvas de calibración.

##### *4.1.9.4.6 Caracterización SERS de las perlas y cuantificación de c-MYC*

Para la caracterización de SERS de las perlas recubiertas, las soluciones que contenían 2400 perlas por mililitro se funcionalizaron con cantidades decrecientes de MB-H1 (de 100 nM a 1 pM). Después de 1 h de tiempo suficiente para asegurar la reacción completa del tiol de MB-H1 con la plata, se moldeó una alícuota de cada una en un portaobjetos de vidrio. Antes del secado, las perlas se localizaron con un objetivo 5x utilizando, posteriormente, un objetivo 50x para enfocar el láser durante 1s. Para cada cuenta, se recogieron 10 mediciones. Para cada muestra se midieron 10 perlas. En particular, el tiempo se incrementó a 10 s en las muestras de 10 y 1 pM en MB-H1. Se repitió el mismo protocolo, pero disminuyendo la concentración de perlas a 240 perlas / ml. En particular, se repitió el mismo protocolo para 24 perlas / ml. Sin embargo, la dificultad de encontrar las perlas impidió su realización.

Primero, se generó una curva de calibración usando los mismos estándares que para ELISA. En resumen, se añadieron 100 µl de una solución de perlas de SiO<sub>2</sub>@Ag@MB-H1 (100 µM de MB-H1) por ml de muestra, alcanzando una

concentración final de perlas de 200 perlas / ml. Después de esperar 1 h para asegurar la interacción entre H1 y c-MYC, se colocaron alícuotas de 100  $\mu$ l de la muestra sobre un portaobjetos de vidrio. Luego, antes del secado, las perlas se localizaron con un x5 y se mapearon con el microscopio Raman, usando un objetivo x50 y una línea láser NIR. Se registraron 10 espectros de 10 segundos para cada cuenta (con un láser de potencia en la muestra de 2,5 mW). Para cada muestra, se midieron entre 10 y 15 perlas. Cada experimento se replicó tres veces. Se siguió el mismo protocolo para las muestras humanas.

#### 4.1.9.4.7 Cálculos teóricos.

Los cálculos de la teoría funcional de densidad funcional (DFT) de B3LYP se realizaron utilizando un conjunto de programas Gaussianos 09. B01 con el conjunto de bases 6-311G (p, d) (5)

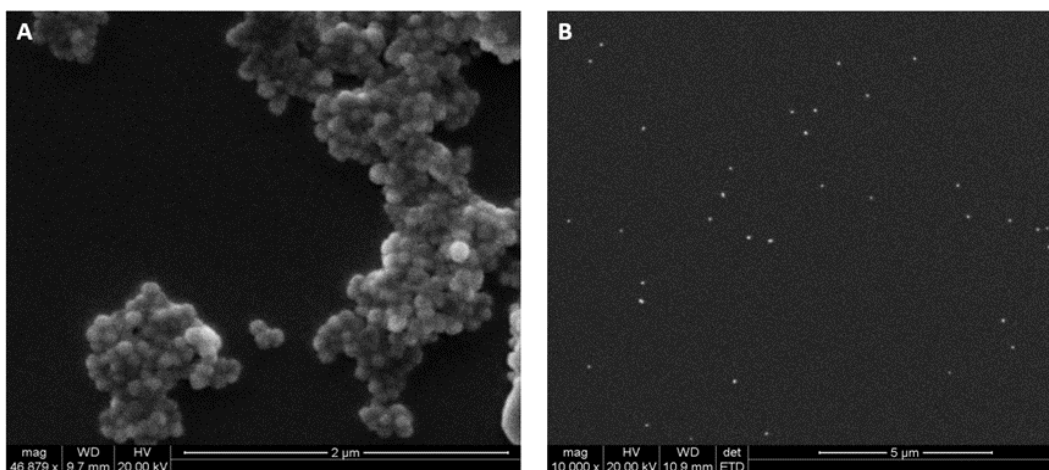


Figura 33: Imágenes SEM:

*Figura S6:* Imágenes SEM de (A) películas agregadas (fundidas y secadas al aire) y (B) no agregadas (revestidas por centrifugación) de AgNPs.

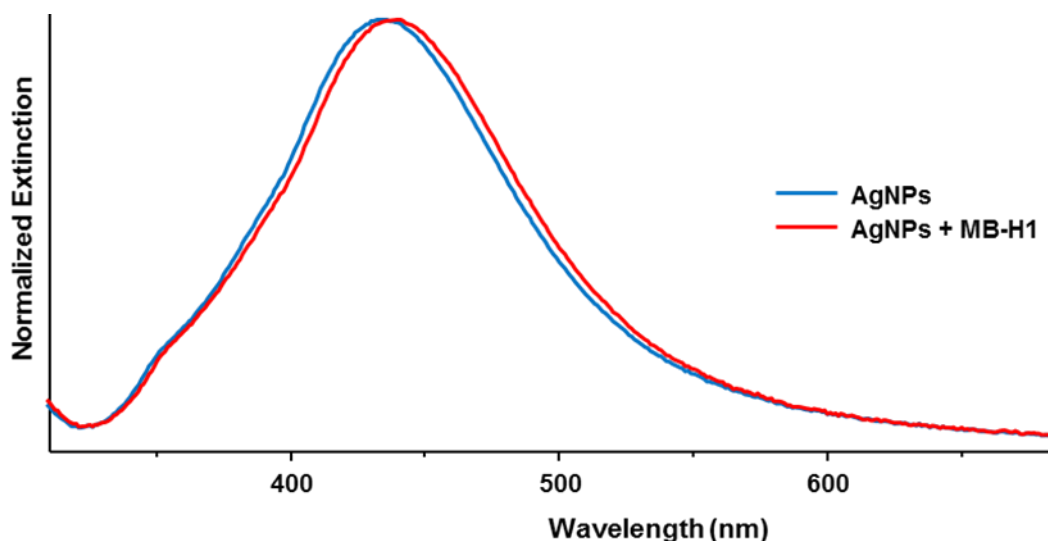


Figura 34: Espectro UV tras funcionalización.

*Figura S7:* Espectro UV-Vis de AgNPs antes y después de la funcionalización con MB-H1. Los AgNPs se centrifugaron (5400 rpm, 20 min) y se redispersaron en agua Milli-Q, hasta una concentración final de [NP] aprox. 85 pM. A continuación, se colocaron dos alícuotas de 100  $\mu$ l de coloides en diferentes Eppendorfs y se mezclaron con: (a) 3  $\mu$ l de tampón Tris (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM); (b) 3  $\mu$ l de solución MB-H1 1,57 mM en tampón Tris. Nos referimos a la primera muestra como "AgNPs" y la segunda como "AgNPs + MB-H1". El volumen de soluciones tamponadas añadidas a los coloides se mantuvo lo suficientemente bajo como para evitar la agregación de nanopartículas inducida por la sal. Se observa un desplazamiento al rojo de 6 nm del LSPR tras la funcionalización de los AgNP con el quimiorreceptor MB-H1.

## Referencias

- 1 Buder, A.; Tomuta, C.; Filipits, M. *Curr. Opin. Oncol.* 2016, 28, 130.
- 2 Ignatiadis, M.; Lee, M.; Jeffrey, S. S. *Clin. Cancer Res.* 2015, 21, 4786.
- 3 Crowley, E.; Di Nicolantonio, F.; Loupakis, F.; Bardelli, A. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013, 10, 472.
- 4 Dang, Chi V. *Cell* 2012, 149, 22.
- 5 Helm, F.; Kammertoens, T.; Lehmann, F. M.; Wilke, A.; Bruns, H.; Mautner, J.; Bornkamm, G. W.; Gerbitz, A. *PLoS ONE* 2013, 8, e77375.

- 6 Nie, Z.; Hu, G.; Wei, G.; Cui, K.; Yamane, A.; Resch, W.; Wang, R.; Green, Douglas R.; Tessarollo, L.; Casellas, R.; Zhao, K.; Levens, D. *Cell* 2012, 151, 68.
- 7 Schlücker, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 4756.
- 8 Alvarez-Puebla, R. A.; Agarwal, A.; Manna, P.; Khanal, B. P.; Aldeanueva-Potel, P.; Carbó-Argibay, E.; Pazos-Pérez, N.; Vigderman, L.; Zubarev, E. R.; Kotov, N. A.; Liz-Marzán, L. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8157.
- 9 Habuchi, S.; Cotlet, M.; Gronheid, R.; Dirix, G.; Michiels, J.; Vanderleyden, J.; De Schryver, F. C.; Hofkens, J. J. *Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8446.
- 10 Singhal, K.; Kalkan, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 429.
- 11 aLin, L.; Tian, X.; Hong, S.; Dai, P.; You, Q.; Wang, R.; Feng, L.; Xie, C.; Tian, Z.-Q.; Chen, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 7266; bFeng, M.; Tachikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 7443.
- 12 Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 43.
- 13 Guerrini, L.; Arenal, R.; Mannini, B.; Chiti, F.; Pini, R.; Matteini, P.; Alvarez-Puebla, R. A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 9420.
- 14 aGuerrini, L.; Pazos, E.; Penas, C.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L.; Alvarez-Puebla, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 10314; bLiu, S.; Zhang, X.; Luo, W.; Wang, Z.; Guo, X.; Steigerwald, M. L.; Fang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 2496; cWang, Y.; Lee, K.; Irudayaraj, J. *Chem. Comm.* 2010, 46, 613.
- 15 aDraeger, L. J.; Mullen, G. P. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 1785; bBidwell, G. L.; Raucher, D. *Mol. Cancer Ther.* 2005, 4, 1076.
- 16 Decher, G. *Science* 1997, 277, 1232.
- 17 aMoskovits, M.; Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 5526; bMoskovits, M.; Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* 1988, 92, 6327.
- 18 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson,



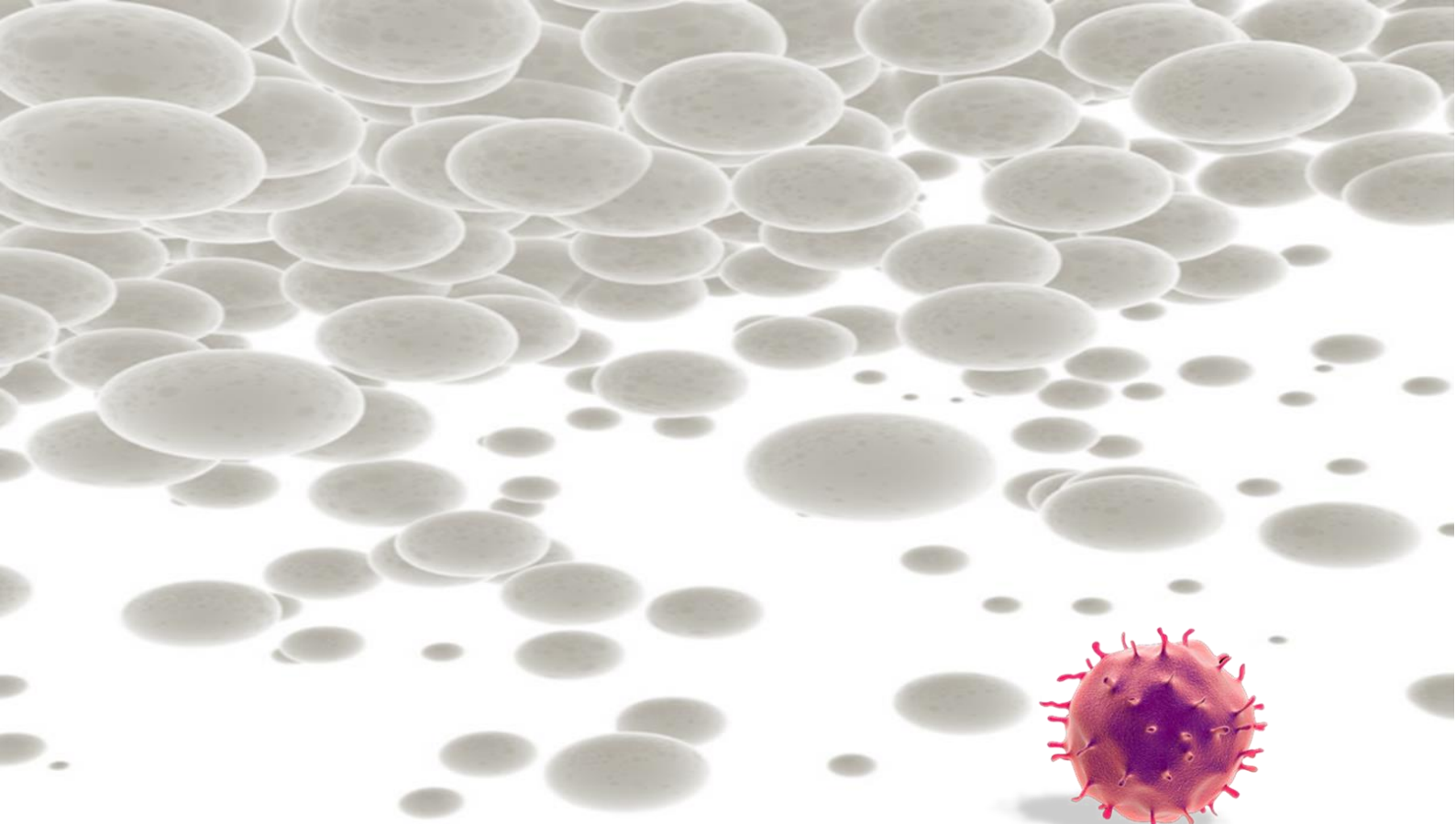
G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Wallingford CT, 2009.

- 19 Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y.; Eilers, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9389.
- 20 Chang, S.-C.; Chao, I.; Tao, Y.-T. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 6792.
- 21 Ataka, K.-i.; Yotsuyanagi, T.; Osawa, M. *J. Chem. Phys.* 1996, 100, 10664.
- 22 Allara, D. L.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* 1985, 1, 52.

#### Referencias de la Información Suplementaria

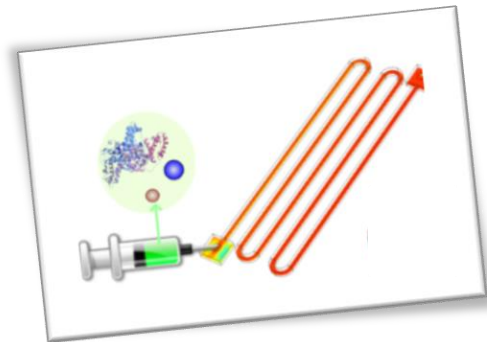
- 1 Mir-Simon, B.; Morla-Folch, J.; Gisbert-Quilis, P.; Pazos-Perez, N.; Xie, H.-n.; Bastus, N. G.; Puentes, V.; Alvarez-Puebla, R. A.; Guerrini, L. *J. Opt.* 2015, 17.
- 2 Mir-Simon, B.; Reche-Perez, I.; Guerrini, L.; Pazos-Perez, N.; Alvarez-Puebla, R. A. *Chem. Mat.* 2015, 27, 950.
- 3 Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. *Analyst* 2014, 139, 4855.
- 4 Decher, G. *Science* 1997, 277, 1232.
- 5 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.;

Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Wallingford CT, 2009.



## 5 ESTUDIO III

BIOPSIA LÍQUIDA DE CÉLULAS: OPTOFLUÍDICA



5.1 Dispositivo Optofluídico para la  
Cuantificación de Células  
Tumorales Circulantes en Cáncer  
de Mama

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

TÉCNICAS

OBJETIVOS

RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

INFORMACIÓN  
SUPLEMENTARIA

REFERENCIAS

### 5.1.1 Resumen

Los pacientes con cáncer metastásico requieren una monitorización continua durante los tratamientos, dado que el índice terapéutico de estos es muy bajo (es decir, la relación entre el beneficio y la toxicidad es muy estrecha). Por ello, cuanto antes conozcamos una posible resistencia, antes se modificará la estrategia terapéutica. El ajuste del tratamiento a la medicación depende del conocimiento preciso del estado de la enfermedad. Es sabido que en la evolución de los tumores aparece una gran heterogeneidad celular, tanto fenotípica como genética (inestabilidad genética y aparición de mutaciones). Por otro lado, en los tratamientos neoadyuvantes, por ejemplo, en cáncer de mama o cáncer de pulmón, se sabe que aun lográndose respuestas completas patológicas hay pacientes que recaen y otros no. El definir al terminar el tratamiento dicho grado de respuesta nos permite tener un criterio pronóstico para la toma de decisiones. En los tratamientos adyuvantes la situación es similar. La detección, cuantificación y caracterización de las denominadas células tumorales circulantes (CTCs) puede cumplir todos estos objetivos, además de facilitar un diagnóstico precoz de las recaídas o cambios moleculares, tanto genéticos como fenotípicos, que de otra forma son indetectables o cuya detección requiere procedimientos invasivos. Finalmente, hay algunos tipos de cáncer cuya localización primaria los hace muchas veces inaccesibles. Es el caso del carcinoma microcítico y no microcítico de pulmón. Muchas veces las biopsias, cuando son posibles, son tan escasas que no permiten realizar los estudios de biología molecular que requiere el tratamiento de esta enfermedad (mutaciones en EGFR, translocación ALK-EML4), Estas pueden aparecer en el curso de la evolución. La repetición de biopsias es muy invasiva y no siempre factible. En este trabajo, se diseña y demuestra la efectividad de un dispositivo microfluídico capaz de focalizar un microflujo en 3D, y en el cual todas las ópticas están integradas en el chip, permitiendo la cuantificación de fluorescencia de CTCs en muestras reales, con una implementación técnica que permite su uso en una consulta u hospital de día. Para probar el rendimiento del chip, se seleccionaron dos objetivos de membrana celular; la molécula de adhesión de células epiteliales, EpCAM, y el receptor tirosina-quinasa, HER2/neu (EGFR2). La eficacia de la plataforma se demuestra en líneas celulares y en una variedad de donantes sanos y pacientes con

cáncer de mama metastásico: los resultados se comparan con los de las herramientas de diagnóstico convencionales y la citometría de flujo.

### 5.1.2 Introducción: biopsia líquida de Células Tumorales Circulantes (CTCs)

El pronóstico y la evaluación del tratamiento del cáncer de mama se establecen en el momento del diagnóstico mediante el estudio anátomo-patológico, inmunohistoquímica y biología molecular después de practicarse una biopsia, generalmente con aguja gruesa (BAG) o extracción de muestras quirúrgicas. Sin embargo, en el cáncer metastásico (estadios IV), el conocimiento del estado de salud actual del paciente en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad es crucial para la eficacia del tratamiento (1,2). Las biopsias sólidas de metástasis no pueden considerarse una herramienta de monitorización, ya que son altamente invasivas. Por lo tanto, la evaluación de la progresión de la enfermedad se logra con frecuencia únicamente mediante técnicas de imagen (resonancia magnética, tomografía computarizada –TC- y tomografía por emisión de positrones –PET-) y los denominados marcadores tumorales serológicos. Estos últimos son muy poco sensibles y específicos. En este escenario, la posibilidad de monitorizar la evolución maligna mediante extracción sanguínea simple y poco invasiva con un dispositivo de bajo costo podría permitir el concepto de atención oncológica en el punto de asistencia (*point of care*), donde todos los pacientes pueden ser adecuadamente seleccionados en un momento oportuno, a bajo costo y sin depender de un centro de referencia. Cabe destacar que las células tumorales circulantes (CTC) se han vinculado a aspectos clave de la detección precoz, el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización del cáncer (3). En los últimos años, se han propuesto varios métodos para la detección de CTC en sangre (es decir, biopsia líquida), mostrando valores diagnósticos y de pronóstico variables (4,5).

### 5.1.3 Técnicas

#### 5.1.3.1 No microfluídicas

Actualmente, la mayoría de estos métodos se basan en el uso de los anticuerpos de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) para capturar los CTC y su posterior caracterización con inmuno-tinción o mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa de transcritos específicos del tipo tumoral estudiado (RT-PCR) (6-9). Otros métodos emplean las diferencias intrínsecas en forma, tamaño y / o densidad de las células tumorales en comparación con las células circulantes normales para recolectar y después enumerar las CTC, usando filtros (10, 11), superficies activadas (12-14) o partículas (11, 14 -16). En cuanto a la identificación directa de CTCs en la muestra sin enriquecimiento celular, se han propuesto varias alternativas basadas principalmente en cartometría de flujo (17), en fluorescencia (18) o en ultrasonidos (19,20). Sin embargo, estos enfoques requieren costosas técnicas instrumentales que dificultan la aplicación generalizada en la práctica clínica diaria en un centro convencional de atención oncológica.

#### 5.1.3.2 Microfluídicas

El concepto “microfluidico” incluye un conjunto de distintas herramientas que comprenden métodos para la manipulación precisa de fluidos a pequeñas escalas de longitud ( $\mu\text{m}$  a  $\text{mm}$ ). Ciertas propiedades de las tecnologías microfluídicas, como el procesamiento rápido de muestras y el control preciso de los fluidos en el proceso, han convertido estos dispositivos en candidatos atractivos para reemplazar los enfoques experimentales tradicionales en la investigación médica y biológica, así como en el diagnóstico (21). La microfluídica aporta una perspectiva completamente nueva y una excelente manera práctica de manipular células (22-24). Los dispositivos de microchip pueden prepararse fácilmente, utilizando herramientas estándar de microfabricación, lo que reduce el coste y simplifica la comercialización. Además, las plataformas microfluídicas pueden ser fácilmente integradas con técnicas ópticas (25), incluyendo los procedimientos elásticos (26)

e inelásticos (27,28), los que bloquean la luz (22) o los métodos fluorescentes (21). Esta tecnología permite que los dispositivos sean portátiles y sencillos, operativos en ambientes ambulatorios o al lado del paciente, sin la necesidad de grandes equipos y / o personal especializado específico.

### 5.1.4 Objetivos

En este trabajo pretende diseñar un dispositivo de microfluidos de flujo 3D, donde todas las ópticas están integradas en el chip, para la cuantificación de fluorescencia de CTCs en muestras reales.

Probar su efectividad mediante un diseño diagnóstico específico para cáncer de mama

### 5.1.5 Resultados y discusión

La molécula de adhesión de células epiteliales, EpCAM (29), y el receptor de membrana tirosina- quinasa HER2/neu (30), se seleccionaron como dianas de membrana celular para reconocer células tumorales de cáncer de mama HER2 positivo (31-33). El cáncer de mama representa hasta el 30% del total de cánceres. Entre estos, el 20% expresan HER2 al diagnóstico (aparece amplificado). Aunque parece que este estatus al diagnóstico puede cambiar en el curso de la enfermedad, es decir, pasar de HER2 negativo a HER2 positivo. Además, su diagnóstico correcto es esencial 30, ya que diferentes características biológicas de la enfermedad requieren tratamientos específicos y diferenciados basados en anticuerpos monoclonales o inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) dirigidos al receptor HER2 o su vía de transducción de señales (trastuzumab, pertuzumab, TDM1 o lapatinib) (34-37). Teniendo en cuenta que para dicho tipo de tumores hay un tratamiento específico, es esencial conocer si se produce dicho cambio, ya que podríamos estar privando a las pacientes de un tratamiento efectivo.

La efectividad de la plataforma optofluídica aquí propuesta se demostró en líneas celulares, así como para una variedad de donantes sanos y pacientes con cáncer de mama metastásico. Los resultados se compararon con los de las herramientas de diagnóstico convencionales y con los obtenidos por citometría de flujo.

#### 5.1.5.1 Chip optofluídico

El chip microfluídico (Figura 1A) comprende un canal de enfoque de flujo 3D para la alineación de células individuales y varias fibras ópticas integradas para excitación y recolección. La muestra se inyecta en uno de los canales mientras, simultáneamente, se bombea un flujo de vaina a través de canales adyacentes. La vaina y los flujos de muestra no se mezclan, sino que limitan la muestra a la región central del canal (Figura 1B) debido a las escalas de tiempo bajas y la magnitud de la tasa de difusión implicada en un experimento típico. Dos zonas de interrogación, colocadas con una separación de 1 mm, se implementan en el chip. Cada una de ellas comprende:

- una fibra de bombeo (473 nm), que está orientada perpendicularmente al canal microfluídico y enfocada en la muestra restringida, y
- una fibra de captura de fluorescencia (para capturar la emisión de fluorescencia roja o verde).

Las fibras de recogida están orientadas a un ángulo de 45° C con respecto a la fuente de excitación para evitar la recogida de la luz de la fuente de bombeo. Las fibras de modo único se seleccionan para la excitación de 473 nm, para producir un volumen de interrogación del orden del tamaño de las células (Figura 1C). La recolección de la emisión de fluorescencia se realiza mediante dos fibras ópticas multimodo de apertura 62,5 μm de alta apertura numérica (NA = 0,275), tanto para la fluorescencia roja como la verde. Esto permite obtener una señal de fluorescencia ininterrumpida de las células a medida que fluyen a través de la longitud del volumen de bombeo. Cabe señalar que pueden añadirse más canales de excitación y detección fácilmente a lo largo de toda la longitud del dispositivo microfluídico.



## 5.1.5.2 Registro de la señal de fluorescencia y emparejamiento de picos.

Para probar el rendimiento del dispositivo se seleccionaron dos líneas celulares:

- AU-565, HER2 positivo / EpCAM positivo, y
- RAMOS, HER2 negativo / EpCAM negativo.

Por consiguiente, para identificar las células positivas se emplearon anticuerpos anti-HER2 y anti-EpCAM, marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y peridina-clorofilproteína cianina-5.5 (PerCP/Cy5.5), respectivamente. Estos “reporters” fluorescentes fueron elegidos en base a sus propiedades de absorción en el rango espectral azul (Figura 36D), que encajan perfectamente con la longitud de onda de excitación de fibras ópticas (473 nm) y sus bandas de emisión están bien separadas en el rango visible (verde, 532 nm, Para FICT, y rojo, 676 nm, para PerCP / Cy5.5). Microscopía confocal de barrido láser (Figura 36E) confirma la tinción eficiente de AU-565 células, donde HER2-FITC se presenta en verde y EpCAM-PerCP/Cy5.5 en rojo. La capacidad del chip optofluídico para detectar células teñidas con fluorescencia, incluso a baja concentración, se ensayó inicialmente en muestras que consistían en AU-565 (+) mezclado con células RAMOS (-) en diferentes proporciones (1: 1, 1:10, 1:100 y 1:1000 positivo: negativo). Para la comparación con el estándar se llevó a cabo la citometría de flujo en paralelo en las mismas muestras. La Figura 2A muestra un registro corto de las señales de fluorescencia obtenidas para una muestra con relación de células positivas 1:10 negativas. Las señales rojas corresponden a los marcadores epiteliales de superficie celular (EpCAM) mientras que el verde se asigna al HER2. La figura muestra la intensidad normalizada de ambas señales fluorescentes. Sin embargo, vale la pena señalar que la emisión verde es mayor que la roja debido al mayor rendimiento cuántico de FICT en comparación con PerCP / Cy5.5. En particular, la Figura 2A muestra tres tipos de eventos positivos:

- único verde,
- único rojo
- doble verde + rojo.

Debido a la falta de correlación entre los eventos aparentemente aleatorios, el reconocimiento efectivo de las células AU-565 debería estar asociado sólo con la

redundancia de señal (es decir, eventos positivos simultáneos verdes y rojos (Figura 2B), ya que ambas zonas de interrogación son copias exactas.

Desde el punto de vista experimental, los dos eventos fluorescentes positivos pueden asociarse a la misma célula, controlando el desplazamiento de tiempo entre los canales rojo y verde a través de mediciones de correlación (Figura 2C). Específicamente, tras la adquisición de una señal verde positiva, se seleccionan los picos rojos más cercanos y se compara su tiempo transcurrido. Si la distancia temporal entre ambos picos encaja con el desplazamiento temporal adecuado correspondiente al tiempo de recorrido de las células que fluyen entre las dos áreas de detección, los dos eventos fluorescentes se consideran correlacionados. Posteriormente, los resultados para una muestra dada pueden representarse como una función de las respectivas intensidades verde y roja. Las Figuras 2 D y E muestran los resultados obtenidos midiendo una muestra de relación celular positiva 1: 1000 (positivo: negativo) con el chip optofluídico y con el citómetro de flujo,

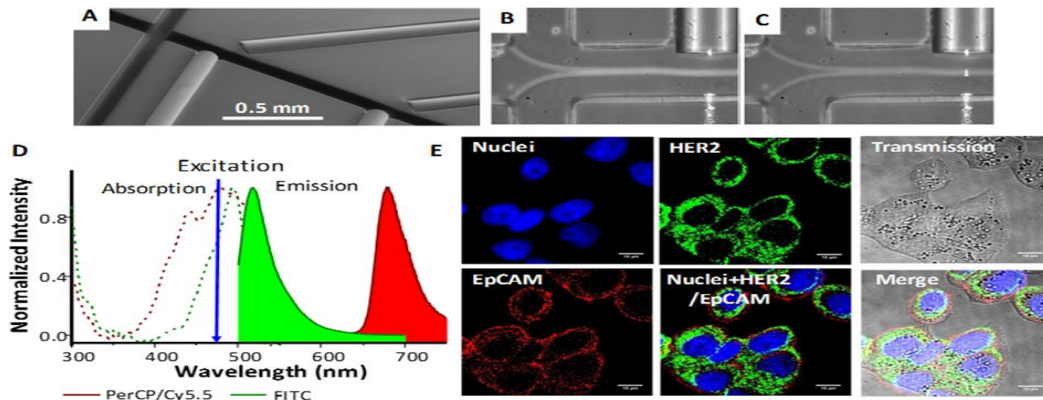


Figura 35: Chip Optofluídico.

*Figura 1:* (A) Imagen SEM del chip optofluídico. (B y C) Confinamiento de la muestra en la región central del canal. Una trayectoria de luz azul (C) es visible solamente cuando una célula intersecciona la viga de bombeo. Propiedades de absorción y emisión de los colorantes utilizados para etiquetar los anticuerpos y su rendimiento en la membrana celular. (D) Absorción y perfiles de emisión de anticuerpos anti-HER2-FITC (verde) y anti-EpCAM-PerCP / Cy5.5 (rojo). (E) Imágenes de microscopía confocal de barrido láser de células AU-565 teñidas con anticuerpos conjugados anti-HER2-FITC (verde) y anticuerpos conjugados con EpCAM-PerCP / Cy5.5 (rojo). Los núcleos se teñieron con DAPI (azul). Barra de escala 10 μm.

respectivamente. La citometría de flujo revela un recuento de 43 células AU-565 (que expresan receptores EpCAM y HER2) y 21163 células totales, evidenciando una relación de 2,04: 1000 (se pueden atribuir errores experimentales a pequeñas desviaciones de los valores teóricos). Por otro lado, al detectar con el chip

optofluídico, se identificaron 54 células malignas y 22765 células normales. Esto corresponde a una relación de 2,37: 1000, que está en buen acuerdo con los resultados observados para la citometría estándar. Cabe señalar que el dispositivo optofluídico produce un número considerablemente mayor de eventos verdes que la citometría de flujo, ya que, con un bombeo de 473 nm, la auto-fluorescencia celular inespecífica, que tiene lugar principalmente en la parte verde del espectro, se superpone con la emisión de fluorescencia de las células marcadas con FITC. Para el resto de las muestras medidas se observó una similar correspondencia, validando así (Figura 2F y complementario de la Figura S1), la utilización del método para su aplicación en muestras reales.

### 5.1.5.3 PACIENTES Y MUESTRAS REALES

La presencia de CTCs en muestras de sangre reales se evaluó procesando y analizando la sangre de los diferentes donantes sanos y de las pacientes con cáncer de mama. Entre enero y septiembre de 2016, se incluyeron 3 donantes sanos y 5 pacientes. Todas las pacientes fueron diagnosticadas de cáncer de mama metastásico, con tumores secundarios en diferentes localizaciones anatómicas. Sus características clínicas y evolución del cáncer en el momento de la extracción de sangre se resumen en la Tabla 6. En la Figura 3 se incluyen las tomografías computarizadas (TC) de las pacientes en el momento de la extracción de sangre. La paciente 2 se encontraba en remisión completa en el momento de la extracción. Los datos personales y clínicos se registraron según los procedimientos clínicos estándar. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité local de Ética e Investigación de Medicamentos.

Tabla 7: Características clínicas y estado de progresión del cáncer en el momento de la extracción de sangre.

Paciente	Edad /Sexo	ER/PR	Metástasis	Estado
CP1	68/F	Positivo	Visceral	Estable
CP2	41/F	Negativo	Ósea	Remisión Completa
CP3	59/F	Positivo	Linfática	Progresión
CP4	44/F	Negativo	Visceral	Progresión
CP5	49/F	Positivo	Ósea	Progresión

F, Femenino; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

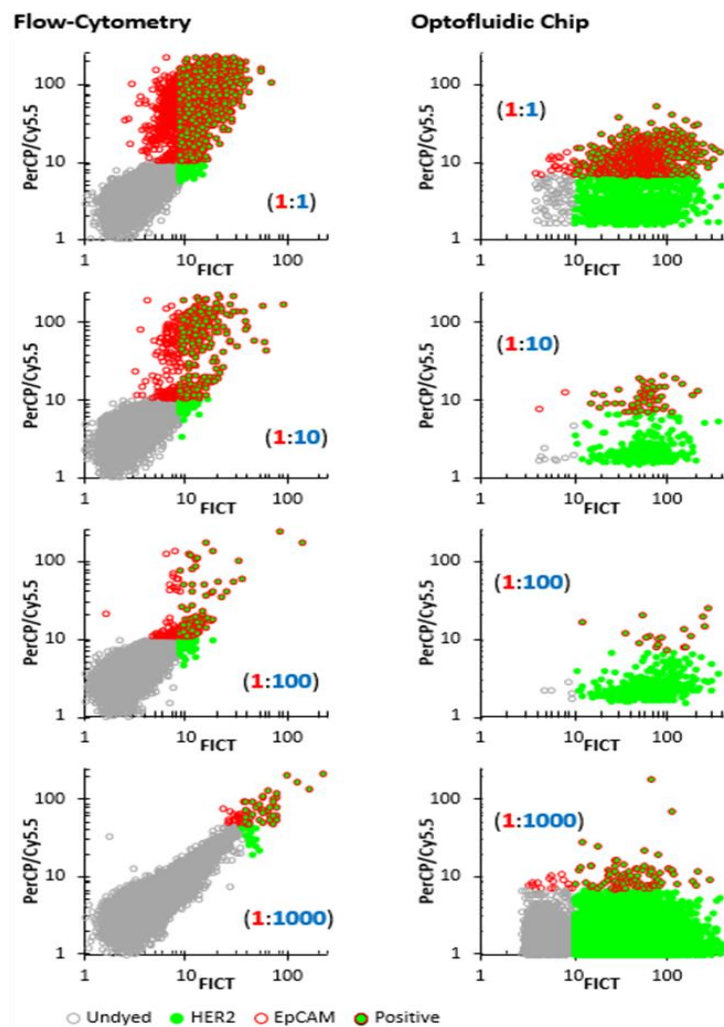


Figura 36: Citometría de flujo.

Figura S1: Resultados obtenidos con el citómetro de flujo y el chip optofluídico para relaciones celulares de 1: 1, 1:10, 1: 100 y 1: 1000 Au-565: RAMOS.

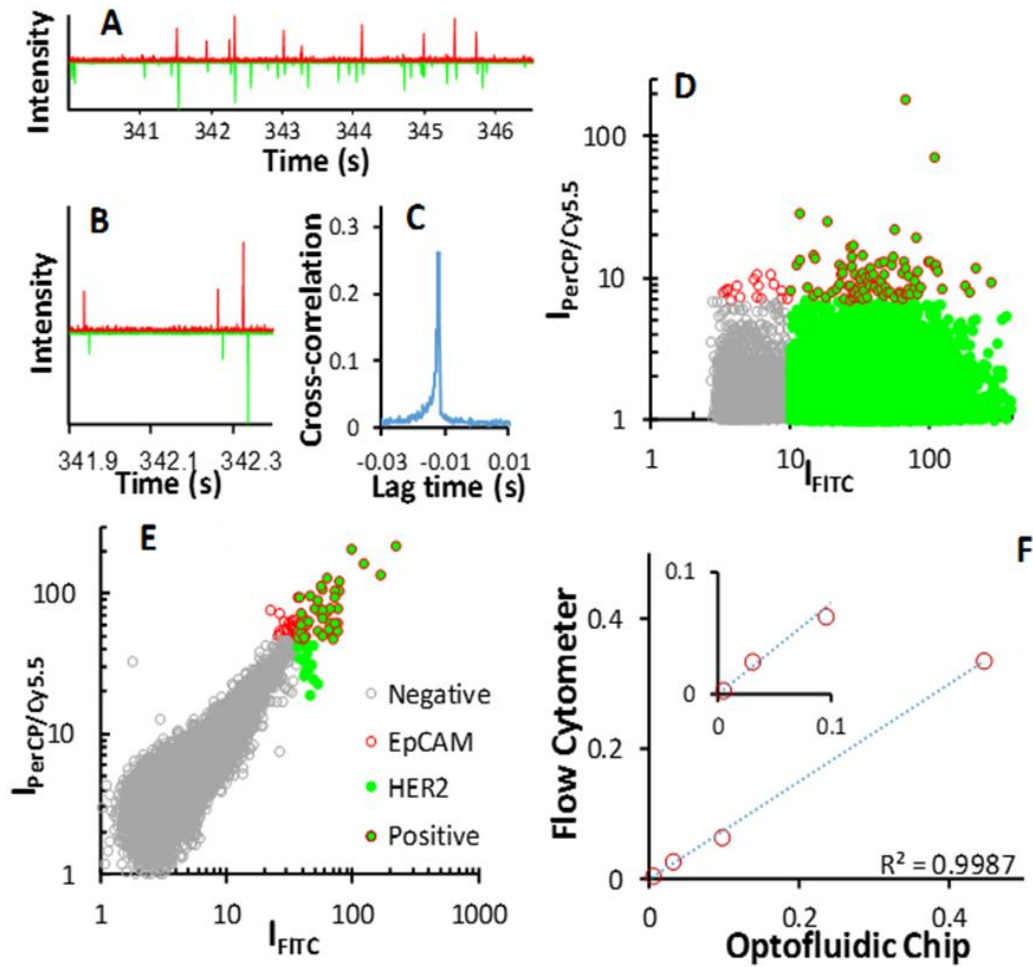


Figura 37: Señal en el dispositivo optofluídico.

Figura 2: Adquisición de señal en el chip optofluídico. (A) Registro corto de las señales de fluorescencia obtenidas para la muestra 1:10. (B) Correlación cruzada de las señales de fluorescencia verde y roja. (C) Retardo ( $\Delta t = -0.0119$  s) entre las señales de lectura y la de verde. Resultados obtenidos con el chip optofluídico (D) y citómetro de flujo (E) para una muestra que contiene 1 AU-565 (HER2 + / EpCAM +) por 1000 células RAMOS (HER2- / EpCAM-). (F) Comparación entre el chip optofluídico y las relaciones de células de citometría de flujo de 1: 1, 1:10, 1: 100 y 1: 1000 Au-565: RAMOS.

Para reducir el volumen inicial de las muestras (8 ml), sólo se recogieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se tiñeron y se sometieron a citometría de flujo y al chip optofluídico. Se comenzó con el procesamiento de la sangre de donantes sanos, sin CTCs, para establecer un umbral que identificara el nivel intrínseco de eventos positivos atribuidos a las PBMC normales (Figura 3A y S2). Contrariamente a lo observado para las líneas celulares tumorales, no se observaron eventos espurios EpCAM positivos ni por citometría de flujo ni por el chip optofluídico. Por otra parte, el número de eventos positivos HER2 fue notablemente mayor. En el caso del citómetro de flujo, este aumento en el número

de positivos de HER2 puede atribuirse a la interacción cruzada (aunque baja) de los anticuerpos anti-HER2 con la molécula de membrana FcγRI (CD64, receptor de anticuerpos de los neutrófilos) en la población de NK / granulocitos (38). En el chip optofluídico, este fenómeno biológico se combina, además, con la autofluorescencia celular de fondo que se registra en el canal verde. Una vez definidos los umbrales asociados con eventos positivos, tanto para los marcadores verdes (antiHER2) como para los rojos (antiEpCAM), se realizaron citometrías de flujo y mediciones optofluídicas en muestras de sangre de pacientes con cáncer (Figura 3B y S2).

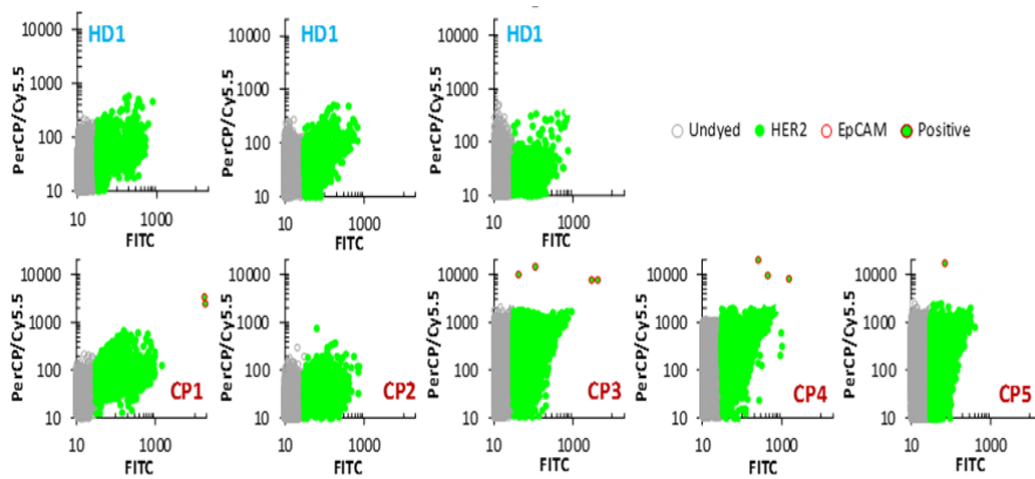


Figura 38: Resultados en pacientes.

*Figura S2:* Resultados obtenidos con el citómetro de flujo para las muestras de sangre de donantes sanos y pacientes con cáncer.

Las células tumorales circulantes se cuantificaron en cantidades similares, con ambos métodos, para cuatro de los cinco pacientes, aunque uno no presentó ninguna (CP2). Estos datos se correlacionan bien con los obtenidos con la situación clínica de cada paciente en el momento de la extracción de la muestra (carga tumoral estimada) (Tabla 6 y Figura 3D). En primer lugar, las muestras que definen bajos recuentos de CTC (CP1 y CP5) presentaban metástasis pulmonares estables (CP1) y derrame pleural maligno asociado a masa mediastínica (CP5), que presentaba respuesta actual tras cuatro ciclos de tratamiento específico. Por el contrario, CP4 presentaba una metástasis osteoblástica en progresión actual, mientras que la paciente con un mayor número de CTC (CP3) había sido recientemente



diagnosticada de progresión iniciando tratamiento en el momento de la extracción. En destacable la ausencia de células tumorales circulantes en la sangre de CP2, que en ese momento estaba en remisión completa (metástasis en la vértebra cervical C6, además de metástasis viscerales). Un dato que llama la atención es que los pacientes que están en progresión (CP3, CP4 y CP5) tienen patrones HER2 similares y bien definidos que difieren claramente de los donantes sanos, los que están en remisión completa (CP4) muestra un patrón similar a los sanos y, finalmente, los pacientes estables (CP1) presentan un patrón intermedio. Dada la evidencia de que las células tumorales circulantes pueden presentar una transición epitelial-mesenquimal (EMT), es factible que células EpCAM negativas sean, sin embargo, tumorales. Para establecer esto, habría que utilizar más marcadores, incluyendo marcadores mesenquimales (39).

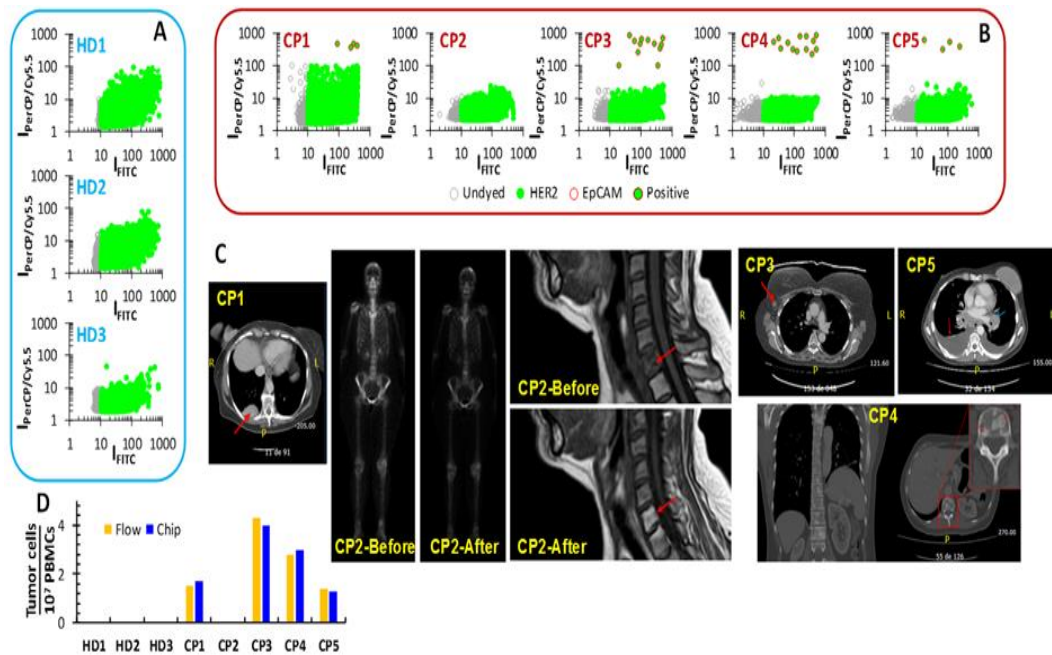


Figura 39: Resultados optofluídicos y características de los pacientes.

Figura 3: Resultados optofluídicos para muestras de sangre y tomografía computarizada de pacientes con cáncer en el momento de la extracción de sangre. (A) 3 donantes sanos y (B) 5 pacientes con cáncer. (C) Tomografías computarizadas de los pacientes con cáncer en el momento de la extracción de sangre. CP1, metástasis pulmonar (flecha roja). CP2, gammagrafía ósea y RM antes (con metástasis lítica en C6) y en el momento de la extracción sanguínea (remisión completa). CP3, recientemente diagnosticada y no tratada, pero con adenopatía metastásica (flecha roja). CP4, metástasis osteoblástica vertebral que muestra la progresión ósea actual de la enfermedad (flecha roja). CP5, derrame pleural maligno (flecha roja) y masa mediastínica (flecha azul). En el momento del estudio, el CP5 había recibido cuatro ciclos de tratamiento específico. (D) Comparación de los resultados de las muestras de sangre entre la citometría de flujo y el dispositivo optofluídico.

### 5.1.6 Conclusiones

Se ha diseñado y fabricado un chip optofluídico hidrodinámico de bajo costo, con todas las ópticas integradas, con el fin de realizar biopsias líquidas. Este chip puede confinar muestras de tal modo que permite detectar células individuales, proporcionando, por lo tanto, una herramienta eficaz para cuantificar el número de CTC en una muestra líquida dada. Para evaluar el sistema, se seleccionó el cáncer de mama HER2 positivo, un tumor ampliamente extendido y agresivo que requiere monitorización especial. El sistema fue diseñado con dos detectores para identificar de forma redundante CTC positivos, mediante la identificación simultánea de señal perteneciente a dos receptores de membrana, HER2 y EpCAM.

Los resultados obtenidos en muestras de sangre real de pacientes con cáncer de mama HER2+ y estadios IV, con diferentes cargas metastásicas y/o progresión, muestran que el dispositivo optofluídico puede correlacionarse con dicha carga tumoral. Al mismo tiempo, los resultados se correlacionan bien con los obtenidos mediante citometría de flujo, así como con los datos clínicos convencionales de imagen y serológicos. Junto con otros procedimientos de “nueva generación” (basados en MALDI-TOF, lateral-flow, o PCR), los resultados que aquí se presentan son una “prueba de concepto”, que tiene como objetivo construir una plataforma para la identificación temprana y la monitorización de células tumorales circulantes y, secundariamente, la enfermedad oncológica. Esta plataforma de detección puede extenderse fácilmente a la investigación de otros tumores, empleando diferentes anticuerpos selectivos. Por último, con una población creciente en riesgo de desarrollar cáncer, este es un método altamente sensible, no quirúrgico, no radiactivo y utilizable en el punto de asistencia clínica (por su portabilidad), que puede sustituir en el futuro a otras herramientas más complejas y de uso centralizado.



## 5.1.7 Información suplementaria

### 5.1.7.1 Fabricación de chips microfluídicos PDMS

Se utilizaron obleas de Si de 3" como sustrato para producir las estructuras SU8 (SU8-2150, MicroChem Corp). Antes del revestimiento por centrifugado SU8, la oblea de Si se deshidrató completamente en una placa caliente a 200°C durante dos horas. Después se aplicó un promotor de adhesión (OmniCoat, MicroChem Corp.) sobre la superficie desnuda de Si y luego se horneó en una placa caliente a 200°C durante un minuto. La oblea se mantuvo a 100°C sobre una placa caliente para evitar cualquier hidratación del sustrato. Las guías SU8 se fabricaron empleando una técnica estándar ampliamente utilizada en el manejo de PDMS (polidimetilsiloxano). El patrón microfluídico de las virutas se grabó utilizando una litografía láser UV de resolución submicrónica (DWL 66fs de Heidelberg Instruments) sobre una fotomáscara de cromo de 4 pulgadas. Para la elaboración de un solo chip se construyeron dos moldes, uno que contenía las estructuras para la base del chip, canales microfluídicos y ranuras para las fibras ópticas, y otra de la cual se moldearon los canales de la tapa, dedicados al enfoque vertical del flujo de muestra. La anchura de las ranuras de las fibras ópticas se estableció durante la elaboración de la fotomáscara a 120  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$  por debajo del diámetro) para asegurar un agarre adecuado entre el revestimiento de la fibra y el PDMS. Se puso cuidado durante la construcción de la fotomáscara, de modo que, tras la realización de la guía SU8, los canales que contenían las fibras de bombeo y las fibras de recogida se alinearán de tal manera que el eje de las fibras se intersecara exactamente en el centro del canal microfluídico una vez que estuvieran colocados. Se dispensaron 2 ml de SU8 sobre una oblea de Si de 3 pulgadas deshidratada y después se centrifugó a 2800 RPM durante 40 segundos con una rampa de 500 RPM / s. Estos parámetros permitieron obtener un espesor SU8 de aproximadamente 120-130  $\mu\text{m}$ , el requerido para evitar que las fibras sobresalgan de la ranura PDMS. La oblea con la capa SU8 se endureció después durante 1 h a 100°C. Una vez que se terminó la cocción suave y el disolvente de la SU8 se evaporó completamente, se llevó a cabo una retirada de los bordes (EBD –edge bead removal-) de la capa revestida por centrifugación SU8. Este proceso permite que la fotomáscara esté en

contacto cercano con la superficie expuesta al SU8 al horno durante la exposición a UV, minimizando los efectos de difracción de luz UV en los contornos de máscara modelados. La exposición UV del SU8 se realizó con una lámpara de descarga de mercurio con un montaje de alineador de máscara (MG 1410, Karl Suss). Se encontró que el tiempo de exposición óptimo era de 4,5 segundos para una potencia de densidad de  $124 \text{ mW} / \text{cm}^2$  y para una longitud de onda de referencia de 405 nm. Después de que el SU8 es expuesto, se sigue una cocción a  $65^\circ\text{C}$  durante 5 min y a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 min. La placa caliente se desconecta y se deja enfriar a temperatura ambiente. La oblea de Si se desarrolla luego en disolvente PGMEA (AZ® EBR Disolvente) varias veces hasta que las estructuras SU8 están expuestas y no se observa resto SU8 no reticulado en la oblea de Si. Se aplicó una exposición de oxígeno al plasma al maestro terminado para eliminar la capa Omnicoat expuesta y dejar una superficie de Si más limpia. Para ello, se utilizó un grabado con iones reactivos (RIE –reactive-ion etching-) (PlasmaPro NGP80, Oxford Instruments) y las condiciones fueron: potencia: 100 W, caudal de oxígeno: 35 sccm, presión: 100 mTorr y tiempo: 1 min.

#### 5.1.7.2 PDMS y posicionamiento de fibra óptica

Los masters SU8 se colocaron en la parte inferior de un recipiente de aluminio con la cara de las estructuras SU8 apuntando hacia arriba y el PDMS desgasificado (Sylgard 184, Dow Corning), se vertió más tarde en el recipiente y se dejó curar a  $80^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Después su endurecimiento, las placas de PDMS se frotaron a fondo con tejidos de limpieza ópticos empapados en acetona y enjuagados con etanol. Las superficies de PDMS se unieron irreversiblemente juntas, exponiendo las superficies a un plasma de oxígeno generado por RIE en las siguientes condiciones: potencia: 10 W, caudal de oxígeno: 50 sccm, presión: 80 mTorr y tiempo: 20 s. Se insertaron un total de cuatro cables de conexión de fibra óptica con conector único en un solo chip. Para asegurar una iluminación adecuada y un haz gaussiano discreto y limpio en la zona de interrogación, las fibras se escindieron y posteriormente se observaron bajo el microscopio para verificar un corte limpio de la cara de la fibra antes de insertarlas a mano en las entradas de ranuras dedicadas, situadas a ambos lados del chip. Igualmente, las fibras planas y homogéneas

clavadas garantizaron una óptima recolección de luz para las fibras de recogida. Cada extremo de la ranura se humedeció con una gotita de etanol, que entró dentro de la ranura por capilaridad. Esto redujo la fricción y ayudó durante el proceso de inserción de la fibra.

### 5.1.7.3 Medición de muestras con el chip optofluídico

El chip optofluídico se colocó bajo un microscopio invertido (IN480TC-FL, AMScope) para obtener imágenes claras del enfoque del fluido. Se emplearon dos controladores de presión (OB1-mk3, Elveflow) para bombear el fluido dentro del chip: un canal para cada uno de los cuatro fluidos sacrificiales -dos para el enfoque vertical y dos más para el enfoque horizontal- y un canal para el flujo de la muestra. El tratamiento independiente de cada flujo de entrada permitió no sólo ajustar el área de la sección transversal del flujo centralizado, sino también la posición del flujo enfocado dentro del canal microfluídico con respecto a las paredes del canal microfluídico central. La luz de bombeo para ambas zonas de interrogación independientes se generó mediante un diodo láser (serie 473nm 06-01, Cobolt) acoplado a un divisor de fibra óptica 1x2 de 50:50 (FC488-50B-APC-1, Thorlabs). Cada extremo de divisor se acopló a ambas fibras ópticas de entrada de modo único del chip. Las potencias de bombeo típicas dentro del canal microfluídico durante el proceso de medición fueron del orden de 10 mW. Las fibras de parche multimodo de recolección de fluorescencia de dos salidas del chip microfluídico se conectaron directamente a dos tubos fotomultiplicadores (R928, Hamamatsu) encerrados en una carcasa de aluminio (PXT1 / M, Thorlabs), usando un conector FC. Para evitar posibles intensidades de luz de bombeo desde el fotomultiplicador (originadas principalmente por la luz difusa en las células), dos filtros de paso largo de longitud de onda de 500 nm (FELH0500, Thorlabs) se localizaron en la carcasa de aluminio entre la punta de la fibra óptica y el fotocátodo. Se colocaron filtros de paso de banda adicionales (86-988 y 33-330 de Edmund Optics) junto a cada filtro de paso largo para permitir la transmisión de luz seleccionada en cada detector fotomultiplicador. Ambos tubos fotomultiplicadores se conectaron directamente a un osciloscopio (TDS 1012B de Tektronix) para visualizar simultáneamente ráfagas de fluorescencia, mientras se llevaba a cabo el proceso de medición. La resistencia

interna del osciloscopio ( $1\text{ M } \Omega$ ) se utilizó como impedancia de salida. A continuación, se aplicó un seguidor de tensión de dos canales con tensión de saturación de 9 V a la señal de tensión del osciloscopio y se utilizó una tarjeta de adquisición de datos (NI USB-6212 BNC, National Instruments) para adquirir los datos de señal de ambos canales. La baja impedancia en el seguidor de la tensión impidió que las imágenes fantasmas aparecieran en uno de los canales, especialmente a altas velocidades de muestreo en la DAQ. Para minimizar cualquier ruido proveniente de equipos electrónicos se emplearon cables coaxiales para conectar todos los componentes electrónicos de la instalación. La adquisición de datos de la señal se realizó utilizando un programa Lab-VIEW, que permitió guardar simultáneamente los datos de los dos canales para ser tratados posteriormente con el software Scilab para mediciones de correlación de las dos señales.

#### 5.1.7.4 Medición de la muestra con el citómetro de flujo

La citometría de flujo de las muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo NovoCyte (de AceaBiosciences), equipado con un láser de excitación de 488 nm y filtros de detección de 530/30 nm y 675/30 nm. Los datos citométricos se analizaron con el software NovoExpress y FloJo VX.

#### 5.1.7.5 Cultivo de células

Las células de tumorales AU-565 derivadas de mamíferos que expresaban receptores HER2 y EpCAM, así como las RAMOS, HER2, EpCAM negativo, se obtuvieron de American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) y se cultivaron en medio RPMI, suplementado con 10% de suero bovino, a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### 5.1.7.6 Caracterización de Fluoróforos

Los perfiles de absorción y emisión para conjugados FITC y PerCP / Cy5.5 se recogieron con un espectrofotómetro UV-visible Evolution 201 (ThermoScientific) y Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies).

#### 5.1.7.7 Marcaje de Células para Análisis de Microscopía

Se recolectaron células AU-565 de placas de cultivo con tripsina / EDTA al 0,25% y se sembraron en placas de 8 pocillos Ibidi a  $1 \times 10^6$  células / pocillo, durante 24 a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min. A continuación, las células se trataron con NP40 al 1% en PBS durante 15 min a 37°C. Se añadieron 2,0 µg/ml de anticuerpo HER2 ratón-anti-humano HER2 conjugado con FITC (Abcam) y 2,0µg/ml de anticuerpo de ratón-antihumano conjugado con EpCAM PerCP / Cy5.5 (Abcam) a células AU-565 durante 1 h de incubación a 37°C. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió DAPI 100 nM para tinción de núcleos. Las células se analizaron mediante microscopía confocal de barrido láser, utilizando láser de excitación de 488 nm y filtros de detección de 540/30 nm y 650LP nm, para recoger la fluorescencia de FITC y PerCP / Cy5.5, respectivamente. La fluorescencia DAPI se recogió con filtros de epi-fluorescencia y las imágenes se procesaron con el software ImageJ.

#### 5.1.7.8 Marcaje de Células para Microfluídica y Citometría de Flujo

Se recogieron las células de las placas de cultivo con tampón de disociación de EDTA al 0,25% de PBS y se colocaron  $1 \times 10^6$  células en suspensión en PBS 10% de FBS. Por cada 100 µl de suspensión celular se añadieron (con la proporción AU-565: RAMOS apropiada) 4 µl de anti-EpCAM-PerCP / Cy5.5 de ratón y 10 µl de anti-HER2-FITC. A continuación, las células se lavaron por centrifugación a 170 g

durante 5 min y se suspendieron en PBS frío. Las muestras se midieron en el dispositivo optofluídico y el citómetro de flujo.

#### 5.1.7.9 Muestras clínicas

Los datos personales y clínicos se registraron según procedimientos clínicos estándar, siendo anonimizados durante el procesamiento. Todos los especímenes se obtuvieron con el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité local de Ética e Investigación con Medicamentos. Se extrajeron 8 ml de sangre en 10 ml de tubos vacutainer que contenían EDTA y se procesaron en las primeras 24 h. Los resultados para CTCs se vincularon a los datos clínicos.

#### 5.1.7.10 Preparación de muestras clínicas

Se obtuvieron muestras de pacientes y donantes sanos en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Torrelodones-Madrid. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando Ficoll-Paque PLUS (adquirido de GE Healthcare Life Science). Se añadieron 15 ml de solución de Ficoll a tubos de centrifugación Leucosep de 50 ml (Greiner Bio One) y la sangre se dispuso como una capa sobre Ficoll. Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 40 min a 180°C, y la capa de PBMC resultante se separó del resto de fases. Los PMBC se lavaron dos veces en 10 ml de HBSS por centrifugación a 100 g durante 5 minutos y finalmente se suspendieron en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, hasta su uso. A continuación, se precipitaron  $1 \times 10^7$  células y se colocaron en 100  $\mu$ l de PBS 10% de FBS y se añadieron 4  $\mu$ l de anti-EpCAM-PerCP / Cy5.5 y 10  $\mu$ l de anti-HER2-FITC. Después de 1 hora a TA, las células se lavaron por centrifugación a 500 g durante 5 min y se suspendieron en PBS frío. Se siguieron los mismos procedimientos para la medición de muestras clínicas en el dispositivo optofluídico y el citómetro, como se mencionó anteriormente.

## Referencias

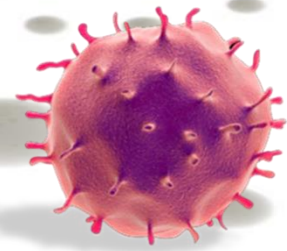
- 1 Arnedos, M. *et al.* Precision medicine for metastatic breast cancer- limitations and solutions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 693-704 (2015).
- 2 McInnes, L. M. *et al.* Clinical implications of circulating tumor cells of breast cancer patients: role of epithelial-mesenchymal plasticity. *Front. Oncol.* **5** (2015).
- 3 Dawson, S. J. *et al.* Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1199-1209 (2013).
- 4 Bidard, F.-C., Proudhon, C. & Pierga, J.-Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol. Oncol.* **10**, 418-430 (2016).
- 5 Masuda, T. *et al.* Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Mol. Oncol.* **10**, 408-417 (2016).
- 6 Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235-U1210 (2007).
- 7 Wang, S. *et al.* Three-Dimensional Nanostructured Substrates toward Efficient Capture of Circulating Tumor Cells. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **48**, 8970-8973 (2009).
- 8 Zhang, L. *et al.* The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Sci. Transl. Med.* **5** 180ra48-180ra48. (2013).
- 9 CellSearch. CellSearch (Veridex, USA). (Veridex, USA) <https://www.cellsearchctc.com/>.
- 10 Hou, S. *et al.* Polymer Nanofiber-Embedded Microchips for Detection, Isolation, and Molecular Analysis of Single Circulating Melanoma Cells. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **52**, 3379-3383 (2013).
- 11 Lee, H. J. *et al.* Efficient Isolation and Accurate InSitu Analysis of Circulating Tumor Cells Using Detachable Beads and a High-Pore-Density Filter. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **52**, 8337-8340 (2013).

- 12 Hyun, K.-A. et al. Microfluidic flow fractionation device for label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) from breast cancer patients. *Biosens. Bioelectron.* **40**, 206-212 (2013).
- 13 Lin, M. et al. Nanostructure Embedded Microchips for Detection, Isolation, and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2941-2950 (2014).
- 14 Mohamadi, R. M. et al. Nanoparticle-Mediated Binning and Profiling of Heterogeneous Circulating Tumor Cell Subpopulations. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **54**, 139-143 (2015).
- 15 Balasubramanian, S. et al. Micromachine-Enabled Capture and Isolation of Cancer Cells in Complex Media. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **50**, 4161-4164 (2011).
- 16 Gao, W. & Farokhzad, O. C. Self-Propelled Microrockets to Capture and Isolate Circulating Tumor Cells. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **50**, 7220-7221 (2011).
- 17 Ulrich, H. & Tarnok, A. Flow Cytometry Detection of Circulating Tumor Cells: Achievements and Limitations as Prognostic Parameters. *Cytometry Part A* **85**, 201-202 (2014).
- 18 Watanabe, M. et al. Multicolor Detection of Rare Tumor Cells in Blood Using a Novel Flow Cytometry-Based System. *Cytometry Part A* **85**, 206-213 (2014).
- 19 Strohm, E. M. & Kolios, M. C. Classification of blood cells and tumor cells using label-free ultrasound and photoacoustics. *Cytometry Part A* **87A**, 741-749 (2015).
- 20 Weight, R. M. & Viator, J. A. in *Molecular Diagnostics for Melanoma: Methods and Protocols* (eds Magdalena Thurin & Francesco M. Marincola) 655-663 (Humana Press, 2014).
- 21 Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181-189 (2014).



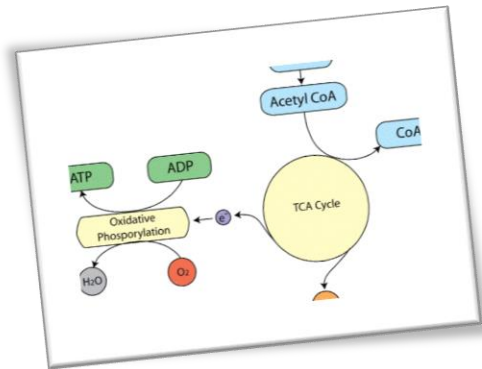
- 22 Shields, C. W. et al. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a Chip* **15**, 1230-1249 (2015).
- 23 Chen, Y. C. et al. Rare cell isolation and analysis in microfluidics. *Lab on a Chip* **14**, 626-645 (2014).
- 24 Mu, X., et al Microfluidics for Manipulating Cells. *Small* **9**, 9-21 (2013).
- 25 Sun, J. S. et al Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6239-6253 (2014).
- 26 Zhu, S. et al. Light-Scattering Detection below the Level of Single Fluorescent Molecules for High-Resolution Characterization of Functional Nanoparticles. *ACS Nano* **8**, 10998-11006 (2014).
- 27 Pazos-Perez, N. et al. Ultrasensitive multiplex optical quantification of bacteria in large samples of biofluids. *Sci. Rep.* **6**, 29014 (2016).
- 28 Catala, C. et al. Online SERS Quantification of Staphylococcus aureus and the Application to Diagnostics in Human Fluids. *Adv. Mater. Technol.* **1**, 1600163-n/a (2016).
- 29 Hiraga, T. et al. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *Int. J. Cancer* **138**, 1698-1708 (2016).
- 30 Wallwiener, M. et al. The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients. *BMC Cancer* **15** (2015).
- 31 Kalra, S. & Jonasch, E. EGFR and HER2: Relevance in renal cell carcinoma. (2015).
- 32 Myung, J. H. et al. Effective Capture of Circulating Tumor Cells from a Transgenic Mouse Lung Cancer Model Using Dendrimer Surfaces Immobilized with Anti-EGFR. *Anal. Chem.* **87**, 10096-10102 (2015).
- 33 Teplinsky, E. & Muggia, F. EGFR and HER2: is there a role in ovarian cancer? *Transl. Cancer Res.* **4**, 107-117 (2015).

- 34 Fichter, C. D. *et al.* EGFR, HER2 and HER3 dimerization patterns guide targeted inhibition in two histotypes of esophageal cancer. *Int. J. Cancer* **135**, 1517-1530 (2014).
- 35 Takagi, S. *et al.* HER2 and HER3 cooperatively regulate cancer cell growth and determine sensitivity to the novel investigational EGFR/HER2 kinase inhibitor TAK-285. *Oncoscience* **1**, 196-204 (2014).
- 36 Tsai, Y. C. *et al.* Synergistic Blockade of EGFR and HER2 by New-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Enhances Radiation Effect in Bladder Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 810-820 (2015).
- 37 Zhang, J. *et al.* A phase I study of AST1306, a novel irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* **7** (2014).
- 38 You, F. L. *et al.* Low-level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *J. Hematol. Oncol.* **1** (2008).
- 39 Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **331**, 1559-1564 (2011).



## 6 ESTUDIO IV

### BIOPSIA LÍQUIDA DE CÉLULAS: METABÓLICA



#### 6.1 Procedimiento Metabólico para el Reconocimiento Universal de Células Tumorales

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

INFORMACIÓN  
SUPLEMENTARIA

REFERENCIAS

### 6.1.1 Resumen

La cuantificación de células tumorales circulantes (CTC) en muestras de sangre de pacientes con cáncer es un enfoque no invasivo para monitorizar el estado de la enfermedad. Permite medir de forma inmediata, y antes de que aparezcan manifestaciones clínicas, la actividad de la enfermedad. Simultáneamente, también permite evaluar la “enfermedad mínima residual” tras un tratamiento, las recaídas tempranas y la eventual resistencia a los tratamientos. Pese a las ventajas teóricas que ofrece esta metodología, aun no existe una técnica validada clínicamente. La mayoría de los métodos propuestos en los últimos años son fenomenológicos y se basan en el uso de anticuerpos marcados con fluoróforos o partículas magnéticas inmovilizadas sobre superficies para capturar las células tumorales circulantes (CTCs). Estos anticuerpos están dirigidos contra proteínas expresadas por las células tumorales específicas, es decir, epiteliales, mesenquimales o con características histológicas predefinidas. No son técnicas dirigidas a características universales, es decir, comunes al “carácter” maligno. En este trabajo, se diseñó y optimizó un método que emplea un análogo de glucosa marcado con un fluoróforo que aprovecha las diferentes vías metabólicas de las células cancerosas para discernirlas de células normales. Es característico de las células tumorales y común a todas ellas, independientemente de su tipo histológico, el denominado “efecto Warburg”. Se trata de la utilización preferente de la glicolisis aerobia, independientemente de la presencia o no de oxígeno.

En particular, y como hallazgo destacable, se demuestra que la señal de fluorescencia en las células tumorales se puede maximizar en gran medida mediante la aplicación de condiciones de hiperoxia, sin dañar las células. Estos resultados se demuestran en líneas celulares por fluorescencia confocal y mediciones de citometría de flujo.

### 6.1.2 Introducción

La cuantificación de células tumorales circulantes (CTC) en muestras de sangre de pacientes con cáncer es un enfoque no invasivo para monitorizar la actividad de la

enfermedad. Se asume que los tumores primarios liberan al torrente circulatorio células malignas que serían las responsables de la formación de metástasis y, por tanto, del pronóstico de la enfermedad. En los últimos años se han propuesto muchos dispositivos y métodos para la detección y cuantificación de CTCs (1,2,3). En particular, todos estos métodos se basan en el uso de anticuerpos marcados con fluoróforos, partículas magnéticas o inmovilizadas sobre superficies para capturar las células. Sin embargo, el número de anticuerpos o aptámeros conocidos dirigidos contra receptores específicos de membrana de células cancerosas es todavía muy limitado, lo que incluye la familia HER (EGFR, HER2 y EGFR3), GD2, PSAm, PDGF, etc. (4). Por lo tanto, la mayoría de los métodos, incluyendo el único aprobado por la Food and Drug Administration norteamericana (CellSearch®, Janssen Diagnostics), utiliza anticuerpos contra los receptores epiteliales, como (EpCAM) molécula epitelial de adhesión celular (5, 6). Es bien sabido que, en el cáncer metastásico, las células tumorales experimentan una transición epitelial-mesenquimal (EMT). En el EMT, las células epiteliales pierden su polaridad celular y la adhesión célula a célula o célula a matriz extracelular, y adquieren las propiedades migratorias e invasivas propias de las células mesenquimales o de las células madre (7, 8). En esta situación, una fracción significativa de los CTC no expresa ningún receptor epitelial residual y, por lo tanto, no se detecta (6, 7, 9). Además, en la EMT se produce la pérdida de características epiteliales (citoqueratinas, por ejemplo). Esto no significa que haya una conversión de células epiteliales en células mesenquimales, con sus marcadores de proteína correspondientes. Además, la detección de CTC basada en marcadores predefinidos excluye la mayoría de las poblaciones y fenotipos tumorales secundarios consecuencia de la enorme heterogeneidad intratumoral (tanto espacial, como temporal). Una solución a este inconveniente se basa en el uso de las propiedades metabólicas intrínsecas de las células tumorales que difieren de las de las sanas. Específicamente, el efecto Warburg describe el aumento de la glicolisis aeróbica y la absorción de glucosa en las células tumorales (10), independientemente de su variabilidad fenotípica y genotípica. Este fenómeno se explota, por ejemplo, en la tomografía de emisión de positrones (PET) en pacientes mediante la utilización de 2- [<sup>18</sup>F] fluoro-2-desoxi-D-glucosa (<sup>18</sup>F-FDG) (11). Este análogo de glucosa marcado radioactivamente es internalizado por células tumorales en cantidades mucho mayores que las células normales, a través de receptores de membrana específicos de glucosa (GLUT) que se sobreexpresan universalmente en dichas

células. La señal de PET de las células tumorales es, por consiguiente, más alta que en los tejidos circundantes y, por lo tanto, puede usarse para determinar la posición del tumor dentro del cuerpo (12, 13).

En este trabajo, se diseña y optimiza un método que emplea un análogo de glucosa (2DG o 2-deoxiglucosa) marcado con un fluoróforo de 2-[N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-desoxi-D-glucosa (2-NBDG) (14). Debido a la mayor captación de glucosa, la señal de fluorescencia de las células tumorales es mayor que las células normales, lo que permite su discriminación y cuantificación mediante citometría de flujo estándar. En particular, la diferencia de señal se maximizó bajo condiciones de alto nivel de oxígeno (es decir, hiperoxia). Para este estudio, se evaluaron células MCF-7 añadidas en cantidades distintas a muestras de sangre de donantes sanos. MCF-7 son células epiteliales humanas de cáncer de mama que se han utilizado ampliamente para la investigación del cáncer de mama, especialmente por su expresión de los receptores de estrógenos que facilitan la respuesta hormonal (15-18).

### 6.1.3 Objetivos

- Detectar células tumorales circulantes aprovechando la propiedad universal de las células malignas denominada efecto Warburg.
- Optimizar las condiciones en las que es posible dicha detección, alterando las condiciones del microambiente tumoral.
- Determinar el papel del oxígeno como factor capaz de incrementar la sensibilidad de este procedimiento.

### 6.1.4 Resultados y Discusión

El fluoróforo 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose se caracteriza por una absorción azul a 465 nm, lo que produce una emisión intensa a 540 nm tras la excitación con una línea láser azul (Figura

1A). Esta molécula se puede utilizar para teñir las células para su estudio mediante imágenes de fluorescencia confocal (19). Sin embargo, como se muestra en la Figura 1B, la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las células normales utilizadas como control (BEAS-2B) y tumorales (MCF-7) después de la incubación con 2-NBDG es demasiado baja para distinguir unívocamente los diversos tipos de células. Se utilizó una tercera línea celular epitelial benigna de mama como control, además de las células BEAS-2B (epiteliales benignas de pulmón).

Se investigaron varios parámetros experimentales (tiempo de incubación, fuerza iónica, pH, temperatura y contenido de oxígeno) para maximizar la diferencia en la emisión de fluorescencia entre células sanas y tumorales. En particular, las alteraciones de la fuerza iónica, el pH y la temperatura no produjeron ningún efecto relevante. En cuanto al tiempo de incubación, no se alcanzó ninguna meseta en 30 minutos. Sin embargo, mayores tiempos de incubación aumentaron la fracción de células sufriendo apoptosis o autofagia debido al agotamiento de los factores de crecimiento (20). De hecho, la 2-desoxi-D-glucosa (2DG), forma no fluorescente de 2-NBDG, induce estrés oxidativo y secundariamente apoptosis en las células cancerosas (21). Más interesante es, sin embargo, el caso de la concentración de oxígeno. La incubación de células cancerosas en ausencia de oxígeno (hipoxia) se ha utilizado con frecuencia en la literatura para el cultivo de células tumorales con el fin de establecer líneas celulares (22,23) Por el contrario, la hiperoxia rara vez se emplea o estudia. Una razón es que el tratamiento a largo plazo en la hiperoxia ha demostrado tener efectos adversos sobre las células (24, 25). Por otro lado, se esperaría que un mayor nivel de oxígeno aumentaría la captación relativa de glucosa por parte de las células tumorales frente a las normales, ya que la vía respiratoria preferente en las células normales es la fosforilación oxidativa mientras que las tumorales, por el efecto Warburg, no estarían utilizando esta vía (dependiente del oxígeno). Este es el concepto que se ensayó en este trabajo. El objetivo planteado fue, por tanto, aumentar el “contraste” en cuanto a la captación de glucosa, entre las células normales y las tumorales.

El metabolismo celular puede ser regulado a través de los cambios de su microambiente. Por lo tanto, para lograr la máxima diferenciación entre células tumorales y células sanas, se optimizaron varios parámetros. Se incubaron células sanas y tumorales con 2-NBDG durante tiempos diferentes, de 1 a 30 min.



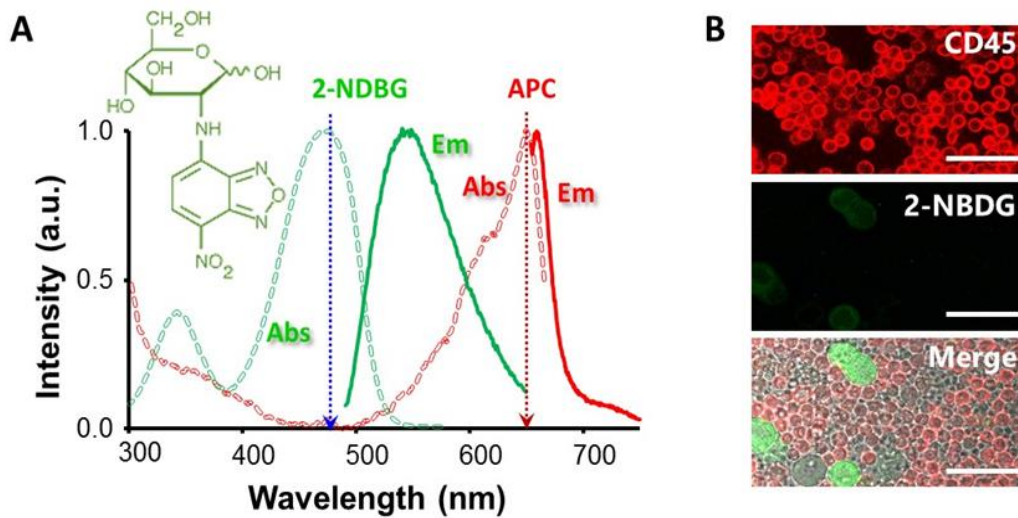


Figura 40: Perfiles de absorción y emisión de los fluoróforos utilizados.

Figura 1: (A) Absorción y perfiles de emisión de 2-NBDG y APC. Las flechas punteadas indican las líneas de excitación. Estructura molecular de 2-NBDG. (B) imágenes de microscopía de fluorescencia de captación de 2-NBDG para PBMC y MCF-7 incubadas con  $300 \mu\text{M}$  2-NBDG durante 30 minutos en muestras que contenían relaciones celulares de 1:10 MCF-7: PBMC. Las barras indican  $40 \mu\text{m}$ .

Se diseñaron un conjunto de experimentos introduciendo variaciones en las concentraciones de oxígeno (hipoxia, normoxia e hiperoxia) con el ánimo de incrementar el contraste de intensidades entre una población tumoral y una población de PBMC (peripheral mononuclear cells). Esta última es la población que encontraríamos en un procedimiento de biopsia líquida, mediante separación de células mononucleares en gradiente de Ficoll. Para las PBMC, la fluorescencia se incrementa levemente en el curso del tiempo. Además, la concentración de oxígeno no parece modificar dicha intensidad. Para las células tumorales (MCF-7), aunque la intensidad se incrementa considerablemente con el tiempo, tanto en hipoxia como en normoxia, en hiperoxia el incremento es significativamente mayor. La Figura 2B muestra la diferencia radiométrica de emisión entre PBMC y MCF-7, obtenida dividiendo la intensidad de señal de las células tumorales entre la misma en las células sanas, en función de las condiciones de oxígeno. Dichos resultados se confirmaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 3). En este último panel se observa un marcado incremento de intensidad si se compara con la



Figura 1B. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron como condiciones óptimas 30 minutos de incubación e hiperoxia.

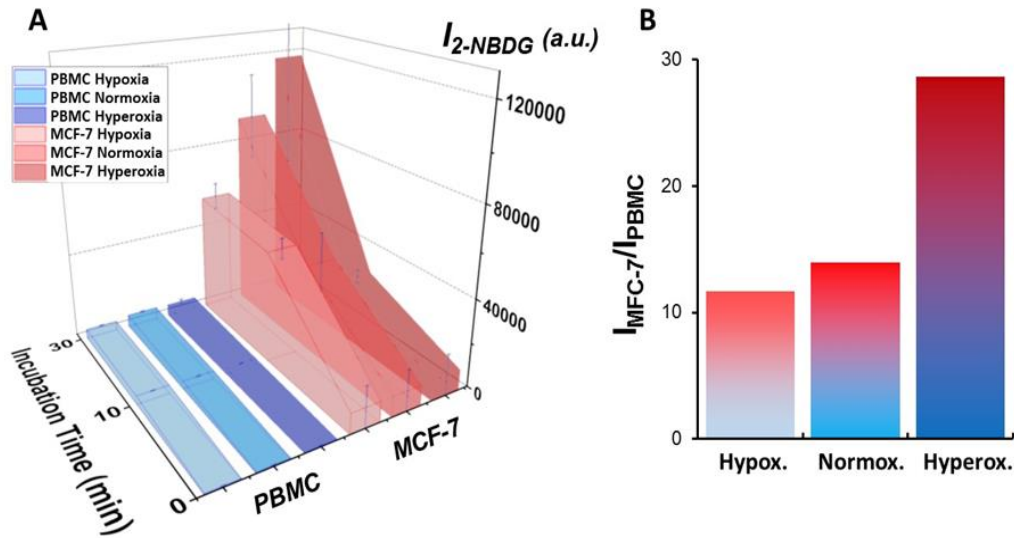


Figura 41: Optimización de las condiciones de cultivo, concentración oxígeno y tiempos.

Figura 2: (A) Optimización del tiempo de incubación de 2-NBDG en diferentes microambientes: hipoxia, normoxia e hiperoxia. Gráfico de paredes 3D con la condición de oxígeno para cada línea celular en el eje z, tiempo de incubación (min) en el eje x, e intensidad de 2-NBDG. En el eje y, los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes ( $n = 3$ ) para muestras que contienen relaciones celulares de 1:10 MCF-7: PBMC. Se registraron los valores medianos de 10.000 eventos de citometría para cada muestra. La prueba de Kruskal-Wallis reveló una diferencia significativa entre las células cancerosas (MCF-7) y normales (PBMC) en condiciones optimizadas,  $p < 0,01$ . (B) Diferencia radiométrica en fluorescencia 2-NBDG entre PBMC y MCF-7 obtenida dividiendo la intensidad de señal de la célula tumoral por la de las células normales, en función de las condiciones de oxígeno.

Una vez comprobada la capacidad del método para discriminar células tumorales MCF7 en relación con células epiteliales benignas, con fundamento hipotético en el efecto Warburg (una característica universal de las células tumorales), así como definidas las condiciones óptimas (hiperoxia), se procedió a simular las condiciones de una biopsia líquida real. Para ello, se realizó una siembra (spiked) de distintas concentraciones de células MCF7 (entre 1:1 y 1:10.000, incluidas las condiciones óptimas: 300  $\mu$ M NBDG en “buffer” fosfato -PBS-, 30 minutos en hiperoxia) en muestras reales de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos (PBMC), extraídas mediante gradiente de densidad en Ficoll.

Se utilizó NBDG como marcador metabólico y CD45 como marcador de las células mononucleares no tumorales (PBMC). Tras su extracción mediante Ficoll, las PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) se co-cultivaron en distintas

condiciones de oxigenación y tiempos con MCF7. Después de 30 minutos de incubación, las muestras se lavaron y procesaron por citometría de flujo. Se utilizaron láseres azules (488 nm) y rojo (640 nm) para detectar las dos poblaciones: MCF-7 en azul y PBMC en rojo (Figura 4). Los eventos positivos son mostrados en verde, mientras que los eventos en rojo o en rojo y verde se consideraron negativos. Los resultados muestran claramente la capacidad del método para discriminar células tumorales en un contexto real. En la figura 5A se muestra la concordancia entre el número esperado de eventos y el real. En este aspecto, es posible extraer, para cualquier ratio de células, una señal promedio de la fluorescencia intrínseca de cada célula individual. Esto se obtiene dividiendo la fluorescencia total, resultado del tratamiento de las con PBMC y MCF-7 con 2-NBDG, entre el número de eventos de cada línea celular en cada muestra. El resultado se muestra en la Figura 5B Para cualquier ratio de células, la fluorescencia de las células tumorales es doble en intensidad que la correspondiente a las células normales, permitiendo el reconocimiento de eventos únicos incluso a altas diluciones.

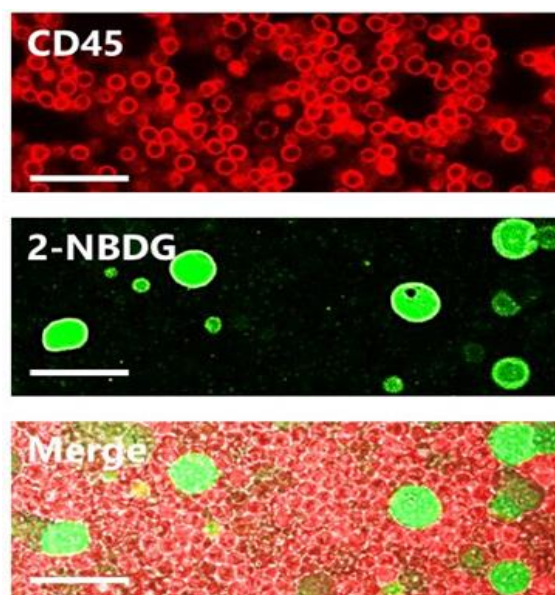


Figura 42: Microscopia confocal una vez optimizadas las condiciones.

*Figura 3:* Imágenes de microscopía de fluorescencia en de absorción de 2- NBDG para PBMC y MCF-7 en condiciones optimizadas para muestras que contenían relaciones celulares de 1:10 MCF-7: PBMC. Barras de escala = 40  $\mu$ m.

6. Estudio IV

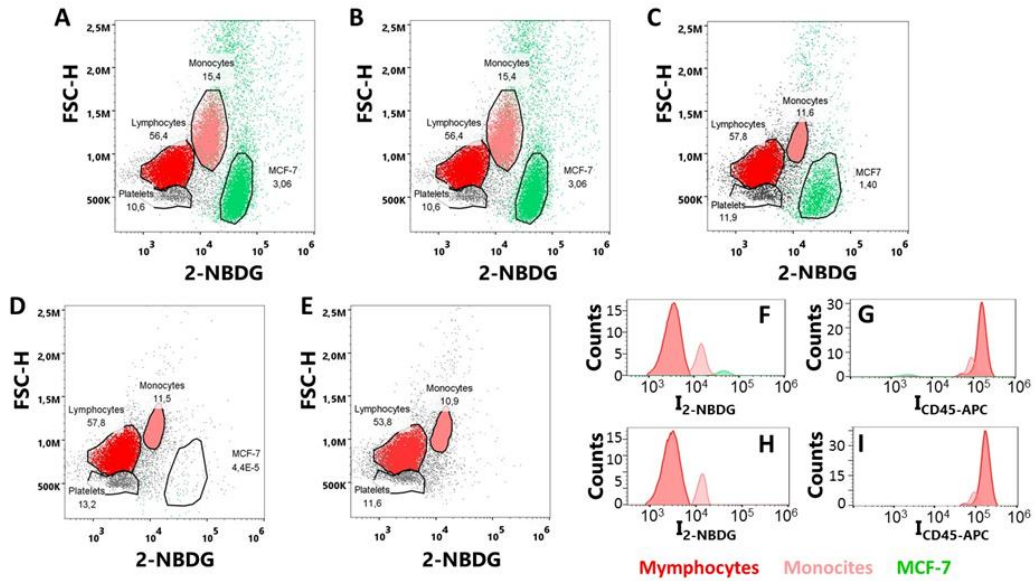


Figura 43: Resultados de la citometría de flujo.

Figura 4: Diagramas de citometría de flujo de muestras de MCF-7 y PBMCs con relaciones celulares (A) 1:10, (B) 1: 100, (C) 1: 1000, (D) 1: 10000 y (E) Sólo PBMCs; Tras la incubación con 2-NBDG y CD45-APC durante 30 minutos bajo condiciones de hiperoxia. (F-I) Distribuciones de intensidades de fluorescencia para (F) 2-NBDG y (G) CD45-APC, en una muestra con una relación 1: 1000 MCF-7: PBMC; Y (H) 2 - NBDG y (I) CD45 - APC, en una muestra de PBMC.

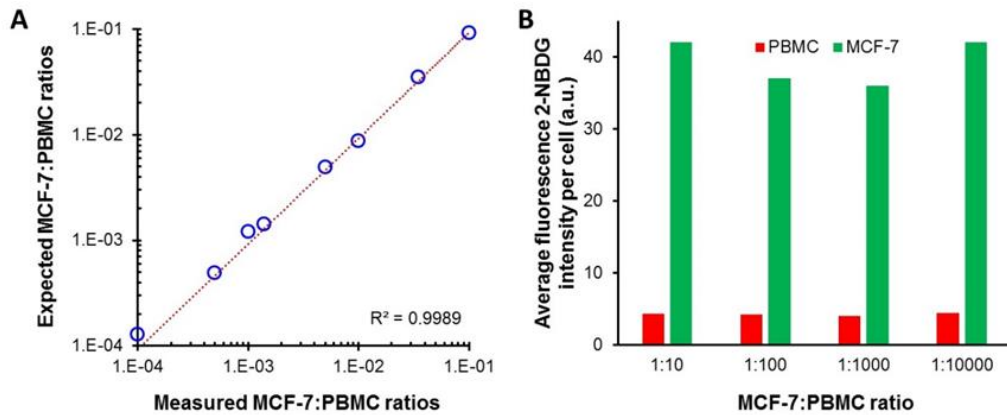


Figura 44: Correlación entre proporciones esperadas de células y reales. Fluorescencia promedio.

Figura 5: (A) Comparación entre las proporciones esperadas y medidas de MCF-7: PBMC para las muestras incubadas con 2-NBDG y CD-45 durante 30 min bajo hiperoxia. (B) Intensidades de fluorescencia normalizadas por célula para PBMC y MCF-7 tratadas con 2-NBDG bajo contenido de oxígeno optimizado y condiciones de tiempo de incubación. Muestras con relaciones celulares de 1:10, 1: 100, 1: 1000 y 1: 10000.

### 6.1.5 Conclusiones

La detección de células tumorales circulantes (CTC) en el torrente sanguíneo es el núcleo de la biopsia líquida.

En este estudio se muestra la factibilidad de usar 2-NBDG para identificar células tumorales en un medio que contenga otros tipos celulares benignos, particularmente el medio característico de una biopsia líquida: sangre periférica. Se realiza mediante el uso de citometría de flujo y se optimizan las condiciones de concentración de oxígeno y tiempos de incubación.

Este método plantea las premisas para el desarrollo de una nueva generación de biopsias líquidas, basándose en una propiedad universal e intrínseca de las células tumorales más que en características fenomenológicas (como la presencia de una proteína de membrana, etc.). El método aquí propuesto puede superar la mayor dificultad que encuentran las biopsias líquidas basadas en expresión específica de marcadores: la heterogeneidad tumoral.

### 6.1.6 Información Suplementaria (Materiales y Métodos)

#### 6.1.6.1 Cultivos celulares

Las células tumorales MCF-7 y células MCF-12A derivadas de células mamarias y las células epiteliales bronquiales humanas normales BEAS-2B se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). Se cultivaron MCF-7 en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 0,01 mg / ml de insulina humana recombinante. Se cultivaron MCF-12A en medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham (mezcla 1: 1 de DMEM / F12) con suero de caballo al 5%, hidrocortisona 500 ng / ml, 0,01 mg / ml de insulina bovina 100 nm / ml de toxina cólera y 20 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico humano. BEAS-2B se cultivaron en BEGMTM (medio de crecimiento epitelial bronquial), suplementado con el contenido del kit BEGMTM

SingleQuots™ (catálogo N° CC-4175). Las células se mantuvieron a 37° C en un ambiente humidificado al 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 6.1.6.2 Funcionalización de CdSe Qdot

Los CdSe Qdot 625 ITK (adquirido a Molecular Probes, Life Technologies) se funcionalizaron con amino-polietilenglicol (amino-PEG) 5000 MW, mediante acoplamiento EDC para aumentar su biocompatibilidad. Se dispersaron 1 μM de cada Qdot en solución tampón MES 10 mM (pH = 6,0) y se añadieron amino-PEG con una relación molar 1 (quantum dot) : 100 (amino-PEG). Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, EDC, sobre la base de una relación molar de 1: 1, y la reacción se dejó durante 2 h. Después, la solución se centrifugó para eliminar los agregados grandes a 13.000 rpm durante 20 min, y el sedimento se recogió por centrifugación inversa a 2.000 rpm durante 3 min. La funcionalidad de los quantum dots se verificó mediante evaluación de su estabilidad bajo disolventes de fuerza iónica superior, usando fluorímetro.

#### 6.1.6.3 Marcaje celular con Qdot@amino-PEG

Para identificar con éxito diferentes tipos de células en una mezcla de células, se funcionalizaron previamente los Qdot 625 y 685 y se utilizaron como identificadores intracelulares para células MCF12A y MCF7, respectivamente. 50.000 células / pocillos de cada tipo se cultivaron por separado sobre cubiertas de vidrio dentro de placas de 12 pocillos y dejaron crecer durante 48 h, a 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. A continuación, las células se lavaron con PBS 1x precalentado durante 1 minuto y se añadieron 100 nM de cada Qdot@amino-PEG en el medio de crecimiento celular. Se esperó durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con 1x PBS. Las células MCF7 (marcadas con Qdot685) se separaron de la superficie usando solución de tripsina-EDTA al 0,25% y se volvieron a cultivar junto con las células MCF12A (Qdot625). Las células co-cultivadas se dejaron durante 12 h, con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### 6.1.6.4 Optimización de la captación de 2-NBDG en muestras de PBMC.

##### 1- En cultivo:

Para estudiar la captación y retención generales de glucosa, las células fueron expuestas a 300  $\mu$ M de 2-NBDG para diferentes tiempos de incubación: 0, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 min. Para lograr una mayor acumulación de 2-NBDG dentro de células MCF7, las células fueron expuestas a diferentes condiciones basadas en la concentración de oxígeno disuelto, temperatura, pH y concentración de sodio. Los efectos sobre la disponibilidad de oxígeno se evaluaron exponiendo las células al entorno de hipoxia o hipoxia, creadas burbujeando medios de incubación de 2-NBDG durante 20 minutos con oxígeno o nitrógeno, respectivamente. El efecto de la temperatura se estudió cultivando células a 40°C, 200°C o 37°C. El efecto del pH se evaluó a los valores de 7,3, 7,6 y 7,9, respectivamente. Finalmente, se investigó el efecto de concentración de ion sodio, añadiendo solución de NaCl para alcanzar 10 mM y 50 mM (concentración final). Posteriormente, las células se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% en 1x PBS, durante 20 minutos, y después se lavaron 6 veces con 1xPBS y se montaron sobre láminas de vidrio con Fluoromount G (Southern Biotech), para las mediciones de fluorescencia.

Se cultivaron rutinariamente MCF12A, una línea celular derivada de epitelio mamario mamario, y una línea celular de cáncer de mama MCF7 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) en DMEM / F-12 suplementado con 20 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico humano, 100 ng / ml de toxina de cólera, 0,01 mg / ml de insulina bovina, 500 ng / ml de hidrocortisona al 95% y suero de caballo donante al 5%; Y en EMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 0,01 mg / ml de insulina humana recombinante, 2 mM de L-glutamina y 1% de Penicilina-Estreptomicina, respectivamente. Cada línea celular se cultivó en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

##### 2- En PBMC (Ficoll):

Cantidades determinadas de células tumorales MCF-7 se introdujeron en PBMC recogidas de donantes sanos. Las células se sedimentaron y se colocaron en 100  $\mu$ l de PBS 10% de FBS, 4  $\mu$ l de anti-CD45-APC (para PBMC) y 100  $\mu$ L de 2-NBDG



300  $\mu$ M para diferentes tiempos de incubación y disponibilidad de oxígeno: 0 min, 10 min y 30 min; Hipoxia, normoxia e hiperoxia. El entorno de hipoxia se construyó por burbujeo de gas nitrógeno en la solución de 2-NBDG, durante 20 minutos y se utilizó gas oxígeno para la condición de hiperoxia. Después, las células se lavaron dos veces por centrifugación a 250 g durante 10 min y se suspendieron en PBS frío. Adicionalmente, se seleccionaron diferentes cantidades de células cancerosas MCF-7 y se introdujeron en la sangre: 100.000; 10.000; 1.000 y 100 células para  $1 \times 10^6$  PBMCs. Se añadieron las mismas cantidades de marcadores, como se describió anteriormente, y 300  $\mu$ M, 30 minutos de tiempo y entorno de hiperoxia fueron utilizados para la incubación con 2-NBDG, como condición optimizada.

#### 6.1.6.5 Medición de la muestra con el citómetro de flujo

La citometría de flujo de las muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo NovoCyte (de AceaBiosciences), equipado con láseres de excitación de 488 nm y 640 nm y filtros de detección de 530/30 nm y 675/30 nm. Los datos citométricos se analizaron con el software NovoExpress y FloJo VX.

#### 6.1.6.6 Análisis de microscopía confocal por barrido láser

Se recolectaron células MCF-7 de las placas de cultivo con tampón de disociación celular y 100.000 células se lavaron en  $1 \times 10^6$  PBMCs. Se añadieron las mismas cantidades de marcadores, como se ha descrito anteriormente, y se usaron 300  $\mu$ M y 30 minutos de tiempo para la incubación con 2-NBDG bajo condiciones de hiperoxia, como condición optimizada; y 10 min bajo normoxia se utilizaron como condición no optimizada. Después, las células se lavaron dos veces por centrifugación a 250 g durante 10 min y se suspendieron en PBS frío. Finalmente, se dispusieron 100  $\mu$ l de solución de células en placas de  $\mu$ -Ibidi de 8 pocillos y se analizaron mediante microscopía confocal de barrido por láser, utilizando láseres de excitación de 488 nm y 532 nm y filtros 515/30 nm y 650LP para recoger la fluorescencia. Se aplicaron las mismas condiciones de exposición para comparar

las intensidades de fluorescencia 2-NBDG entre las muestras: 40 x macrolense, 69,3% de potencia láser, 13,20 píxeles.

#### 6.1.6.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para verificar si las diferencias de intensidad entre la línea celular, la condición de oxígeno y el tiempo de incubación eran significativas. Se seleccionaron un total de 10.000 eventos citométricos ( $n = 10.000$ ) por muestra. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnow, que mostró una distribución no normal; por lo tanto, los datos se presentan como medianas. Para la comparación de más de 2 grupos no paramétricos se realizaron test de Krustal-Wallis y pruebas *post hoc* en el software SPSS 22. La significación se estableció en  $P < 0,01$ .

## Referencias

- 1 Pallaoro A, Hoonejani MR, Braun GB, Meinhart CD and Moskovits M. Rapid Identification by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Cancer Cells at Low Concentrations Flowing in a Microfluidic Channel. *ACS Nano*. 2015; 9:4328-4336.
- 2 Alix-Panabieres C and Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab on a Chip*. 2014; 14:57-62.
- 3 Joosse SA, Gorges TM and Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2015; 7:1-11.
- 4 Grimm D, Bauer J, Pietsch J, Infanger M, Eucker J, Eilles C and Schoenberger J. Diagnostic and therapeutic use of membrane proteins in cancer cells. *Curr Med Chem*. 2011; 18:176-190.
- 5 Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bauerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Hofner T,

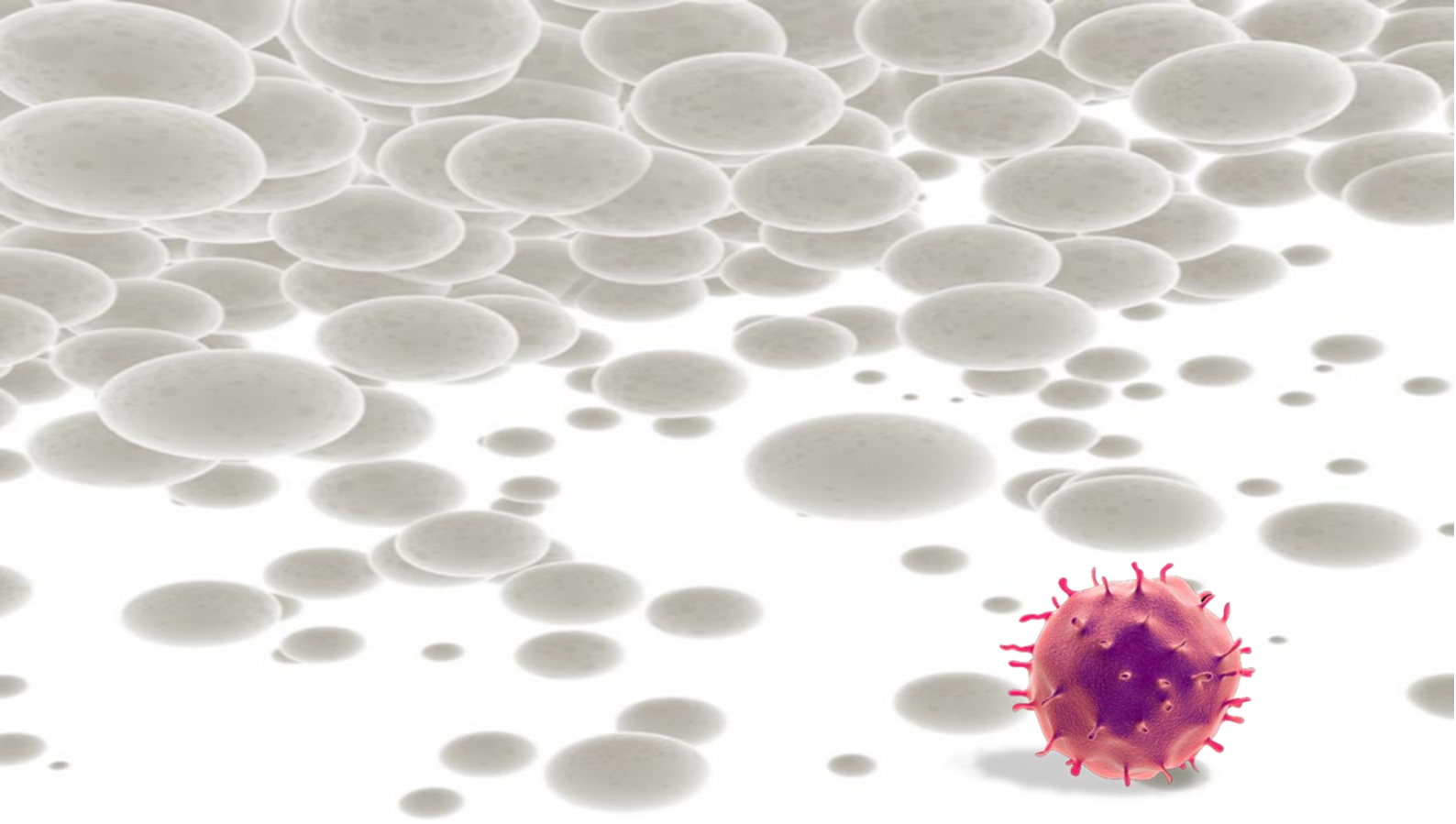


- Sprick M, Scharpff M, Marme F, Sinn HP, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotech.* 2013; 31:539-544.
- 6 Gorges TM, Kuske A, Röck K, Mauermann O, Müller V, Peine S, Verpoort K, Novosadova V, Kubista M, Riethdorf S and Pantel K. Accession of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells. *Clin Chem.* 2016; 62:1504-1515.
- 7 Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science.* 2013; 339:580-584.
- 8 Chaffer CL and Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science.* 2011; 331:1559-1564.
- 9 Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC and Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2011; 105:1338-1341.
- 10 Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009; 324:1029-1033.
- 11 Fletcher JW, Djulbegovic B, Soares HP, Siegel BA, Lowe VJ, Lyman GH, Coleman RE, Wahl R, Paschold JC, Avrill N, Einhorn LH, Suh WW, Samson'O D, Delbekell D, Gorman M and Shields AF. Recommendations on the use of F-18-FDG PET in oncology. *J Nucl Med.* 2008; 49:480-508.
- 12 Pellegrino T, Parak WJ, Boudreau R, Le gros MA, Gerion D, Alivisatos AP and Larabell CA. Quantum dot-based cell motility assay. *Differentiation.* 2003; 71:542-548.
- 13 Parak WJ, Boudreau R, Le Gros M, Gerion D, Zanchet D, Micheel CM, Williams SC, Alivisatos AP and Larabell C. Cell Motility and Metastatic

- Potential Studies Based on Quantum Dot Imaging of Phagokinetic Tracks. *Adv Mater.* 2002; 14:882-885.
- 14 Zou C, Wang Y and Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods.* 2005; 64:207-215.
- 15 Holliday DL and Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13:1-7.
- 16 Millon SR, Ostrander JH, Brown JQ, Raheja A, Seewaldt VL and Ramanujam N. Uptake of 2-NBDG as a method to monitor therapy response in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 126:55-62.
- 17 ATCC:[https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10782.aspx?geo\\_country=es](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10782.aspx?geo_country=es).
- 18 Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung M-C, Bonfiglio T, Hicks DG and Tang P. The Expression Patterns of eR, pR, HeR2, cK5/6, eGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer.* 2010:35-41.
- 19 Cai H and Peng F. 2-NBDG Fluorescence Imaging of Hypermetabolic Circulating Tumor Cells in Mouse Xenograft model of Breast Cancer. *J Fluorescence.* 2013; 23:213-220.
- 20 Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU and Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Diff.* 2009; 16:966-975.
- 21 Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S and Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett.* 2014; 355:176-183.
- 22 Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, Schumacher U, Costes V, Maudelonde T, Pantel K and Alix-Panabières C. Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 2015; 75:892-901.

- 23 Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, Wittner BS, Stojanov P, Brachtel E, Sgroi D, Kapur R, Shioda T, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014; 345:216-220.
- 24 Allen CB and White CW. Glucose modulates cell death due to normobaric hyperoxia by maintaining cellular ATP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1998; 274:L159-L164.
- 25 Das KC. Hyperoxia Decreases Glycolytic Capacity, Glycolytic Reserve and Oxidative Phosphorylation in MLE-12 Cells and Inhibits Complex I and II Function, but Not Complex IV in Isolated Mouse Lung Mitochondria. *Plos One*. 2013; 8:e73358.



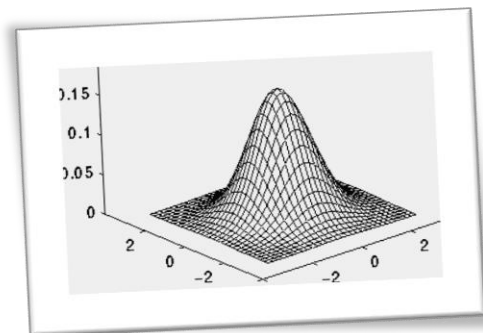


## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESUMEN

OTROS HALLAZGOS

PERSPECTIVAS



La existencia de CTCs fue planteada por primera vez por Thomas Ashword en 1869 (Ashworth 1869) estudiando la sangre de un paciente fallecido por un cáncer. Sin embargo, hasta 100 años después no se implementaron las primeras técnicas con capacidad para detectar este tipo de células tan escasas ( $1/10^6$  células mononucleares en sangre). Salgado, en 1959 (Salgado, Hopkirk et al. 1959), y Alexander, en 1960 (Alexander and Spriggs 1960), tomaron muestras de pacientes

con cáncer, aislando células que posteriormente sembraron en sangre donada por personas sanas con la intención de “redetectarlas” (spiking). La primera técnica inmunomagnética se introdujo en 1998 (Racila et al. 1998) . Sin embargo, aún faltaban tecnologías capaces de reproducir estos hallazgos y, sobre todo, faltaba la explicación de su significado, ya que no siempre que se encontraban dichas células malignas aparecían metástasis. Por otro lado, en biopsias de médula ósea de pacientes con cáncer de mama en estadios muy precoces (estadios I) algunos autores (Redding et al. 1983, Balic et al. 2013), fueron capaces de aislar células malignas. Este hecho parece tener lugar al menos en un 3% de los estadios I/II de esta enfermedad. Se desconoce el significado de este hallazgo, pero se ha relacionado con las recaídas tardías del cáncer de mama. A estas células, presentes desde estadios precoces, pero solo activas muy tardíamente (en ocasiones hasta 20 años tras el diagnóstico) se las ha denominado células malignas “durmientes”.

La mayor parte de los estudios de biopsia líquida han sido realizados mediante técnicas inmunohistoquímicas, es decir, mediante una preselección de los marcadores que se buscan en la célula diana (Cristofanilli et al. 2004) , por lo que el conocimiento de la dinámica de las metástasis es aún muy limitado. La hipótesis en que se fundan presupone que el fenotipo tumoral es epitelial. Las estrategias diseñadas hasta la actualidad para la enumeración y, en su caso, caracterización de las CTCs, pueden dividirse en dos grandes categorías en función de si se plantea una etapa previa de concentración: procedimientos con o sin enriquecimiento celular. Dada la bajísima cantidad de células tumorales circulantes ( $1 \times 10^6$  mononucleares, o +/- 1 célula por ml de sangre total), en el primer caso se realiza un “enriquecimiento” previo al estudio, procedimiento que podrá ser negativo (por eliminación de células sanguíneas no tumorales) o positivo (por selección de las células malignas) (Millner et al. 2013, Ferreira, et al. 2016). En el segundo caso, sin enriquecimiento, se procede al estudio directo de la muestra tal como se obtiene. A continuación, se describen algunas técnicas representativas de distintos enfoques metodológicos:

- Basados en gradientes de densidad: Ficoll (se separan células mononucleares de la muestra de sangre completa).
- Basados en antígenos de membrana, tanto de los leucocitos o células hematopoyéticas (CD45), como de las propias células tumorales

(EpCAM). Casi todas estas técnicas son específicas de tumor (mama, colon, pulmón o próstata), ya que es preciso conocer los anticuerpos que se utilizarán. Una variante (MACS: Antigen Activated Cell Sorting) utiliza el mismo fundamento, pero con tecnología de citometría de flujo y la posibilidad de aislar las células (sorting)

- Basados en el tamaño: se presupone que el tamaño de las CTCs es mayor que el resto de células sanguíneas, por lo que se explota esta característica, haciendo pasar la sangre por membranas con poros o por recorridos con barreras (ISET©) (Tan, Yobas et al. 2009).
- Basados en electrolisis (Zheng et al. 2007)
- EPISPOT®: depleción con anti CD45, selección positiva con CXCR4 y PSA o MUC1 (según el objetivo).
- Basados en PCR o FISH: detección de ADN específico intracelular.
- Dispositivos microfluidicos con anticuerpos fijos.
- HB-Chip (Herringbone Chip): basado en las variaciones de flujo laminar en un sistema microfluídico.

Por otro lado, el ADN circulante fue descrito por primera vez en 1948 (Mandel and Metais 1948) y relacionado con células metastásicas en 1954 (Watanabe 1954). Aparece tanto en individuos sanos como enfermos, pero las concentraciones son muy diferentes. Así, en sujetos sanos la concentración de ADN en sangre es de 1-10 ng/ml y en pacientes con cáncer de colon fluctúa entre 22 y 3922 ng/ml, con una media de 1157 (Leon et al. 1977, Schwarzenbach et al. 2008). La fracción de ADN tumoral oscila entre 0,1% y 30% del ADN circulante total (ctDNA/cfDNA)

Se ha detectado ADN circulante aumentado en pacientes con traumatismos o inflamación, por lo que es muy inespecífico. Algunas enfermedades autoinmunes también cursan con un incremento de ADN en circulación, como el LES (Lupus Eritematoso Sistémico). Una vez que comienza un tratamiento sistémico efectivo en cáncer de colon metastásico, las concentraciones de ADN total se reducen progresivamente (Schwarzenbach, et al. 2008). Así, el papel que podría jugar el ADN circulante en el diagnóstico y pronóstico oncológico se podría enfocar de dos maneras (igual que en el caso de las CTCs): cuantitativo y cualitativo. Este último enfoque depende de la identificación específica de las secuencias y esto,

normalmente, dependerá a su vez de que dichas secuencias sean conocidas en general o específicamente en el tumor primario.

El ADN circulante parece estar muy fragmentado, aunque respecto a esto no hay un acuerdo unánime en la literatura. Así, Mouliere (Mouliere et al. 2011) sostiene que las secuencias significativas son de menos de 150 pb. Otros autores sostienen que son de 140 o más pb. La discrepancia se debe probablemente a las limitaciones de la técnica utilizada, PCR cuantitativa. Aunque, por otro lado, dicho tamaño (+/- 140 pb), se corresponde con el tamaño (en unidades de pares de bases) del nucleosoma, por lo que tendría fundamento encontrar fragmentos más frecuentemente de este tamaño.

Las tecnologías más representativas son:

- ARMS/Scorpion: utiliza primers para iniciar una PCR si en la diana está presente la secuencia complementaria.
- PCR digital: se generan “amplicones” de una sola plantilla (template) de ADN que se marca con fluoróforos.
- Mutant-Enriched PCR: primers para el ADN no mutado y el mutado diferentes y posterior digestión específica del no mutado.
- BEAming: basado en la amplificación de moléculas únicas de ADN tras un preprocesamiento en emulsión y posterior amplificación a escala masiva.

Todas ellas son dependientes de PCR y, por tanto, precisan de una tecnología centralizada y utilizada por personal especializado y dedicado.



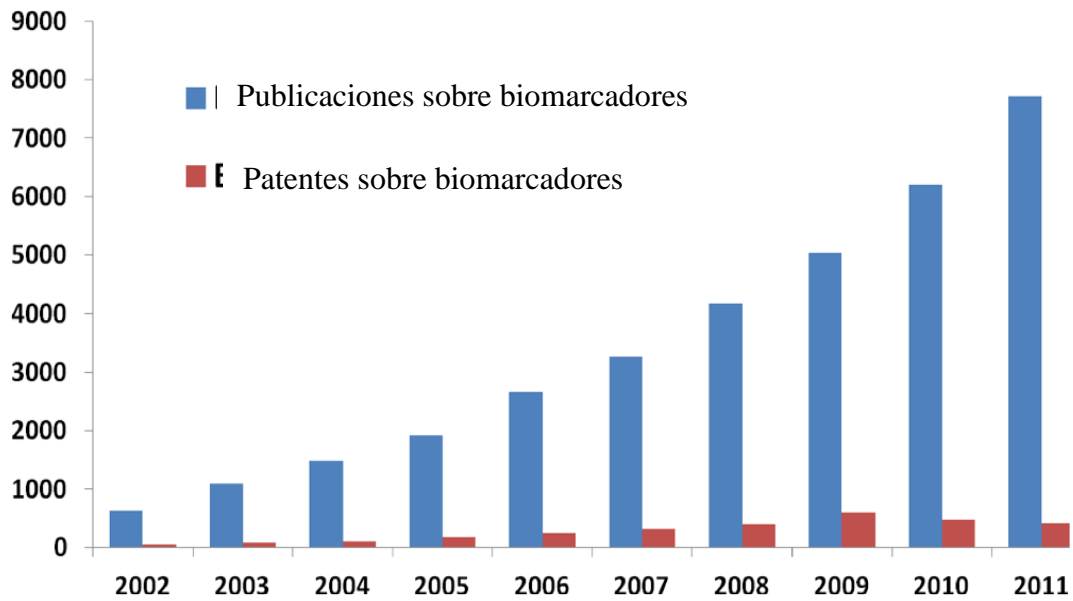


Figura 45: El incremento de publicaciones acerca de biomarcadores es claramente más rápido que su traslación clínica. Modificado de Elisabeth Drucker y Kurt Krapfenbauer 2013

Aun no existe un estándar para la práctica clínica de biopsias líquidas. En la Figura 45 puede observarse el retraso existente en el desarrollo de aplicaciones prácticas de biomarcadores en general y el conocimiento académico de los mismos. Sólo hay una tecnología aprobada en Estados Unidos, denominada CellSearch®, para la enumeración de CTCs. Este retraso en la aplicación se debe a la enorme dificultad que existe en la práctica para coordinar el diseño de procedimientos tecnológicos nuevos con su disponibilidad en la práctica clínica común. Una práctica lo suficientemente amplia como para la realización de ensayos clínicos prospectivos con potencia estadística.

El objetivo general que en esta tesis se ha planteado consiste en la superación de la dificultad reseñada mediante el desarrollo de nuevas estrategias. Así, se han identificado dos niveles del problema: uno estratégico y otro tecnológico:

- Estratégico: es necesario un abordaje, directo o indirecto, pero dirigido a la presencia de células tumorales circulantes o sus productos, desde perspectivas generales. Es decir, considerando propiedades universales de las células tumorales. Clásicamente esto es lo que hasta la actualidad ha planteado la poliquimioterapia: el abordaje de la proliferación como propiedad universal del cáncer.

- Técnico: es necesaria la aproximación de la tecnología a los puntos de asistencia clínica, superando la necesidad de centralización y personal especializado.

En esta tesis doctoral, siguiendo este análisis, se han planteado y cumplido los siguientes objetivos, tanto metodológicos como estratégicos:

- 1- Desarrollo de un método rápido, simple y sin marcajes, que combinando la técnica SERS con un análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA), permite el análisis de fragmentos de ADN largos con una sensibilidad de una sola base (primer objetivo específico)

Se ha demostrado específicamente en la detección de mutaciones puntuales típicas de cáncer de colon en el gen K-RAS en fragmentos que se han considerado típicos de ADN tumoral circulante (el tamaño de un nucleosoma). El análisis de dichas mutaciones es un problema clínico actual, ya que es preciso conocer dicho estatus mutacional para decidir el tratamiento adecuado (en este caso CETUXIMAB si la mutación está ausente). Hasta ahora la determinación debe realizarse sobre tejido tumoral procedente de la cirugía. Por este método se obtiene una toma aislada, que no permite una posterior monitorización.

Se partió del hecho previamente conocido de que los cambios en una sola base en moléculas de ADN de una longitud determinada son capaces de modificar, bajo determinadas condiciones su conformación espacial. Se diseñó un modelo basado en SERS para detectar, mediante nanopartículas, el espectro específico de cada uno de los posibles cambios de base que tienen lugar en el gen K-RAS en cáncer de colon. Posteriormente se correlacionó este método con el estándar: la secuenciación o la SSCP (Single Strand Conformational Polimorphism).

La tecnología aportada cumple los requisitos que se plantean en los objetivos: es sencilla, de bajo coste y aplicable en centros no especializados. El trabajo realizado es una prueba de concepto. En el futuro es factible añadir más marcadores, incluso de forma masiva, dado que la tecnología SERS lo permite.

- 2- Detección de la proteína c-MYC derivada de células tumorales circulantes mediante la construcción de un receptor capaz de transducir dicha presencia a través de las modificaciones específicas en un espectro SERS y correlacionar la cuantificación de la proteína c-MYC derivada del

procedimiento anterior con la presencia de células tumorales, tanto de líneas celulares como de muestras de sangre real de pacientes con cáncer, demostrando así la posibilidad de detectar dichas células mediante un procedimiento de discriminación genérico o universal (amplificación de c-MYC) (segundo y tercer objetivo específico).

Se construyó un “receptor” específico de la proteína c-MYC, con fundamento en su propiedad de heterodimerizarse con la proteína MAX. El receptor peptídico se unió a materiales plasmónicos especialmente diseñados, de forma que determinados eventos secundarios al reconocimiento del péptido/c-MYC, se tradujeron en alteraciones medibles en el espectro. Para ello, el transductor (repórter SERS) se diseñó de tal forma que sus cambios de orientación molecular en relación al sustrato SERS se reflejasen en el espectro SERS, de acuerdo con las denominadas reglas de selección superficial. Se comprobó la efectividad del sistema mediante líneas tumorales con alta expresión de c-MYC y, posteriormente, se testó en sangre real de un paciente con alta carga tumoral.

- 3- Diseño de un dispositivo microfluídico de flujo 3D, donde todas las ópticas están integradas en el chip, para la cuantificación de fluorescencia de CTCs en muestras reales y demostración de su efectividad (cuarto objetivo específico).

Se diseñó un dispositivo microfluídico capaz de focalizar un microflujo en 3D, y en el cual todas las ópticas se integraron en el chip, permitiendo la cuantificación de fluorescencia de CTCs en muestras reales con una implementación técnica muy sencilla y ligera. Para probar el rendimiento del chip, se seleccionaron dos objetivos de membrana celular, la molécula de adhesión de células epiteliales, llamada EpCAM, y el receptor tirosina-quinasa, HER2/neu (EGFR2). La eficacia de la plataforma se testó en líneas celulares y en una variedad de donantes sanos y pacientes con cáncer de mama metastásico.

- 4- Detección de células tumorales circulantes aprovechando la propiedad universal de las células malignas denominada efecto Warburg o glicólisis aerobia y manipular dicho efecto mediante la modificación de la concentración de oxígeno en el microambiente tumoral (quinto y sexto objetivo específico)

Se utilizó un modelo *in vitro* con líneas celulares de cáncer de mama (MCF7), en el que dichas células fueron sometidas a distintas condiciones en su microambiente, con objeto de comprobar su nivel de captación de glucosa. Se utilizó una molécula de un derivado de glucosa marcado con un fluoróforo (NBDG) y los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo. Posteriormente se comprobó la efectividad del método mediante un procedimiento de “spiking” de células MCF7 en sangre real (tras separación de PBMC, mediante un gradiente de Ficoll), con resultados concluyentes de su efectividad.

## 7.1 Otros hallazgos destacables

### 7.1.1 Proteína c-MYC como marcador surrogado

Existen dos cuestiones respecto a las biopsias líquidas cuya definición es imprescindible para abordar la interpretación de sus resultados correctamente. Se trata de la procedencia del ADN (ctDNA) o de las proteínas analizadas. Dicho ADN puede proceder del tumor primario tras su necrosis o apoptosis de sus células, pero también puede proceder de las propias células tumorales circulantes o de las ya mencionadas células diseminadas circulantes (procedentes de las metástasis). Con las proteínas ocurre lo mismo. Incluso podría ocurrir que el ADN o las proteínas detectadas no procedieran de células tumorales, sino del propio tejido sano o de células circulantes del sistema inmune (linfocitos, monocitos, etc.). En todo caso, si los perfiles de expresión se consiguen correlacionar clínicamente con momentos bien definidos de la enfermedad, este fenómeno también adquiere relevancia aun no siendo dependiente de las células tumorales. Se trataría de un epifenómeno, pero con valor diagnóstico o pronóstico. Esto podría estar ocurriendo con la detección de c-MYC en PBMC. Aunque en este trabajo se ha utilizado solo un control sano (una muestra escasa) hay publicaciones con resultados contradictorios. Es destacable, sin embargo, que no existe ninguna publicación hasta la actualidad en la que se evalúe la proteína c-MYC plasmática ni derivada de PBMC. Los trabajos existentes, muy escasos, se refieren siempre a la amplificación de ADN de c-MYC, lo cual no tiene por qué tener relación con el nivel de proteína. Por lo tanto, este es

el primer estudio publicado en el que se aborda esta cuestión. La cantidad total de proteína celular está relacionada con la fase del ciclo celular dominante en la población celular que se esté considerando. La variación de concentración de proteínas intracelulares, por ejemplo, entre linfocitos inactivados (en  $G_0$ ) y estimulados ( $G_1$  y/o  $G_2$ ) es de 20 o 30 veces (Engelhard et al. 1991).

Por todo lo anterior cabría esperar, dado que en sangre periférica las PBMC no tumorales (linfocitos, fundamentalmente) no están activadas, que los incrementos en la concentración de c-MYC de los extractos de PBMC, procederían de células tumorales. Según Park (Park et al. 2009), la detección por PCR de cMYC en plasma es capaz de distinguir pacientes con carcinoma gástrico de sanos con una sensibilidad de 75,4 y una especificidad de 76,9, aunque con un punto de corte más alto, la especificidad llega a 100%. En cáncer de próstata también se ha cuantificado c-MYC, en este caso por FISH tras un aislamiento de células tumorales circulantes basado en la presencia o no de EpCAM (marcador epitelial). En todos estos casos se trata del ADN o del “gen” c-MYC, pero no de la proteína.

En conclusión, se demuestra que la presencia de células tumorales circulantes tiene un impacto en la presencia de la proteína c-MYC en los extractos de proteínas de PBMC en pacientes con cáncer.

### 7.1.2 La hiperoxia como factor inductor de un incremento de captación de glucosa en las células tumorales.

En el cuarto trabajo aquí presentado se demuestra que la 2-deoxiglucosa marcada (y por tanto la glucosa) se incorpora a las células tumorales de cáncer de mama (MCF7) con mucha más intensidad que en las células mamarias benignas y que en las células hematopoyéticas mononucleares. Ambos hechos fundamentan el diseño de un método universal para la enumeración y posterior caracterización de células tumorales circulantes, al menos en el caso del cáncer de mama. Este hallazgo abre las puertas a una nueva estrategia de biopsia líquida.

Sorprendentemente, en un medio hiperóxico las células tumorales incrementan esta captación de glucosa. Esto es un hecho apenas explorado o descrito en publicaciones anteriores. La mayor parte de las publicaciones estudian ambientes de hipoxia o de normoxia (Marchiq et al 2016, Mohlin, et al. 2016, Schito and

Smenza 2016, Vadde et al. 2017) dado que es la situación habitual en los tumores reales (en el tejido tumoral) debido a su escaso aporte sanguíneo. Con este hallazgo se plantea la hipótesis de que las células tumorales privilegiarían una vía metabólica volcada a la síntesis de biomasa más que a la generación de energía (el efecto Warburg sería su expresión). El oxígeno tendería a invertir esta situación, desviando los recursos de glucosa hacia la fosforilación oxidativa, por lo que las células tumorales requerirían más glucosa para mantener la situación en equilibrio. Hasta ahora no se había descrito el efecto de incremento de captación de glucosa que la hiperoxia induce en las células malignas.

## 7.2 Perspectivas

La metodología aquí presentada requiere una validación clínica para definir su sensibilidad, especificidad, así como curvas ROC. Pero su utilidad no se limita a la aplicación específica de las dianas que se han definido en este trabajo (c-MYC o RAS). Se trata de pruebas de concepto que suponen la primera fase de estudios clínicos posteriores. Los dispositivos presentados son ampliables a otras dianas.

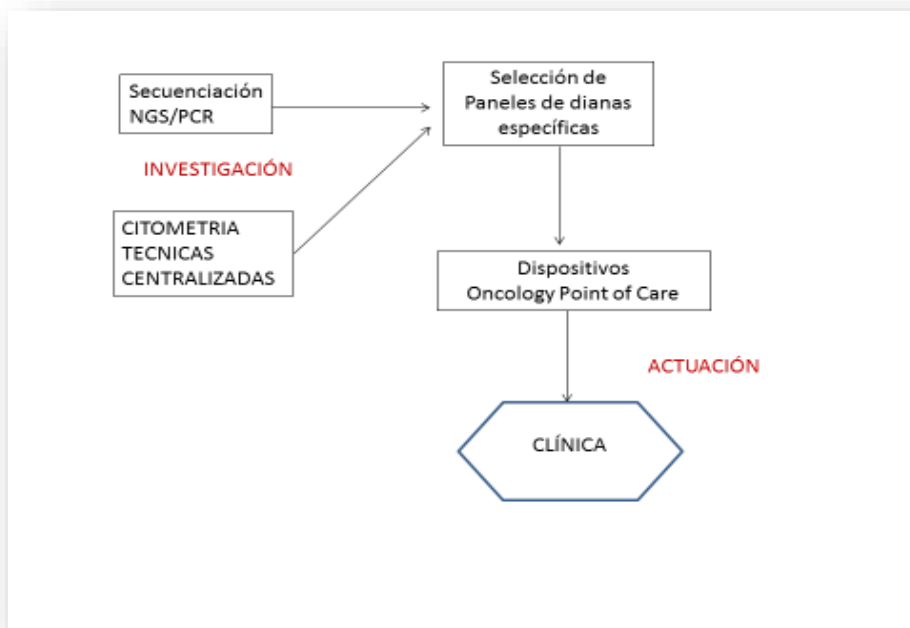


Figura 46: Aplicación práctica de los hallazgos.

Por su sencillez de uso y bajo coste, dichos dispositivos pueden constituir un instrumento clínico accesible una vez que las dianas han sido definidas por los estudios centralizados. En la Figura 46 se muestra como los procesos de selección de paneles de biomarcadores (investigación básica) convergen al aplicarse en dispositivos y plataformas basadas en la tecnología que aquí se presenta.

La Figura 47 esquematiza los dos objetivos clínicos de las técnicas propuestas. Por una parte, determinar la carga de enfermedad (con todas sus implicaciones pronósticas, predictivas, detección de enfermedad residual o detección de recaídas, etc.). Por otra parte, caracterizar la enfermedad o sus modificaciones en el tiempo. Las cuatro tecnologías presentadas se integran en este esquema clínico común.

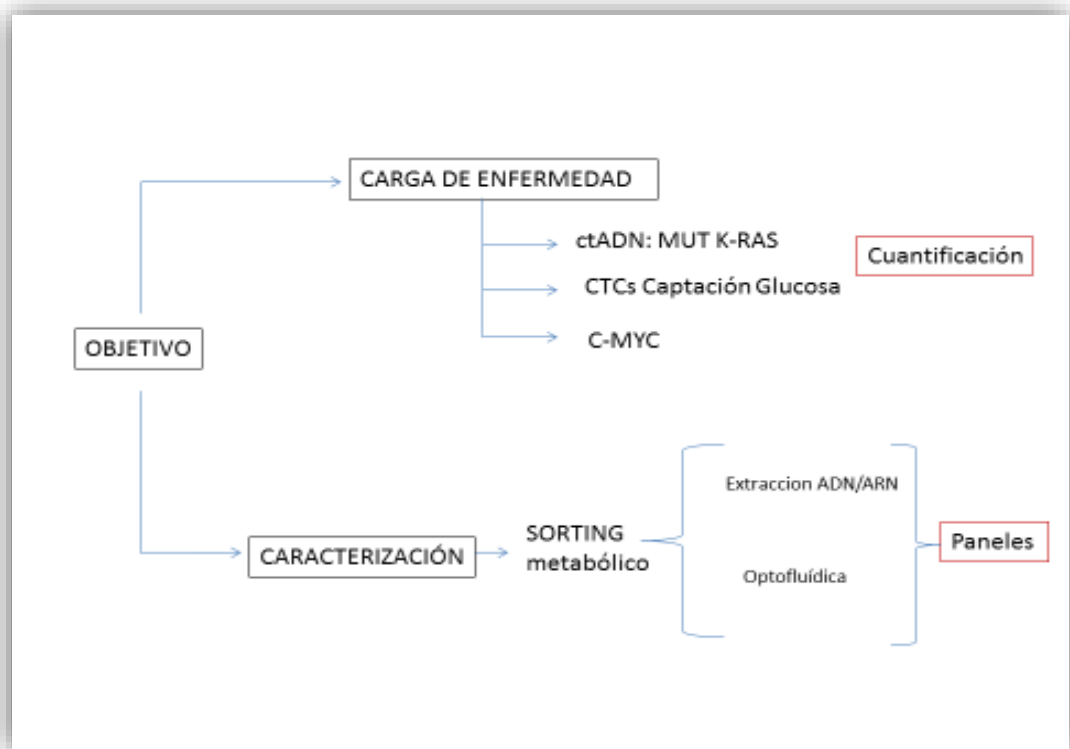
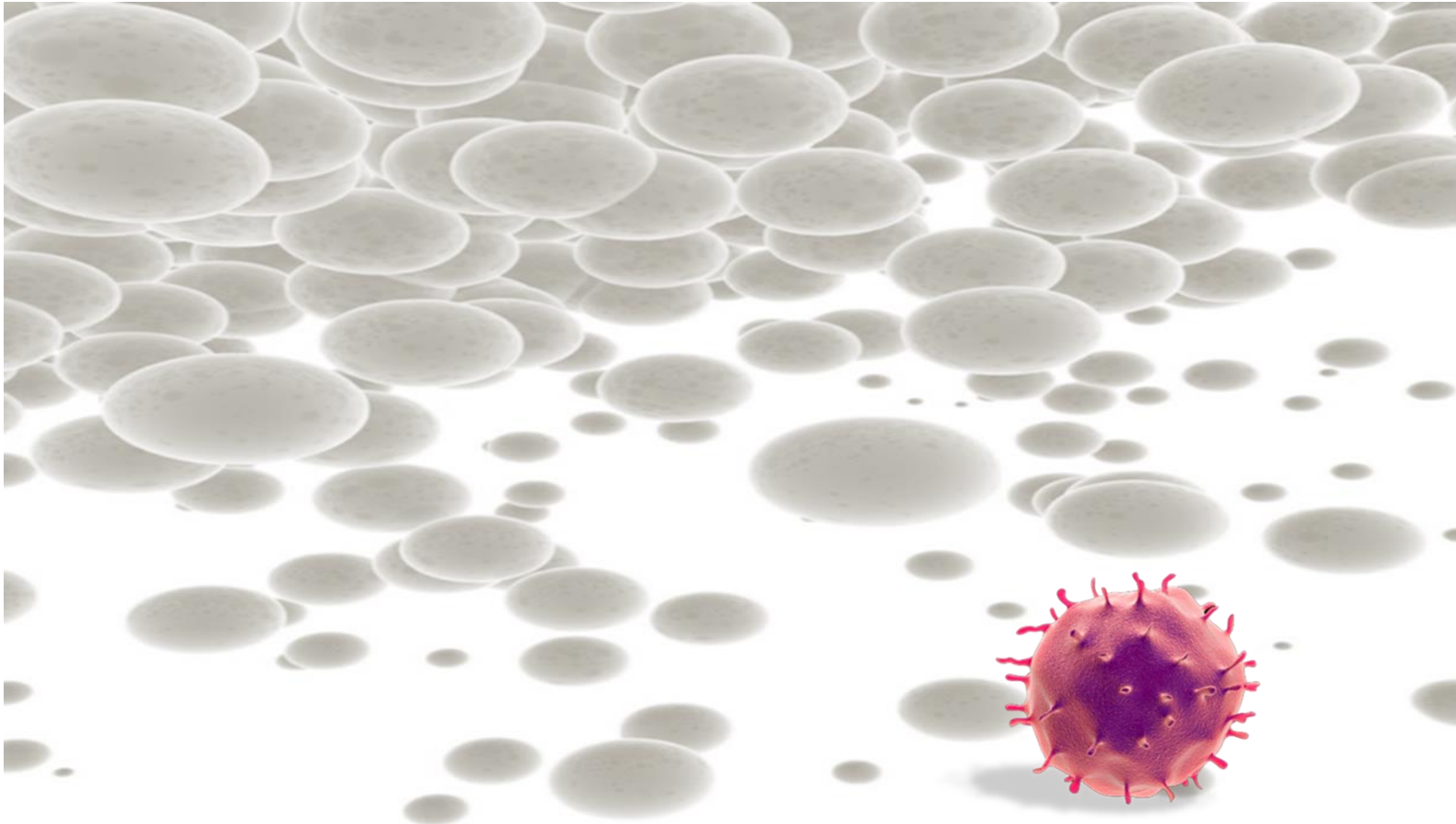


Figura 47: Diagrama del proceso de aplicación clínica de las técnicas de biopsia líquida propuestas.







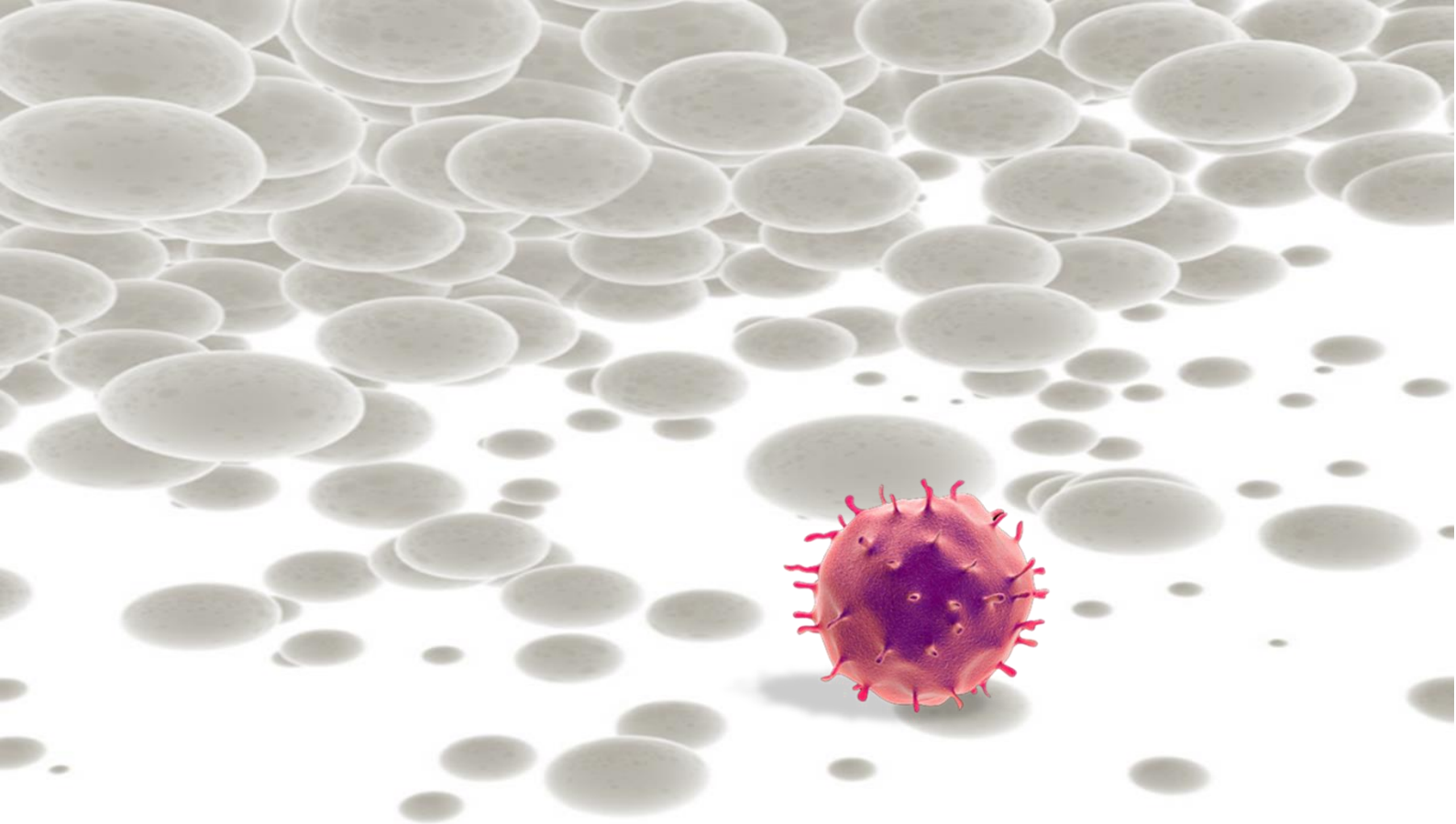
## 8 CONCLUSIONES GENERALES





1. En esta tesis doctoral se ha demostrado una nueva estrategia basada en la técnica SERS sin marcaje para la detección de mutaciones puntuales en grandes fragmentos de ADN. El potencial de esta técnica sensible, rápida, directa y barata para el diagnóstico queda demostrado en la clasificación inequívoca de mutaciones clínicamente relevantes en el oncogén K-RAS. Es preciso validar tanto experimental como clínicamente en ensayos prospectivos su aplicación clínica como biopsia líquida. En la actualidad, aún no hay ninguna tecnología validada.
2. Se ha construido un receptor peptídico capaz de heterodimerizarse con la proteína c-MYC, de forma que cuando esto ocurre las alteraciones conformacionales que tienen lugar son transducidas a variaciones características y específicas en el espectro SERS del receptor. Ha quedado demostrada su efectividad frente a ELISA, técnica estándar.
3. Se ha planteado y demostrado un abordaje nuevo para la detección indirecta de células tumorales circulantes a partir de la proteína c-MYC, proteína que por encontrarse elevada en más del 70% de los tumores, puede convertirse, mediante la metodología propuesta en esta tesis, en un nuevo biomarcador indirecto de la presencia y cantidad de células tumorales circulantes.
4. Se ha diseñado y fabricado un chip optofluídico hidrodinámico de bajo coste con todas las ópticas integradas, con el fin de realizar biopsias líquidas. Este chip confina la muestra de tal modo que ha permitido detectar células individuales, proporcionando, por lo tanto, una herramienta eficaz para cuantificar el número de células tumorales circulantes en una muestra líquida dada. El dispositivo se ha patentado y licenciado.

5. Se ha propuesto y demostrado una metodología nueva, que se ha denominado biopsia líquida metabólica, para la detección de células tumorales circulantes basada en las características metabólicas diferenciales de estas células (consumo de glucosa) y se ha demostrado su efectividad en cultivos, co-cultivos y pacientes reales. El método se ha patentado y licenciado.
  
6. Se ha descrito por primera vez el efecto de la hiperoxia en la captación de glucosa por las células malignas. Este efecto se ha utilizado para mejorar la discriminación del método de biopsia líquida metabólica.



## 9 REFERENCIAS GENERALES



- Alexander R, Spriggs A. The differential diagnosis of tumour cells in circulating blood. *J Clin Pathol*. 1960; 13(5):414-24.
- Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*. 2015; 21(8):846-53.
- Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869; 14(3):146-9.
- Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med*. 2013; 64:31-44.
- Boellaard R, Delgado-Bolton R, Oyen WJ, Giammarile F, Tatsch K, Eschner W, et al. FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015; 42(2):328-54.
- Brock A, Chang H, Huang S. Non-genetic heterogeneity—a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(5):336-42.
- Bruno W, Martinuzzi C, Andreotti V, Pastorino L, Spagnolo F, Dalmaso B, et al. Heterogeneity and frequency of BRAF mutations in primary melanoma: Comparison between molecular methods and immunohistochemistry. *Oncotarget*. 2017; 8(5):8069.
- lark W. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*. 1991; 64(4):631.
- Clark WH. The nature of cancer: morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncol*. 1995; 34(1):3-21.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8):781-91.
- Chen Y, Zhang J, Zhang X-y. 2-NBDG as a marker for detecting glucose uptake in reactive astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. *J Mol Neurosci*. 2015;55(1):126-30.
- Dall P, Koch T, Göhler T, Selbach J, Ammon A, Eggert J, et al. Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Early Breast Cancer: Results of a Prospective, Noninterventional Study on Routine Treatment Between 2006 and 2012 in Germany. *The Oncologist*. 2017; 22(2):131-8.
- Danhier P, Bański P, Payen VL, Grasso D, Ippolito L, Sonveaux P, et al. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *BBA-Bioenergetics*. 2017.
- Engelhard HH, Krupka JL, Bauer KD. Simultaneous quantification of c-myc oncoprotein, total cellular protein, and DNA content using multiparameter flow cytometry. *Cytometry*. 1991; 12(1):68-76.
- Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016; 10(3):374-94.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012; (366):883-92.

- Guerrini L, Krpetić Ž, van Lierop D, Alvarez-Puebla RA, Graham D. Direct Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of DNA Duplexes. *Angew Chem.* 2015; 127(4):1160-4.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.
- Hoffmann VS, Hasford J, Deininger M, Cortes J, Baccarani M, Hehlmann R. Systematic review and meta-analysis of standard-dose imatinib vs. high-dose imatinib and second generation tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017:1-8.
- Huang S, Li F, Zhou JX, Qian H. Processes on the Emergent Landscapes of Biochemical Reaction Networks and Heterogeneous Cell Population Dynamics. 2017.
- Jonathan D. Rapid translation of circulating tumor cell biomarkers into clinical practice: technology development, clinical needs and regulatory requirements. *Lab Chip.* 2014; 14(1):24-31.
- Jones BE. Optical fibre sensors and systems for industry. *Journal of Physics E: Scientific Instruments.* 1985; 18(9):770.
- Kotanen CN, Martinez L, Alvarez R. Surface Enhanced Raman Spectroscopy for the Rapid Detection and Identification of Microbial Pathogens in Human Serum. DTIC Document, 2014.
- Leon S, Shapiro B, Sklaroff D, Yaros M. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37(3):646-50.
- Mandel P, Metais P. Nucleic acids in human blood plasma. *CR Acad Sci Paris.* 1948; 142:241-3.
- Marchiq I, Pouysségur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H<sup>+</sup> symporters. *J Mol Med.* 2016; 94(2):155-71.
- McGranahan N, Swanton C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* 2017; 168(4):613-28.
- Millner LM, Linder MW, Valdes R. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Ann Clin Lab Sci.* 2013; 43(3):295-304.
- Millon SR, Ostrander JH, Brown JQ, Raheja A, Seewaldt VL, Ramanujam N. Uptake of 2-NBDG as a method to monitor therapy response in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 126(1):55-62.
- Miyamoto DT, Ting DT, Toner M, Maheswaran S, Haber DA, editors. *Single-Cell Analysis of Circulating Tumor Cells as a Window into Tumor Heterogeneity.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 2017: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mohlin S, Jögi A, Pählman S. Hypoxia and Cancer Stem Cell Regulation. *Tumor Hypoxia.* 2016:101.
- Mouliere F, Robert B, Peyrotte EA, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011; 6(9):e23418.
- Ngo H, Tortorella SM, Ververis K, Karagiannis TC. The Warburg effect: molecular

- aspects and therapeutic possibilities. *Mol Biol Rep.* 2015; 42(4):825-34.
- Norton L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res.* 1988; 48(24 Part 1):7067-71.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194(4260):23-8.
- O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol.* 2005; 7(6):388-92.
- Park KU, Lee HE, Park DJ, Jung EJ, Song J, Kim H-H, et al. MYC quantitation in cell-free plasma DNA by real-time PCR for gastric cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(5):530-6.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406(6797):747-52.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998; 95(8):4589-94.
- Redding WH, Monaghan P, Imrie S, Ormerod M, Gazet J-C, Coombes RC, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *The Lancet.* 1983; 322(8362):1271-4.
- Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 109:9-19.
- Rosell R, Dafni U, Felip E, Curioni-Fontecedro A, Gautschi O, Peters S, et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer and activating EGFR mutations (BELIEF): an international, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Respir Med.* 2017; 5(5), 435-444
- Salgado I, Hopkirk J, Long R, Ritchie A, Ritchie S, Webster D. Tumour cells in the blood. *Can Med Assoc J.* 1959; 81(8):619.
- Saxon JA, Sholl LM, Jänne PA. EGFR L858M/L861Q cis Mutations Confer Selective Sensitivity to Afatinib. *J Thorac Oncol.* 2017; 12(5):884-9.
- Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer.* 2016; 2(12): 758–70.
- Schwartz L, Seyfried T, Alfarouk KO, Moreira JDV, Fais S, editors. *Out of Warburg Effect: an effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH.* *Semin Cancer Biol;* 2017: Elsevier.
- Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and Monitoring of Cell-Free DNA in Blood of Patients with Colorectal Cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1137(1):190-6.
- Spremulli EN, Dexter D. Human tumor cell heterogeneity and metastasis. *J Clin Oncol.* 1983; 1(8):496-509.
- Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012; 72(19):4875-82.
- Tan SJ, Yobas L, Lee GYH, Ong CN, Lim CT. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed Microdevices.* 2009; 11(4):883-92.



Vadde R, Vemula S, Jinka R, Merchant N, Bramhachari PV, Nagaraju GP. Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; 113:22-7.

Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*: McGraw-Hill; 2002.

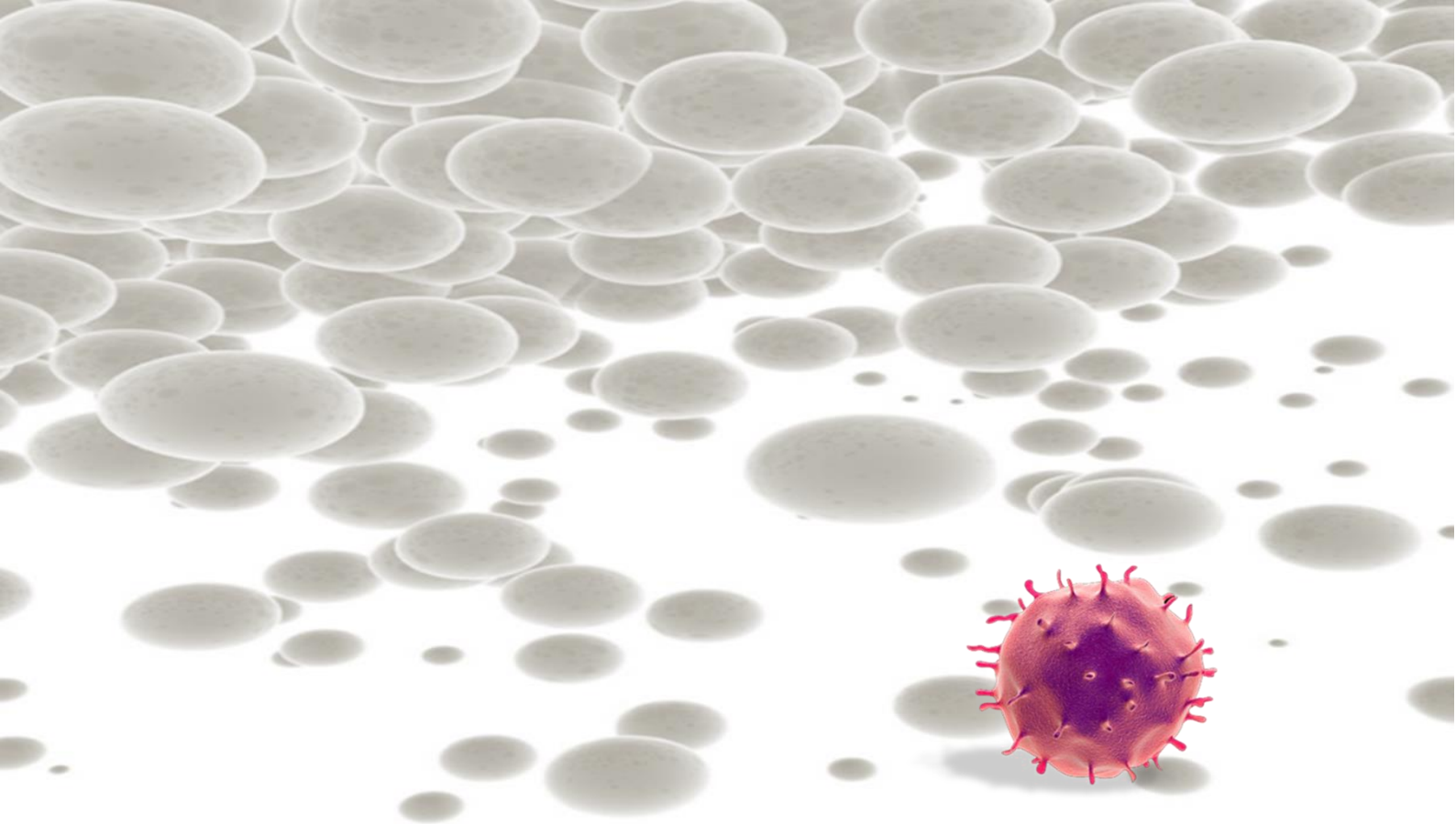
Watanabe S. The metastasizability of tumor cells. *Cancer*. 1954; 7(2):215-23.

Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, et al. Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncology research and treatment*. 2015; 38(3):117-22.

Zhang Z, Shiratsuchi H, Palanisamy N, Nagrath S, Ramnath N. Expanded Circulating Tumor Cells from a Patient with ALK-Positive Lung Cancer Present with EML4-ALK Rearrangement Along with Resistance Mutation and Enable Drug Sensitivity Testing: A Case Study. *J Thorac Oncol*. 2017; 12(2):397-402.

Zheng S, Lin H, Liu J-Q, Balic M, Datar R, Cote RJ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A*. 2007; 1162(2):154-61.





## 10 APÉNDICES



CONSIDERACIONES  
ÉTICAS Y LEGALES

CONSENTIMIENTO  
INFORMADO

RELACIÓN DE  
ARTÍCULOS Y  
CARACTERÍSTICAS

COPIA DE LOS  
ARTÍCULOS  
ORIGINALES

PATENTES



## A: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA



### INFORME DEL CEIC del GRUPO HM

La Dra. Almudena Lage, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Grupo Hospital de Madrid

#### CERTIFICA

Que el Comité del Grupo HM, ha evaluado en su reunión del 18 de diciembre de 2015, Acta N°85, la propuesta del Dr. Eduardo García Rico para que se realice el proyecto de investigación titulado:

#### **BIOPSIA LIQUIDA, NUEVO PROCEDIMIENTO NANOTECNOLOGICO PARA EL AISLAMIENTO Y ANALISIS DE CELULAS TUMORALES Y ACIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES**

Código CEIC Grupo HM: 15.12.897-GHM

Y habiendo valorado el proyecto desde un punto de vista ético y metodológico, se emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización del mismo por el Dr. Eduardo García Rico en el Hospital Universitario HM Torrelodones.

#### Miembros que pertenecen al Comité:

Dr. Santiago Ruiz de Aguiar, especialista en Farmacología Clínica.  
Dr. Iñigo Martínez-Gil, especialista en Medicina Intensiva  
Dra. Almudena Lage Moreda, Licenciada en Medicina y Cirugía  
D<sup>a</sup> Raquel Alcántara Partido, Licenciada en Farmacia.  
Dra. María José Ferreiro, especialista en Neumología.  
Dr. Miguel Ángel Reina, especialista en Anestesiología y Reanimación.  
Dr. Gerardo Romera, especialista en Pediatría.  
Dr. Eduardo García Rico, especialista en Oncología  
Dr. José Felipe Varona, especialista en Medicina Interna  
Dra. Cristina López-Ibor Alcocer, especialista en medicina familiar y comunitaria  
D<sup>a</sup> Cristina González Pérez, Farmacéutica de Hospital  
D<sup>a</sup> Mónica Alcalá, Diplomada en Enfermería.  
Dra. Yolanda Quijano, especialista en Cirugía General y Digestiva  
Dr. Juan Francisco Rodríguez, especialista en Oncología  
Dra. Estela Vega, especialista en Oncología Médica.  
Dra. Jeannette Valero, especialista en Oncología Radioterápica.  
Dr. Manuel Marcos Fernández, especialista en Ginecología y Obstetricia.  
D<sup>a</sup> Rocío Díaz Sánchez, Licenciada en Químicas.  
Dña. Ofelia de Lorenzo, Licenciada en Derecho  
D. Ignacio García Gómez. Licenciado en Derecho  
Dña. María Teresa Espina Castrillo, Dto. Jurídico Hospital Madrid

C.E.I.C. Grupo Hospital de Madrid



Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.  
Que en caso de evaluar algún proyecto en el que un miembro es investigador/colaborador, éste se ausenta de la reunión durante la discusión del mismo.

Lo que firmo en Madrid a 30 de diciembre de 2015

Dra. Almudena Lage  
Secretaría CEIC Grupo HM

## **B: CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES**

### **1- CONSIDERACIONES LEGALES:**

Este estudio se llevará a cabo en cumplimiento con el protocolo, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la última versión de la Declaración de Helsinki, el Convenio de Oviedo sobre derechos humanos y biomedicina, así como cualquier norma y/o legislación que le sea de aplicación.

El investigador, cuando firma el protocolo, se adhiere a las instrucciones y procedimientos descritos en ellos y a la normativa legal vigente.

### **2-CONSIDERACIONES SOBRE LAS MUESTRAS:**

Las muestras para la realización de este estudio serán analizadas y custodiadas en los centros previamente reseñados para tal efecto. Las muestras serán recogidas en tubos convencionales de analítica o en tubos especiales (diseñados para el mantenimiento prolongado de muestras recién extraídas -72 h-). Una vez procesadas las muestras serán destruidas.

Las muestras serán únicamente utilizadas para la investigación propuesta en este protocolo. Bajo ninguna justificación las muestras saldrán de la custodia aquí definida.

### **3-BENEFICIOS Y RIESGOS POTENCIALES PARA LOS PACIENTES:**

Pueden no existir beneficios potenciales para los pacientes participantes en este proyecto. Sin embargo, el mayor conocimiento de métodos de diagnóstico precoz, screening, pronóstico y monitorización de tratamientos, podrá redundar en una mejoría general de los métodos actualmente en uso.

Por lo que se refiere a los riesgos, no hay ningún riesgo asociado a la participación en este estudio, ya que no se realiza ninguna exploración y/o procedimiento

adicional. Tampoco hay visitas específicas, ya que estas coincidirán con la práctica habitual.

#### 4-INFORMACIÓN AL PACIENTE:

La información al paciente se suministrará tanto de forma oral como escrita, en un vocabulario legible y comprensible para un profano en esta materia.

El investigador conservará el consentimiento informado firmado en un archivo y deberá documentarse, además, en los registros médicos de los pacientes.



## C: CONSENTIMIENTO INFORMADO

### UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA.

En el *[Nombre del Hospital]*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. **Solicitamos su autorización para utilizar el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.**

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

#### **Muestras biológicas e información asociada:**

***en ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.***

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (tejidos biológicos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en *[Nombre del Hospital]* hasta su utilización. El sobrante será destruido.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal clínico responsable de su asistencia podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que utilicen las muestras no podrán conocer ningún

dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad. La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

**Participación voluntaria. *Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura***

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

**Revocación del consentimiento: *si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.***

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del Biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

**Información sobre los resultados de la investigación: *se le proporcionará información si usted desea recibirla***

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información

relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO  
UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO  
ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Nombre y apellidos del donante.....  
DNI..... Edad.....

Persona del centro que informa. ....  
DNI.....

El abajo firmante autoriza al Hospital [**Nombre del Hospital**] a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean utilizadas con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

**Confirmando que:**

1. Autorizo que el excedente de material biológico utilizado para pruebas diagnósticas y la información clínica asociada se utilice para investigación en los términos recogidos en el Documento de Información al Donante:  SI  NO

2. Deseo que se me comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para mi salud o la de mi familia  SI  NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autorizo a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI  NO Teléfono o E-mail de contacto:.....

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**DONANTE**  
Firma

**PERSONA QUE INFORMA**  
Firma

En....., a..... de..... de.....

**CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Nombre y apellidos del donante.....  
DNI..... Edad.....  
Nombre y apellidos del testigo que firma.....  
DNI.....  
Relación con el donante:.....  
Persona del centro que informa. ....  
DNI.....

**El abajo firmante confirma que el donante:**

1. Autoriza al Hospital [**Nombre del Hospital**] a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean utilizadas con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia  SI  NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI  NO Teléfono o E-mail de contacto: .....

4. Ha expresado su deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....  
.....  
.....  
.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

**TESTIGO**

**Firma**

**PERSONA QUE INFORMA**

**Firma**

En....., a..... de..... de.....

**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO  
UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**POR EL DONANTE:**

Yo, D./Dña ..... con DNI .....  
anulo el consentimiento prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo

## 10. Apéndices

proseguir la donación voluntaria al Biobanco [*Nombre del Biobanco*], que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

### **POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:**

Yo, D./Dña ..... con DNI ....., Como representante legal de D/Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al Biobanco [*Nombre del Biobanco*], que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

## D: CARACTERÍSTICAS DE LAS PUBLICACIONES ORIGINALES

	Andgewandte	Journal of the American Chemical Society (JACS)	Scientific Reports (Nature)	Oncotarget
<b>Impact Factor</b>	11,709	13,038	5,228	5,008
<b>Cuartil</b>	Q1	Q1	Q1	Q1
<b>Título</b>	Conformational SERS Classification of K-Ras Point Mutations for Cancer Diagnostics	Surface-Enhanced Raman Scattering Surface Selection Rules for the Proteomic Liquid Biopsy in Real Samples: Efficient Detection of the Oncoprotein c-MYC	Optofluidic Device for the Quantification of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer	Metabolic Pathway for the Universal Fluorescent Recognition of Tumor Cells
<b>Autores</b>	J Morla-Folch,P Gisbert-Quilis,M Masetti, E García-Rico, RA Alvarez Puebla, L Guerrini	E Pazos,M Garcia-Algar,C Penas,M Nazarenus,A Torruella,N Pazos, L Guerini,M E Vazquez, E Garcia-Rico,JL Mascareñas, RA Alvarez Puebla	E Pedrol,M Garcia-Algar,J Massons,M Nazarenuus,L Guerrini, J Martinez, A Rodenas, A Fernández,M Aguiló, L G Estévez,I Calvo, A Olano, E García-Rico, F Diaz, RA Alvarez Puebla	M Garcia-Algar,A Fernández, M Nazarenus, A Torres Nuñez, L Guerrini, N Feliu, WJ Parak, E García-Rico, RA Alvarez Puebla
<b>Datos de Publicación</b>	2017,56,2381-2385	2016, 138, 14206-14209	Aceptado, pendiente publicación	Aceptado, pendiente de “minor revision”

## Cancer Diagnostics

International Edition: DOI: 10.1002/anie.201611243  
German Edition: DOI: 10.1002/ange.201611243Conformational SERS Classification of *K-Ras* Point Mutations for Cancer DiagnosticsJudit Morla-Folch<sup>†</sup>, Patricia Gisbert-Quilis<sup>†</sup>, Matteo Masetti, Eduardo Garcia-Rico, Ramon A. Alvarez-Puebla,\* and Luca Guerrini\*

**Abstract:** Point mutations in *Ras* oncogenes are routinely screened for diagnostics and treatment of tumors (especially in colorectal cancer). Here, we develop an optical approach based on direct SERS coupled with chemometrics for the study of the specific conformations that single-point mutations impose on a relatively large fragment of the *K-Ras* gene (141 nucleobases). Results obtained offer the unambiguous classification of different mutations providing a potentially useful insight for diagnostics and treatment of cancer in a sensitive, fast, direct and inexpensive manner.

**R**as family of proto-oncogenes consists of three functional genes with similar structure and sequence (*H-Ras*, *N-Ras* and *K-Ras*).<sup>[1]</sup> In particular, the *K-Ras* encoded GTP binding protein sits at the center of many signal transduction pathways, controlling mechanisms of cell growth and differentiation.<sup>[2]</sup> Single nucleotide mutations in *K-Ras* (with codon 12 and 13 of exon 2 as the most frequently mutated sites, and codon 17 as an infrequent but clinically relevant mutated site)<sup>[3]</sup> yield highly oncogenic responses with the largest incidence of colorectal, lung, and pancreatic cancer.<sup>[4]</sup> Currently, specific treatments are applied according to the different disorders associated with the distinct *K-Ras* mutation.<sup>[5]</sup> Therefore, the determination of the *K-Ras* punctual mutations is essential for diagnosis and prognosis.<sup>[6]</sup>

During the last few years, the label-free direct surface-enhanced Raman scattering (SERS) characterization of

nucleic acids (NAs) has evolved rapidly.<sup>[6]</sup> However, the detection of single-point mutations has been limited so far to small fragments (sequences shorter than 25 nucleotides, 25-nt).<sup>[6]</sup> In these short fragments, changes introduced in the SERS spectra of NAs by single-base substitutions are mostly related to the relative intensity increase of the vibrational features ascribed to the new nucleobase with respect to those associated with the removed base.<sup>[6]</sup> However, for large NA fragments this class of vibrational changes is undetectable. Fortunately, the SERS spectra of NAs is not the merely weighted sum of individual contributions from each structural sub-units.<sup>[7]</sup> If base composition plays the major role in defining the vibrational profile, secondary and tertiary structures resulting from hydrogen bonding, ring stacking and chain folding, confers a second layer of characteristic spectral differentiation.<sup>[8]</sup> Under non-denaturing conditions, single-stranded DNA (ssDNA) fragments can fold into unique 3D conformational geometries molded by intramolecular interactions delineated by the specific nucleobase sequence.<sup>[9]</sup> Outstandingly, even single-base substitutions can produce changes in the secondary structure which can be detected by monitoring the diverse mobility of the ssDNA fragments on a non-denaturing electrophoresis gel.<sup>[9]</sup> This process laid the foundation for the development of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique, widely used in molecular biology as a mutation scanning technology.<sup>[9,10]</sup> The length of the ssDNA plays a key role in determining the single-base discrimination sensitivity of SSCP, with 100 to 600-nt being approximately the optimal size range.<sup>[10]</sup> In fact, while single base substitution has lesser chance to significantly perturb the overall folded state in exceedingly long ssDNA, too small fragments show reduced ability to form stable and reproducible high-order structures.<sup>[11]</sup>

Here, we exploit the concept of SSCP to develop a fast, simple and label-free method, which combines SERS with partial least square discriminant analysis (PLS-DA), for discriminating long ssDNA fragments with single-base sensitivity. Such an "SSCP-derived" label-free SERS approach classifies ssDNAs based on the unique strand conformations imposed by different point mutations, rather than by changes in the base composition. This allows overcoming the intrinsic limitations of previously reported direct SERS methods which were restricted to the detection of point mutations in very short strands, thus hampering their implementation into real-life applications. As a proof-of-concept, we illustrate the potential of this technique by using long fragments (141-nt) of the *K-Ras*<sup>[12]</sup> gene containing different clinically relevant

[†] J. Morla-Folch,<sup>[1]</sup> P. Gisbert-Quilis,<sup>[1]</sup> Prof. Dr. R. A. Alvarez-Puebla  
Department of Physical Chemistry  
Universitat Rovira i Virgili  
Carrer de Marcellí Domingo s/n, 43007 Tarragona (Spain)  
E-mail: ramon.alvarez@urv.cat

J. Morla-Folch,<sup>[1]</sup> P. Gisbert-Quilis,<sup>[1]</sup> Dr. L. Guerrini  
Medcom Advance S.A.  
Av. Roma, 08840 Barcelona (Spain)  
E-mail: luca.guerrini@ctqc.org

Dr. M. Masetti  
Department of Pharmacy and Biotechnology  
Alma Mater Studionum-Università di Bologna  
via Belmeloro 6, 40126 Bologna (Italy)

Dr. E. Garcia-Rico  
Department of Clinical Oncology, Hospital Universitario  
HM Torrelodones, 28250 Madrid (Spain)  
Prof. Dr. R. A. Alvarez-Puebla  
ICREA, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona (Spain)

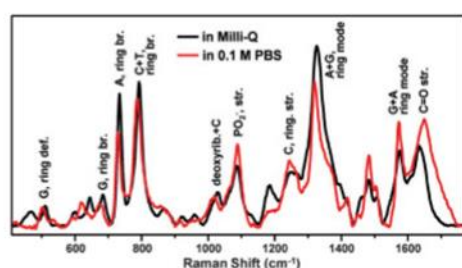
[\*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201611243>.



point mutations and supporting the experimental results with theoretical calculations.<sup>[13]</sup>

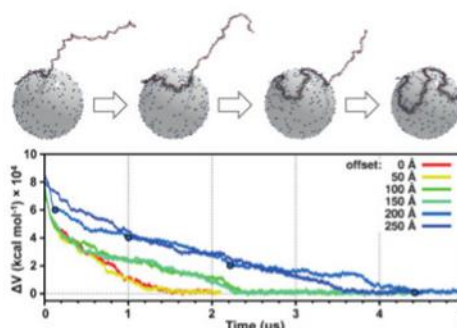
Long ssDNA consists of a linear chain of nucleotides with thin diameter and high flexibility that, under physiological conditions, normally form stacked domains interspaced with other domains with random-coiled configuration.<sup>[14]</sup> However, at a low salt solution ( $\leq 2$  mM NaCl), the dominant electrostatic repulsions between the negatively charged phosphates in the backbone largely prevent the nucleobases of ssDNA with relatively random sequence from approaching and pairing by hydrogen bonding.<sup>[15]</sup> This structural reorganization is clearly reflected in the SERS spectra of a 141-nt strand (wild-type, WT<sub>141</sub>; Figure 1), obtained by adding



**Figure 1.** SERS spectra of the 141-nt ssDNA (WT<sub>141</sub>) in low salt and high salt solutions. DNA concentration was kept constant to 2  $\mu$ g per 100  $\mu$ L of colloids. The SERS samples were prepared by adding an aliquot of ssDNA solution to colloids (both solutions were at 25 °C).

equimolar amounts of ssDNA, either dissolved in Milli-Q water or in phosphate buffered saline (PBS, 0.1M), to AgNP@Sp colloids (see Figure S1 in the Supporting Information).<sup>[6c,30]</sup> The transition from low to high salt concentration determines an extended spectral reshaping consisting of a set of changes which matches those observed when individual single-strand units are hybridized into the corresponding duplex.<sup>[6c]</sup> These include, among others, the large redshift of the carbonyl stretching modes at 1650  $\text{cm}^{-1}$ , which is informative of the formation of Watson–Crick hydrogen bonds, as well as the blue-shifts of the ring-breathing modes at 680, 730, and 790  $\text{cm}^{-1}$  (corresponding to the guanine, adenine, and cytosine + thymine residues, respectively) which are associated with base stacking.<sup>[6c]</sup> Thus, when ssDNA fragments are dissolved in the AgNP@Sp low salt solution ( $[\text{NaCl}] < 1$  mM), they initially exist in the bulk mainly in an elongated form,<sup>[15]</sup> then followed by their rapid adsorption and wrapping around the cationic nanospheres that act as compaction agents.<sup>[17]</sup>

The relative chain-per-nanoparticle size ratio is expected to play a major role in determining the final DNA conformation on the 3D nanoscale object. This is well reflected by the molecular dynamics (MD) simulations of the binding of long 141-nt and short 20-nt segments to cationic nanoparticles of about 23 nm in diameter. Figure 2 shows the electrostatic energy of the 141-nt strand/AgNP@Sp systems at low salt concentration plotted against time. A total of six



**Figure 2.** Molecular dynamics simulation of the adsorption and wrapping process of 141-nt ssDNA at low salt concentration. The difference in electrostatic energy is plotted against time for six different starting geometries (offset between the nanoparticle and the center of the single-strand sequence ranging from 0 to 250 Å). Representative configurations are reported for the starting geometry with an offset of 200 Å (blue circles in the plot). In the simulation snapshots, the DNA backbone is shown as a red tube, while positive charges on the nanoparticle are displayed as blue spheres. For clarity, the nanoparticle model is rendered as a single white sphere.

starting geometries were studied, differing by the position of the nanoparticle with respect to the axis of the single-strand sequence (offset 0–250 Å from the center to the end). As it can be seen, the electrostatic energy rapidly decreases in time with an approximately exponential decay for all the investigated geometries. Representative configurations extracted from one trajectory demonstrate that the energy plateau corresponds to states where the whole single strand was completely wrapped on the nanosphere surface. This behavior should be compared with equivalent simulations performed at high salt concentrations (Figure S3), showing that much longer times are required to converge the energy. In one case (offset = 200 Å), the wrapping process was not even completed within the total simulation time (10  $\mu$ s), mirroring a substantially less efficient adsorption process. Conversely, the binding process of 20-nt ssDNA at low salt concentration turned out to be straightforward, with the short strands rapidly relaxing over the surface right after establishing favorable interactions with the surface positive charges (Figure S4).

Direct SERS classification of long ssDNAs with point mutations was performed on 141-nt segments of *K-Ras* gene, extending from the end of intron 1 to exon 2 of chromosome 12 (Figure S5). All 141-nt sequences were designed considering the recognition sites for different restriction endonuclease enzymes, such as CviAII and Hpy166II. Point mutations were selected among those for which testing should be performed in patients.<sup>[18]</sup> The first sample (WT<sub>141</sub>) corresponds to the wild-type sequence while the remaining four (MTx<sub>141</sub>, where  $x = 1$  to 4) contain from one to three mutations spread at the codons 12, 13, and 17 (Table S1). On the other hand, two sets of shorter homologous ssDNA fragments (20-nt and 35-nt) including the codon 12–17 region (Tables S1 and S2) were

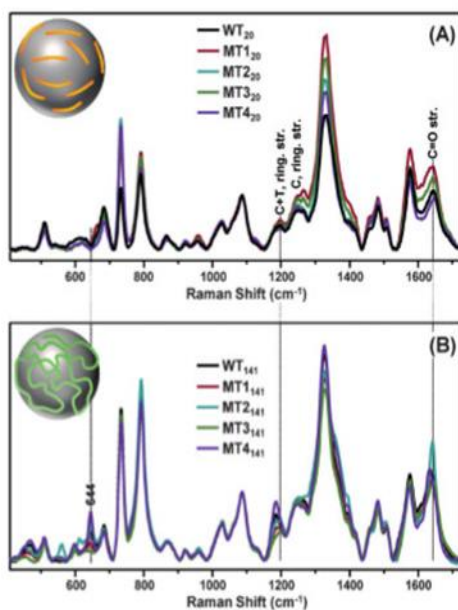


similarly analyzed by SERS to evaluate the impact of the strand length on the ability to discriminate base substitutions. Notably, the efficient electrostatic interaction between the negatively charged phosphate backbone of DNA and the spermine ligands, bound at the metal surface, enables the rapid nanoparticle aggregation into highly SERS-active and stable clusters in suspension yielding intense, well-defined, and reproducible SERS spectra, independently of the chain length.<sup>[6c, 96]</sup>

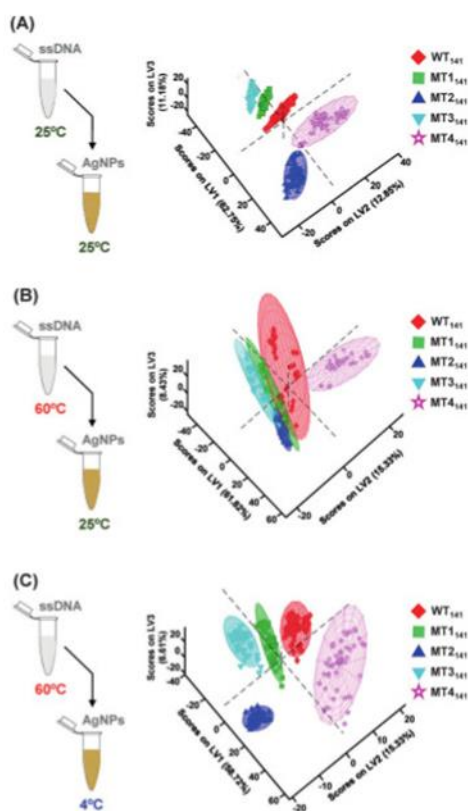
Figure 3A shows the resulting SERS spectra of 20-nt ssDNA samples. The spectra were baseline corrected and normalized to the phosphate stretching band at  $1089\text{ cm}^{-1}$ , which is largely insensitive to base stacking or temperature.<sup>[19]</sup> The SERS signatures of these short strands exhibit evident differences, which are mostly dominated by alterations of the relative intensities attributable to the heterogeneous base composition. Direct comparison of the SERS data by difference SERS spectroscopy (Figure S6) helps to visualize these changes, generating SERS difference spectra containing positive and negative features, respectively, associated with the introduced and the replaced nucleobases. Identification of single-base sensitivity is achieved as previously described in the literature.<sup>[6a]</sup> However, new light can be shone on the discrimination capabilities of direct SERS when partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA), a well-established

and statistically robust classification method, is performed on the SERS datasets from 20-nt ssDNA samples. In fact, class predictions calculated by the PLS-DA supervised model and encompassing 54 spectra per sample (Figure S7) show that not only sample groups of 20-nt ssDNA with different base composition (WT<sub>20</sub>, MT1<sub>20</sub>, MT2<sub>20</sub>, and MT4<sub>20</sub>) can be distinguished with 100% sensitivity and specificity but also for strands which differ only in their base sequence (MT3<sub>20</sub> and MT4<sub>20</sub>). In this latter case, the spectral differences are subtler than for samples with different base composition; nonetheless, PLS-DA assigns the samples into two statistically close but still differentiable classes. This is consistent with normal Raman studies that showed how base-sequence can potentially add a further layer of spectral differentiation among Raman signatures of DNA with identical base composition but different primary structure.<sup>[7]</sup>

Extension of the ssDNA from 20-nt to 35-nt yielded very different results. Dilution of the single-base mutations over such chain length suppresses the capability of the direct SERS method at detecting base substitution, independently of the type and position of the mutation (Figure S8A). Accordingly, PLS-DA model no longer classifies the samples into statistically different classes (Figure S8B). Outstandingly, when point mutations are otherwise included in 141-nt fragments, SERS spectra consistently reveal well-distinguishable vibrational profiles (Figure 3B and Figure S9), yielding full discriminatory power with single-base sensitivity (Figure 4A). In particular, SERS spectra of long ssDNAs display a new feature at  $644\text{ cm}^{-1}$  which has been ascribed to A + G ring stretching weakly coupled with deoxyribose vibrations.<sup>[19]</sup> This band is diagnostic of a *C3'-endo/anti*-nucleoside conformation, a spectral marker associated to an A-form of the DNA backbone,<sup>[8b]</sup> which nonetheless still co-exists with the intense G ring breathing band at  $684\text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the *C2'-endo/anti* conformation of the B-form backbone.<sup>[8b, 30]</sup> This result shows a transition from regularly ordered backbone geometry of type B, as revealed in short 20-nt and 35-nt ssDNA (Figure 3A and Figure S8A), to a broader set of different conformations for 141-nt fragments. A similar shift in conformation was determined by normal Raman studies when the protein-free single-stranded genome of bacteriophage  $\Phi$ X174 in solution was packed into the viral capsid.<sup>[19]</sup> Likewise, we can suggest that geometrical constraints imposed by the interaction with cationic nanoparticles may possibly reduce the degree of secondary structure order in long ssDNAs. Moreover, differently to what observed for short strands, the spectral changes of the 141-nt ssDNA SERS signatures are not uniquely associated with alterations of relative band intensities but significant peak shifts are also observed, such as those of the C + T ring stretching at  $1180\text{ cm}^{-1}$  and the ensemble of carboxyl vibrations approximately centered at  $1640\text{ cm}^{-1}$  (Figure 3B). PLS-DA was performed on the 141-nt DNA SERS spectra allowing the classification of the five different fragments (Figure 4A). The role of the specific nucleobase substitution on the discriminatory capability was further investigated by direct SERS analysis of 141-nt fragments with different single base variants in codon 12 (specifically: G  $\rightarrow$  A, G  $\rightarrow$  T and G  $\rightarrow$  C, Figure S10). Similarly, PLS-DA was used to establish statistically



**Figure 3.** SERS spectra of A) 20-nt and B) 141-nt ssDNA. All spectra were normalized to the  $\nu\text{PO}_2^-$  band at  $1089\text{ cm}^{-1}$ . The illustrated spectra are obtained by averaging 54 spectra from 18 independent replicas per sample (three measurements per each replica). The DNA concentration was kept constant to  $2\text{ }\mu\text{g}$  per  $100\text{ }\mu\text{L}$  of colloids. SERS samples were prepared by adding an aliquot of ssDNA solution to colloids (both solutions were at  $25^\circ\text{C}$ ).



**Figure 4.** Partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) of SERS spectra from 141-nt ssDNA. The score plots are represented by the first three latent variables (LV) and each spectrum is denoted by a data point within 95% confidence ellipses, their position is characteristic for each spectrum features. The analyzed SERS spectra were acquired from samples prepared by mixing an aliquot of ssDNA solution to colloids at different temperature: A) both at 25°C; B) thermally treated ssDNA solution at 60°C to colloids at 25°C; and C) thermally treated ssDNA solution at 60°C to colloids at 4°C.

significant differences between SERS spectra and, even for sequences with single-base substitution, the results showed 100% sensitivity and specificity (Figure S11). The outcome of the vibrational analysis is consistent with the picture provided by MD simulations. There, short strands extend over the nanoparticle in a linear fashion, sensing the metallic surface as almost flat. Under this scenario, conformational differences between strands are minimized and the discrimination between their corresponding SERS profiles largely relies on the weighted contributions of individual nucleobases. Differently, when ssDNA length is enlarged to the point where the

sequence is forced to bend and fold around the nanobject, that strand-to-strand geometrical homogeneity is lost, as also reflected in the spectral changes in the SERS spectra of long fragments.

For comparison, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was also carried out on the 141-nt fragments (Figure S12). SSCP electrophoresis of DNA strands is extremely sensitive to a large set of experimental parameters which are routinely optimized in an empirical fashion.<sup>9,10</sup> Accordingly, we conducted several SSCP measurements under different conditions, which allowed us to finally resolve double- and triple-point mutations from wild-type but not single-base substitution (Figure S12D). While we cannot rule out that a more extended optimization process would enable the identification of a specific set of experimental conditions more suitable for the successful SSCP discrimination of all investigated sequences, these results clearly demonstrate the efficiency of our SERS method at differentiating point mutations in a much simpler and reproducible fashion. To this aim, the dependence of the discrimination sensitivity of the direct SERS method from key experimental variables was examined. Specifically, as the compacting agent (nanoparticles) and ionic strength are fixed parameters in our SERS experiments, we selected temperature ( $T$ ) as the experimental variable since  $T$  is well-known to affect the high ordered structure of long ssDNA.<sup>21</sup> SERS spectra illustrated in Figure 3B and statistically classified in Figure 4A, were obtained by mixing aliquots of ssDNA solutions and colloids both at 25°C. On the other hand, when ssDNA solutions were previously thermally treated at 60°C for 15 minutes and then directly added to cationic colloids (kept at 25°C), a general decrease of discrimination efficiency was observed (Figure 4B). This result is consistent with the homogeneous chain extension that a thermal pre-treatment imposes on ssDNA strands,<sup>22</sup> thus removing any residual intramolecular interactions. Accordingly, the sensitivity is largely recovered when thermally treated fragments are instead mixed with colloids at 4°C (Figure 4C). In fact, low temperatures are expected to favor the efficient compaction of the DNA fragment<sup>21</sup> onto the metallic surface. In any case, it is worth stressing that SERS spectral profiles did not undergo major alterations upon such large temperature changes (Figure S13). This indicates that the electrostatic interaction of the flexible ssDNA chain with cationic nanoparticles remains the main driving force leading to the final higher-order structure, therefore providing the SERS method with high robustness against the intrinsic variability of normal test conditions.

In summary, we report a novel label-free SERS approach for the detection of point mutations in large DNA fragments. This methodology mimics the concept of the single-strand conformation polymorphism technique, by exploiting the large conformational changes that single- and multiple-base substitutions impose on long single-stranded chains. The potential of this sensitive, fast, direct, and inexpensive technique for diagnostics was demonstrated in the unambiguous classification of relevantly clinical mutations in *K-Ras* oncogene.

**Acknowledgements**

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions FP72014-623527) the Spanish MINECO (CTQ2014-59808R), the Generalitat de Catalunya (2014-SGR-480, AGAUR 2014-051 and AGAUR 2015-015), and Medcom Advance SA.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** cancer diagnostics · DNA · gene technology · Raman spectroscopy · sensors

**How to cite:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2381–2385  
*Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2421–2425

- [1] L. Goitre, E. Trapani, L. Tralbalzini, S. F. Retta, *Ras Signaling: Methods and Protocols* **2014**, *1120*, 1–18.
- [2] A. D. Cox, C. J. Der, *Small GTPases* **2010**, *1*, 2–27.
- [3] a) J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689; b) M. Macaluso, G. Russo, C. Cinti, V. Bazan, N. Gebbia, A. Russo, *J. Cell. Physiol.* **2002**, *192*, 125–130.
- [4] A. E. Karnoub, R. A. Weinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 517–531.
- [5] J.-M. Xu, X.-J. Liu, F.-J. Ge, L. Lin, Y. Wang, M. R. Sharma, Z.-Y. Liu, S. Tommasi, A. Paradiso, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2014**, *33*, 1.
- [6] a) E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9058–9061; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9224–9227; b) L.-J. Xu, Z.-C. Lei, J. Li, C. Zong, C. J. Yang, B. Ren, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5149–5154; c) L. Guerrini, Ž. Krpetić, D. van Lierop, R. A. Alvarez-Puebla, D. Graham, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1144–1148; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1160–1164; d) J. Morla-Folch, H.-n. Xie, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *ACS Nano* **2016**, *10*, 2834–2842; e) J. Morla-Folch, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 3037–3041.
- [7] H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biopolymers* **1999**, *50*, 656–666.
- [8] a) A. J. Hobro, D. M. Standley, S. Ahmad, N. I. Smith, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 13199–13208; b) J. M. Benevides, S. A. Overman, G. J. Thomas *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 279–299; c) D. Serban, J. M. Benevides, G. J. Thomas, *Biochemistry* **2002**, *41*, 847–853.
- [9] a) T. Kusakabe, K. Maekawa, A. Ichikawa, M. Uesugi, Y. Sugiura, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11669–11675; b) V. K. Kakavas, K. V. Konstantinos, P. Plageras, P. Panagiotis, T. A. Vlachos, V. T. Antonios, A. Papaioannou, P. Angelos, V. A. Noulas, N. V. Argiris, *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 155–163.
- [10] a) K. Hayashi, *PCR Meth. Appl.* **1991**, *1*, 34–38; b) A. J. Nataraj, I. Olivos-Glander, N. Kusukawa, W. E. Highsmith, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1177–1185.
- [11] V. C. Sheffield, J. S. Beck, A. E. Kwitek, D. W. Sandstrom, E. M. Stone, *Genomics* **1993**, *16*, 325–332.
- [12] National Center for Biotechnology Information (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS8702>.
- [13] COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- [14] A. Buhot, A. Halperin, *Phys. Rev. E* **2004**, *70*, 020902.
- [15] Y. Zhang, H. Zhou, Z. C. Ou-Yang, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1133–1143.
- [16] J. Morla-Folch, H.-n. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. Gómez-de Pedro, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13650–13654; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13854–13858.
- [17] A. Estévez-Torres, D. Baigl, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6746–6756.
- [18] C. J. Allegra, R. B. Rumble, S. R. Hamilton, P. B. Mangu, N. Roach, A. Hantel, R. L. Schilsky, *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 179–185.
- [19] J. M. Benevides, P. L. Stow, L. L. Ilag, N. L. Incardona, G. J. Thomas, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4855–4863.
- [20] K. Hayashi, D. W. Yandell, *Hum. Mutat.* **1993**, *2*, 338–346.
- [21] a) M. Orita, Y. Suzuki, T. Sekiya, K. Hayashi, *Genomics* **1989**, *5*, 874–879; b) Y. Suzuki, M. Orita, M. Shiraishi, K. Hayashi, T. Sekiya, *Oncogene* **1990**, *5*, 1037–1043.
- [22] A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N. J. Halas, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5523–5529.

Manuscript received: November 16, 2016

Revised: December 12, 2016

Final Article published: January 12, 2017



## Surface-Enhanced Raman Scattering Surface Selection Rules for the Proteomic Liquid Biopsy in Real Samples: Efficient Detection of the Oncoprotein c-MYC

Elena Pazos,<sup>†</sup> Manuel García-Algar,<sup>†,‡</sup> Cristina Penas,<sup>§</sup> Moritz Nazarenius,<sup>‡</sup> Arnau Torruella,<sup>†,‡</sup> Nicolas Pazos-Perez,<sup>‡</sup> Luca Guerrini,<sup>‡</sup> M. Eugenio Vázquez,<sup>§</sup> Eduardo García-Rico,<sup>\*,||</sup> José L. Mascareñas,<sup>\*,§</sup> and Ramon A. Alvarez-Puebla<sup>\*,†,⊥</sup>

<sup>†</sup>Universitat Rovira i Virgili and Centro de Tecnologia Química de Catalunya, Carrer de Marcellí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

<sup>‡</sup>Medcom Advance S.A., Av. Roma, 08840 Barcelona, Spain

<sup>§</sup>Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>||</sup>Department of Clinical Oncology, Hospital Universitario Hm Madrid-Torrelodones, 28250 Madrid, Spain

<sup>⊥</sup>ICREA, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

### Supporting Information

**ABSTRACT:** Blood-based biomarkers (liquid biopsy) offer extremely valuable tools for the noninvasive diagnosis and monitoring of tumors. The protein c-MYC, a transcription factor that has been shown to be deregulated in up to 70% of human cancers, can be used as a robust proteomic signature for cancer. Herein, we developed a rapid, highly specific, and sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) assay for the quantification of c-MYC in real blood samples. The sensing scheme relies on the use of specifically designed hybrid plasmonic materials and their bioderivatization with a selective peptidic receptor modified with a SERS transducer. Peptide/c-MYC recognition events translate into measurable alterations of the SERS spectra associated with a molecular reorientation of the transducer, in agreement with the surface selection rules. The efficiency of the sensor is demonstrated in cellular lines, healthy donors and a cancer patient.

The molecular characterization of tumors is consistently applied in clinical oncology to guide treatment decisions. These analyses are typically performed on solid tissues acquired through an invasive biopsy at diagnosis. However, tissue biopsies are challenging as they are costly, painful, or potentially risky for the patient. Thus, the development of noninvasive methods to detect and monitor tumors is a major need in oncology. Blood-based biomarkers (liquid biopsy)<sup>1</sup> have a considerable potential for the diagnosis and monitoring of cancer. Circulating tumor cells<sup>2</sup> and circulating tumor nucleic acids<sup>3</sup> are all options, alongside protein markers.<sup>1</sup> However, the protein expression patterns in plasma circulating tumor cells as well as in peripheral blood mononuclear cells fractions remain a largely unexplored aspect.<sup>1</sup>

The protein c-MYC is a helix–loop–helix leucine zipper (bHLHZ) transcription factor encoded by the corresponding

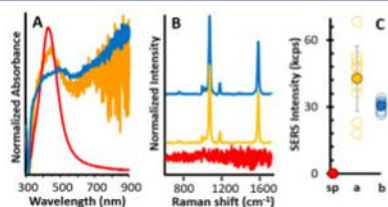
*c-myc* gene that plays a major role in coordinating cellular metabolism with cell cycle and has been shown to be elevated or deregulated in up to 70% of human cancers.<sup>4</sup> Unlike other proto-oncogenes whose activity is dependent on mutations, truncations, or gene fusions, the oncogenicity of the *c-myc* gene is usually secondary to loss of transcriptional control leading to overexpression and accumulation of normal protein.<sup>5</sup> Furthermore, the c-MYC protein is not associated with any specific transcriptional program, but it appears to be a universal amplifier of gene expression, increasing the transcription at all active promoters.<sup>6</sup> Thus, the evaluation of the concentration of this protein in blood can be used as a criteria for the diagnosis and monitoring of tumors.

Identification and quantification of proteins in blood is normally performed by using standard immunological techniques such as Western Blot (WB) or ELISA. Although robust, these methods are tedious, lengthy, expensive and, in the case of WB, have low sensitivity. In recent years, surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy<sup>7</sup> has emerged as an excellent alternative for the detection, quantification and characterization of biopolymers. SERS has been employed directly for ultrasensitive quantification of prionic,<sup>8</sup> green<sup>9</sup> or yellow<sup>10</sup> fluorescent proteins, and others.<sup>11</sup> Most of these determinations were carried out in lab solutions because the analysis of protein markers in real samples is extremely challenging due to both the intrinsic complexity of these samples and the usually low concentration (~pg/mL) and poor SERS cross section<sup>12</sup> of the targets. A possible solution relies on the functionalization of the plasmonic materials with chemical species (chemoreceptors) with high SERS cross section and displaying high binding affinity and specificity for the target protein.<sup>12</sup> In this approach, detection is determined by the spectroscopic changes in the chemoreceptor SERS spectrum upon binding with the target.<sup>13</sup> Species such as antibodies, aptamers, or peptides can be used as chemo-

Received: September 1, 2016  
Published: October 12, 2016

receptors.<sup>14</sup> However, these molecules are often characterized by a remarkable small SERS activity, which severely limits their application for direct ultradetection. This issue can be addressed by derivatizing the macromolecular receptor with a terminal moiety with high SERS cross section and affinity for the plasmonic surface to mediate the interaction between the receptor and the metallic substrate.<sup>14a</sup> In this communication, we designed and prepared a SERS-active peptide-conjugate (MB-H1) that binds c-MYC with high affinity and selectivity. Silica microbeads rather homogeneously coated with silver nanoparticles (SiO<sub>2</sub>@Ag) were appropriately biofunctionalized with the chemoreceptor (SiO<sub>2</sub>@Ag@MB-H1) and successfully used for the quantification of c-MYC protein on laboratory and real samples from healthy donors and a cancer patient.

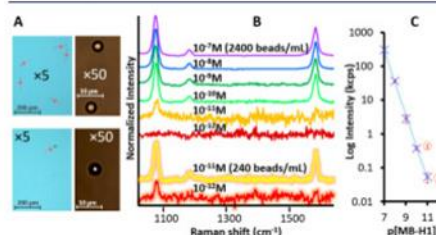
The chemoreceptor is based on a double mutant peptide (Ser<sup>20</sup>→Ala, Phe<sup>52</sup>→Ala) derived from the helix 1 of the helix-loop-helix region of c-MYC (S<sup>1</sup>NELKRAFAALRDQ<sup>128</sup>, H1), which is known to interact with high affinity and selectivity with c-MYC.<sup>15</sup> To build the SERS probe, we orthogonally attached a 4-mercaptobenzoyl unit (MB) to the side chain amino group of a Lys residue appended at the C-terminus of the H1 peptide. Such modification should not alter the intrinsic helical propensity of the peptide, or its c-MYC-binding properties. The synthesis of the MB-H1 peptide-conjugate is described in the Supporting Information (SI). Citrate-capped silver nanoparticles (AgNPs) of ca. 65 nm diameter (Figure S5A,B) were electrostatically deposited onto 8 μm diameter silica beads (SiO<sub>2</sub>@Ag). Previously, the negatively charged silica microparticles were sequentially coated with polyelectrolytes (polyethylenimine, PEI, positive), poly(acrylic acid) (PAA, negative), and again PEI, using the layer-by-layer (LbL) assembly protocol (Figure S5C–E).<sup>16</sup> The UV–vis spectrum of the prepared AgNPs (Figure 1A) shows



**Figure 1.** (A) UV–vis spectra of AgNPs in solution (red), aggregated on a glass slide (orange), and anchored on SiO<sub>2</sub> beads (blue). (B) SERS spectra of MB-H1 on nonaggregated (red) and aggregated AgNPs (orange) on glass slides, and on SiO<sub>2</sub>@Ag (blue). (C) Corresponding SERS intensities obtained by measuring the peak height of the band at 1075 cm<sup>-1</sup>.

a defined localized surface plasmon resonance centered at 449 nm. Nanoparticle deposition onto a solid support results in the appearance of an intense and broad feature at longer wavelength, which is an indicator of the interparticle coupling. The SERS fingerprint of MB-H1 on SiO<sub>2</sub>@Ag is shown in Figure 1B (blue curve). Remarkably, the SiO<sub>2</sub>@Ag offer large surface area, close adsorbent–adsorbate interaction and high density of electromagnetic hot spots, thus combining the benefits of colloids and films, while overcoming important limitations of both. In this regard, we also produced silver-coated glass slides via spin-coating of either nonaggregated (Figure S6B) or aggregated MB-H1-modified AgNPs to compare and evaluate the SERS efficiency of SiO<sub>2</sub>@Ag@MB-H1. Results (Figure 1B,C) indicate that no

appreciable SERS signal is observed for the nonaggregated AgNPs slides, whereas the aggregated AgNPs layer and SiO<sub>2</sub>@Ag display similar SERS intensities but with a smaller standard deviation for the case of beads. The large size of these beads allows their easy localization with a low magnification objective (e.g., ×5) for the later scanning with a higher resolution objective (e.g., ×50 or ×100) (Figure 2A). This paves the way for a drastic reduction of



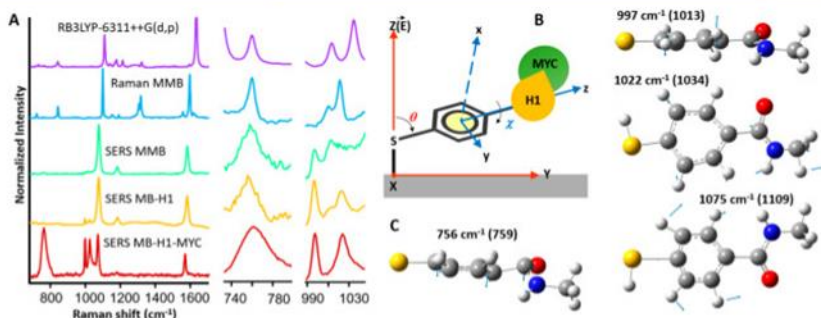
**Figure 2.** (A) Optical images at low (×5) and high (×50) magnification of beads from a 100 μL aliquot of suspensions with concentrations of 2400 (upper panels) and 240 (bottom panels) beads/mL. (B) SERS spectra of MB-H1 at different concentrations on SiO<sub>2</sub>@Ag (2400 beads/mL and, highlighted, 240 beads/mL), and (C) their corresponding intensity at 1075 cm<sup>-1</sup>.

the amount of plasmonic material required for sensing, which in turn improves the sensitivity by increasing the number of molecules per bead ratio. This is exemplified in Figure 2B,C, which shows that SERS of MB-H1 is distinguishable down to 10 pM for a particle concentration of 2400 beads/mL, whereas lower SiO<sub>2</sub>@Ag amounts (240 beads/mL) allow for detection down to 1 pM.

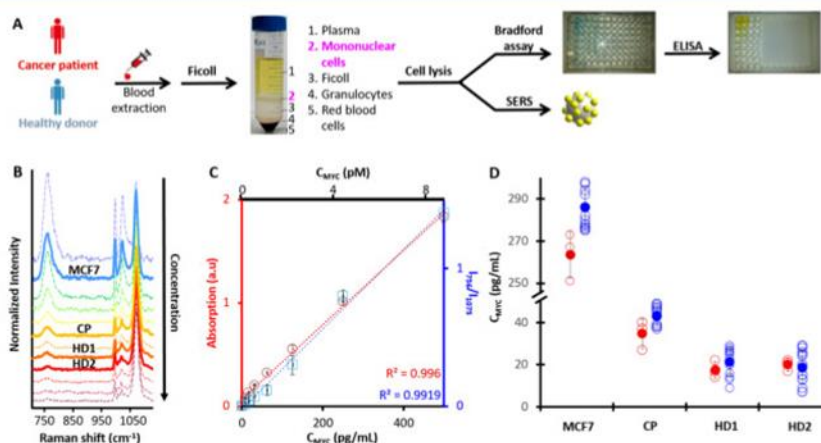
Capturing of the c-MYC target by MB-H1 bound to SiO<sub>2</sub>@Ag beads could result in a large set of different perturbations on the SERS spectra of the mercaptobenzoyl moiety, ranging from subtle shifts of the vibrational features to the appearance of new bands. For interpreting such variations, we acquired the Raman and SERS spectra of the SERS-active terminal moiety (4-mercapto-*N*-methylbenzamide, MMB), and those of MB-H1 before and after reaction with c-MYC (Figure 3A). The SERS spectra of MMB and MB-H1 display similar vibrational patterns but with some differences in relative intensities. This result points toward a slight change of the molecular orientation of the mercaptobenzene group on the silver surface when is coupled with a larger molecule such as H1, in full agreement with the surface selection rules.<sup>17</sup> Such perturbation is exacerbated upon binding with the very large c-MYC protein.

To identify the vibrational modes of the mercaptobenzene moiety that are more sensitive to its surface reorientation, we carried out DFT calculations on MMB at the RB3LYP-6311++G(d,p) theory level (Figure 3A).<sup>18</sup> Results indicate that MMB belongs to the C<sub>1</sub> point group of symmetry, implying that its structure is not planar. However, because of the strong interaction silver–thiol,<sup>19</sup> we can assume a quasi-perpendicular orientation of the phenyl ring onto the metal.<sup>20</sup> On the other hand, the surface electric field,  $E_s$ , effectively has only a normal component (Z direction in Figure 3B).<sup>21</sup> Based on these considerations, the intensity of a vibrational mode is proportional to the square of the scalar product of the electric field and the dipole moment derivative of the mode.<sup>22</sup> This scenario defines two degrees of freedom for the phenyl ring to change its orientation upon





**Figure 3.** (A) Theoretical and experimental Raman spectrum of MMB and SERS spectra of MMB, MB-H1, and MB-H1 in the presence of *c*-MYC, on SiO<sub>2</sub>@Ag. Magnification of the spectral windows between 730–800 and 990–1050 cm<sup>-1</sup> are also shown. (B) Model used in the estimation of the molecular orientation. Absolute orientation of the molecule on the surface and relative orientation of the ring over the surface are represented by XYZ and xyz axes, respectively. (C) Vibrational mode assignment based on DFT calculations (theoretical values are reported into brackets).



**Figure 4.** (A) Protocol for the isolation of mononuclear cells in human blood samples from a cancer patient and several healthy donors. (B) SERS spectra of SiO<sub>2</sub>@Ag@MB-H1 in the presence of decreasing concentrations of *c*-MYC (thin dotted lines) and of real samples (thick solid lines). (C) Calibration curves for ELISA (red) and our optical sensor (blue). (D) Results obtained for an epithelial tumor cell line (MCF7), and samples extracted from a cancer patient (CP) and two healthy donors (HD1 and HD2). ELISA in red, and optical sensor in blue. Concentration of *c*-MYC per million of cells.

interaction with other substances:  $\theta$  and  $\chi$  (Figure 3B).  $\theta$  is the tilt angle of the  $z$  axis of the mercaptobenzene unit with the surface normal ( $Z$ ).  $\chi$  is the twist angle of the molecular plane around the  $z$  axis (which is 0° when  $y$  is parallel to the surface).

The theoretical Raman MMB spectrum shows good correlation with the experimental observations, which allows the safe assignment of the vibrational modes. The SERS spectrum of MMB displays weak out-of-plane modes, related to the ring plane, at 756 and 997 cm<sup>-1</sup>, confirming a perpendicular orientation of the phenyl group over the surface. When MMB is included in the MB-H1 structure, we observe a slight intensity increase of these features. More importantly, this effect becomes remarkable when MB-H1 interacts with the oncoprotein due to the *c*-MYC massive size (57 kDa). In fact, the rise of the out-of-

plane bands intensities, up to the same level of the ring breathing at 1075 cm<sup>-1</sup>, indicates the adoption of a flatter orientation of the ring onto the surface. This is further supported by the drastic intensity increase of the N–C stretching mode (1022 cm<sup>-1</sup>) upon conjugation with *c*-MYC. Selection of the spectral markers for *c*-MYC sensing should take into account that the acquired SERS spectra result from the contributions of both interacting and noninteracting MB-H1 molecules. Thus, rather than monitoring the absolute intensity of a specific feature, *c*-MYC quantification was performed by recording the ratiometric intensities  $I_{756}/I_{1075}$  (ratio between the out-of-plane CCH deformation at 756 cm<sup>-1</sup> and the in-plane ring breathing at 1075 cm<sup>-1</sup>).

The efficiency of our sensor was demonstrated with both tumor cell lines and real human samples, whereas ELISA was performed

to validate the results. The study received ethical approval by the Ethics and Clinical Research Committee of the HM Hospitales Group, and all participants signed a written informed consent form. Figure 4A shows a scheme of the protocol followed for the quantification of c-MYC by ELISA and SERS. Blood samples were obtained from two healthy donors and a patient diagnosed of ovarian adenocarcinoma (stage IV). The patient was in progression at the time of sample collection. The presence of the tumor was confirmed histologically in compliance with common standards. Each sample of peripheral blood (8 mL) was processed in the following 24 h after extraction to obtain the mononuclear cells by a Ficoll process. The mononuclear cells collected from the blood samples as well as those from an epithelial tumor cell line (MCF7) were lysed and centrifuged. Supernatants were then extracted and, for ELISA, the total protein amount was quantified by the Bradford protein assay. Levels of c-MYC were then determined with a total-human c-MYC ELISA kit. In the case of SERS, SiO<sub>2</sub>@Ag@MB-H1 (100 μL of a 2400 beads/mL solution, which is equivalent to a concentration of 2.5 × 10<sup>6</sup> molecules of MB-H1 per bead) was directly added to each of the supernatants up to a final concentration of ~218 beads/mL. Then, 100 μL aliquots were cast on glass slides, and beads were analyzed by SERS before the evaporation of the solvent. Figure 4B shows the SERS spectra for both c-MYC standards (in dotted thin lines), the same as used for calibration in ELISA, and the real human samples (in solid thick lines). The corresponding calibration curves obtained for each method are presented in Figure 4C. Notably, both ELISA and SERS show adequate correlation coefficients with analogous c-MYC detection limits, albeit with a slightly larger standard deviation for the optical method. However, SERS results are obtained within minutes, whereas ELISA assays require lengthy 4–5 h preparation procedures. Similar results are obtained for real samples (Figure 4D). Finally, MCF7 yields to much higher values than real sample, probably because in that case all cells in the culture are cancerous, whereas in the real samples just a small fraction are tumor cells.

In summary, we have developed a rapid, highly specific and sensitive SERS assay for the determination of c-MYC in real blood samples. The sensing scheme relies on the use of specifically designed hybrid materials consisting of silica microparticles coated with interacting silver nanoparticles. The metallic surfaces are bioderivatized with a c-MYC binding peptide modified with a 4-mercaptobenzoyl antenna (MB-H1) that transduces the specific c-MYC recognition events into a measurable alteration of the SERS signal from MB-H1. Deconvolution of the chemoreceptor vibrational fingerprint allowed us to identify characteristic vibrational modes affected by c-MYC complexation. The extent of such spectral changes was quantitatively correlated with the c-MYC content in complex biological media of real samples.

#### ■ ASSOCIATED CONTENT

##### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/jacs.6b08957.

Experimental section; general peptide synthesis procedures; synthesis, characterization and functionalization of SiO<sub>2</sub>@Ag beads; cell and human samples preparation; additional SEM/TEM and SERS spectra (PDF)

#### ■ AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Authors

\*R.A.A.-P. [ramon.alvarez@urv.cat](mailto:ramon.alvarez@urv.cat)

\*J.L.M. [joseluis.mascareñas@usc.es](mailto:joseluis.mascareñas@usc.es)

\*E.G.-R. [egarcia@hnhospitales.com](mailto:egarcia@hnhospitales.com)

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Marie Curie Actions (FP7/2007-2013, TECNIOspring no. 600388 and PrioSERS FP72014-623527), the European Research Council (Advanced Grant No. 340055), the Spanish MINECO (CTQ2014-59808R, SAF2013-41943-R, CTQ2015-70698-R, CTQ2013-49317-EXP and the orfeo-cinqa network), the Generalitat of Catalonia (2014-SGR-480, AGAUR 2014 052 and AGAUR 2014 054), the Xunta de Galicia (GRC2013-041), and Medcom Advance S.A.

#### ■ REFERENCES

- (1) Buder, A.; Tomuta, C.; Filipits, M. *Curr. Opin. Oncol.* **2016**, *28*, 130.
- (2) Ignatiadis, M.; Lee, M.; Jeffrey, S. S. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4786.
- (3) Crowley, E.; Di Nicolantonio, F.; Loupakis, F.; Bardelli, A. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 472.
- (4) Dang, C. V. *Cell* **2012**, *149*, 22.
- (5) Helm, F.; Kammertoens, T.; Lehmann, F. M.; Wilke, A.; Bruns, H.; Mautner, J.; Bornkamm, G. W.; Gerbitz, A. *PLoS One* **2013**, *8*, e77375.
- (6) Nie, Z.; Hu, G.; Wei, G.; Cui, K.; Yamane, A.; Resch, W.; Wang, R.; Green, D. R.; Tessoro, L.; Casellas, R.; Zhao, K.; Levens, D. *Cell* **2012**, *151*, 68.
- (7) Schlücker, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 4756.
- (8) Alvarez-Puebla, R. A.; Agarwal, A.; Manna, P.; Khanal, B. P.; Aldeanueva-Potel, P.; Carbó-Argibay, E.; Pazos-Pérez, N.; Vigderman, L.; Zubarev, E. R.; Kotov, N. A.; Liz-Marzán, L. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 8157.
- (9) Habuchi, S.; Cottle, M.; Gronheid, R.; Dirix, G.; Michiels, J.; Vanderleyden, J.; De Schryver, F. C.; Hofkens, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8446.
- (10) Singhal, K.; Kalkan, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 429.
- (11) (a) Lin, L.; Tian, X.; Hong, S.; Dai, P.; You, Q.; Wang, R.; Feng, L.; Xie, C.; Tian, Z.-Q.; Chen, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 7266. (b) Feng, M.; Tachikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7443.
- (12) Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 43.
- (13) Guerrini, L.; Arenal, R.; Mannini, B.; Chiti, F.; Pini, R.; Matteini, P.; Alvarez-Puebla, R. A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 9420.
- (14) (a) Guerrini, L.; Pazos, E.; Penas, C.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L.; Alvarez-Puebla, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10314. (b) Liu, S.; Zhang, X.; Luo, W.; Wang, Z.; Guo, X.; Steigerwald, M. L.; Fang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2496. (c) Wang, Y.; Lee, K.; Irudayaraj, J. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 613.
- (15) (a) Draeger, L. J.; Mullen, G. P. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1785. (b) Bidwell, G. L.; Raucher, D. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1076.
- (16) Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232.
- (17) (a) Moskovits, M.; Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5526. (b) Moskovits, M.; Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 6327.
- (18) Frisch et al. *Gaussian 09, Rev. B01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.
- (19) Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y.; Eilers, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9389.
- (20) Chang, S.-C.; Chao, I.; Tao, Y.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6792.
- (21) Ataka, K.-i.; Yotsuyanagi, T.; Osawa, M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 10664.
- (22) Allara, D. L.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* **1985**, *1*, 52.

## CARTA DE ACEPTACIÓN DE “SCIENTIFIC REPORTS”

**Prof. Ramón A. Alvarez-Puebla,**

ICREA, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

Universitat Rovira i Virgili; Edifici N5, Campus de Sescelades, Carrer de Marcel·lí Domingo  
SN, 43007 Tarragona, Spain

Tel: [\(+34\) 977297083](tel:+34977297083)

Email: [ramon.alvarez@urv.cat](mailto:ramon.alvarez@urv.cat)

Website: <https://www.icrea.cat/Web/ScientificStaff/Ramon-Alvarez-Puebla-560>

**De:** "[scientificreports@nature.com](mailto:scientificreports@nature.com)" <[scientificreports@nature.com](mailto:scientificreports@nature.com)>

**Responder a:** "[scientificreports@nature.com](mailto:scientificreports@nature.com)" <[scientificreports@nature.com](mailto:scientificreports@nature.com)>

**Fecha:** martes, 9 de mayo de 2017, 12:04

**Para:** Ramon Angel Alvarez Puebla <[ramon.alvarez@urv.cat](mailto:ramon.alvarez@urv.cat)>

**Asunto:** Scientific Reports: Decision letter for SREP-17-07906A

Dear Prof Alvarez Puebla,

We are delighted to accept your manuscript entitled "**Optofluidic device for the quantification of circulating tumor cells in breast cancer**" for publication in **Scientific Reports**. Thank you for choosing to publish your work with us.

You should have just received another email from [scientificreports@nature.com](mailto:scientificreports@nature.com) with instructions for the next step, which is to complete your publication agreements. To continue with your publication agreements you will need to create a new account on this new system. Please complete these as soon as possible so we can start preparing your manuscript for publication. The agreements include the licence, which defines the terms of publication, and billing information for your Open Access article. Please see our [FAQs page](#) for further information about article processing charges.

After we've prepared your paper for publication, you will receive a PDF proof for checking. At that point, please check the author list and affiliations to ensure that they are correct. For the main text, only errors that have been introduced during the production process or those that directly compromise the scientific integrity of the paper may be corrected at this stage. Please ensure that only one author communicates with us and that only one set of corrections is returned. The corresponding (or nominated) author is responsible on behalf of all co-authors for the accuracy of all content, including spelling of names and current affiliations.

To ensure prompt publication, your proofs should be returned within two working days; please contact [SciRep.Production@nature.com](mailto:SciRep.Production@nature.com) immediately if you wish to nominate a contributing author to receive the proofs on your behalf.

Acceptance of your manuscript is conditional on all authors' agreement with our publication policies (see <http://www.nature.com/srep/policies/index.html>). In particular, your manuscript must not be published elsewhere and there must be no announcement of this work to any media outlet until the publication date is confirmed. We will inform you by email as soon as your manuscript is scheduled for publication, which will be after we have received and approved your proof corrections. Advice about media relations is available from NPG's press office at [press@nature.com](mailto:press@nature.com).

Your article will be open for online commenting on the Scientific Reports website. You may use the report facility if you see any comments which you consider inappropriate, and of course, you can contribute to discussions yourself. If you wish to track comments on your article, please register for this service by visiting the 'Comments' section in the full text (HTML) version of your paper.

\*\*A form to order reprints of your article is available at <http://www.nature.com/reprints/author-reprints.html>. To obtain the special author reprint rate, orders must be made within a month of the publication date. After that, reprints are charged at the normal (commercial) rate.\*\*

We look forward to publishing your article.

Best regards,

Muhammad Shiddiky  
Editorial Board Member  
Scientific Reports



## CARTA DE ACEPTACIÓN DE “ONCOTARGET”

May 27, 2017

Ramon A Alvarez-Puebla

ICREA

Passeig Lluís Companys 23

Barcelona, Catalunya 08010

Spain

RE: Metabolic pathway for the universal fluorescent recognition of tumour cells

Dear Ramon Alvarez-Puebla:

Your manuscript will be accepted for publication in *Oncotarget*, pending minor revision based on comments of our reviewers.

Please review the peer review comments and edit the manuscript to respond to them. Please attach to your revised manuscript a point-by-point response to the reviewer's comments along with an explanation of any request that you do NOT address in your revised manuscript.

If you disagree with reviewers whether additional experiments are necessary or possible, please explain.

Unless you are willing, you do NOT need to perform additional experiments

Please make every effort to address the remaining concerns and to resubmit your manuscript within 4 months. If you anticipate an additional delay please notify us. |

Please use the link below to submit the revised manuscript, including figures. Do not return the original version of the manuscript.

Please include a Rebuttal letter with the following: number each point, then address each point and indicate how the manuscript has been revised.

**MAKE SURE THAT IMMUNOBLOTS AND OTHER IMAGES HAVE NO DUPLICATIONS and are CORRECT.**

Please check rubric order and reference format.

Include Funding and Conflict of Interests after Acknowledgments.

Please submit well edited version, without any typos, with final authorship and affiliations.

To log in to our online submission system and submit the revised manuscript, click on the link below:

<https://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2JC5Lhv2B6BcpV5I6A9ftdPg2yht4Gzcle5QQKko5IQZ>

Sincerely,

Mikhail

Prof. Mikhail V. Blagosklonny, MD, PhD

Co-Editor-in-Chief

Oncotarget



## F: PATENTES

### APPARATUS AND METHOD FOR DETECTION OF TUMOUR CELLS AND CIRCULATING TUMOUR CELLS (ESTUDIO IV DE ESTA TESIS DOCTORAL)



#### Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:


Submission number	300186659	
Application number	EP16382093.9	
File No. to be used for priority declarations	EP16382093	
Date of receipt	03 March 2016	
Your reference	P12485EP00	
Applicant	MEDCOM ADVANCE, S.A.	
Country	ES	
Title	APPARATUS AND METHOD FOR DETECTION OF TUMOUR CELLS AND CIRCULATING TUMOUR CELLS	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\AAF_P12485E P00_Text for filling.pdf (62 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) f1002-1.pdf (2 p.)
Submitted by	CN=Irene Vázquez Vázquez 381 14	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	03 March 2016, 17:10:49 (CET)	
Official Digest of Submission	EE:66:A9:8F:8E:A9:49:6A:73:DC:04:7B:0C:C8:79:7B:06:D6:06:9C	

/Madrid, Oficina Receptora/

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:  Vazquez Vazquez, Irene ABG Patentes, S.L. Avenida de Burgos 16D Edificio Euromor 28036 Madrid ESPAGNE		RECEIVED  21 MAR. 2017  ABC Patentes, S.L.		NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER AND OF THE INTERNATIONAL FILING DATE  (PCT Rule 20.2(c))	
		Date of mailing (day/month/year)		16-03-2017	
Applicant's or agent's file reference P12485PC00			IMPORTANT NOTIFICATION		
International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)			
PCT/EP2017/055023	3 March 2017 (03-03-2017)	3 March 2016 (03-03-2016)			
Applicant MEDCOM ADVANCE, S.A.					
Title of the invention					
1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.					
2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:					
<input checked="" type="checkbox"/> was transmitted to the International Bureau on <u>see above date of mailing</u>					
<input type="checkbox"/> has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:					
<input type="checkbox"/> because the necessary national security clearance has not yet been obtained					
<input type="checkbox"/> because (reason to be specified)					
* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).					
Name and mailing address of the Receiving Office  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer  Kuiper-Cristina, Nathalie		

Form PCT/RO/105 (April 2007)

10. Apéndices

P12485PC00

1/5

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>0</b>	<b>For receiving Office use only</b>	
<b>0-1</b>	International Application No.	PCT/EP2017/055023
<b>0-2</b>	International Filing Date	03 MAR 2017 (03.03.2017)
<b>0-3</b>	Name of receiving Office and "PCT International Application"	RO/EP
<b>0-4</b>	<b>Form PCT/RO/101 PCT Request</b>	
<b>0-4-1</b>	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.251e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
<b>0-5</b>	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
<b>0-6</b>	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
<b>0-7</b>	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	P12485PC00
<b>I</b>	<b>Title of Invention</b>	APPARATUS AND METHOD FOR DETECTION OF TUMOUR CELLS AND CIRCULATING TUMOUR CELLS
<b>II</b>	<b>Applicant</b>	
<b>II-1</b>	This person is	Applicant only
<b>II-2</b>	Applicant for	All designated States
<b>II-4</b>	Name	MEDCOM ADVANCE, S.A.
<b>II-5</b>	Address	Avenida Roma, 35 entreplanta, 1 E-08029 Barcelona Spain
<b>II-6</b>	State of nationality	ES
<b>II-7</b>	State of residence	ES
<b>III-1</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
<b>III-1-1</b>	This person is	Applicant only
<b>III-1-2</b>	Applicant for	All designated States
<b>III-1-4</b>	Name	MEDCOM TECH, S.A.
<b>III-1-5</b>	Address	Avenida Partenón, 10 Planta 2, Puerta 3 E-28042 Madrid Spain
<b>III-1-6</b>	State of nationality	ES
<b>III-1-7</b>	State of residence	ES

## Biopsia Líquida

P12485PC00

2/5

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>III-2</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-2-1	This person is	Applicant only
III-2-2	Applicant for	All designated States
III-2-4	Name	FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN HM HOSPITALES
III-2-5	Address	San Bernardo, 101 E-28015 Madrid Spain
III-2-6	State of nationality	ES
III-2-7	State of residence	ES
<b>III-3</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-3-1	This person is	Inventor only
III-3-3	Inventor for	All designated States
III-3-4	Name (LAST, First)	XIE, Hainan
III-3-5	Address	Avinguda Ramon I Cajal, 41, 2A E-43001 Tarragona Spain
<b>III-4</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-4-1	This person is	Inventor only
III-4-3	Inventor for	All designated States
III-4-4	Name (LAST, First)	GARCÍA ALGAR, Manuel
III-4-5	Address	Carrer Sant Plàcid, 21, 11 E-43760 El Morell -Tarragona Spain
<b>III-5</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-5-1	This person is	Inventor only
III-5-3	Inventor for	All designated States
III-5-4	Name (LAST, First)	NAZARENUS, Moritz
III-5-5	Address	Carrer de Armanyà, 4, 3-1 E-43004 Tarragona Spain
<b>III-6</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-6-1	This person is	Inventor only
III-6-3	Inventor for	All designated States
III-6-4	Name (LAST, First)	SAGALÉS, Juan
III-6-5	Address	Benet i Mateu, 52, 4c E-08034 Barcelona Spain
<b>III-7</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-7-1	This person is	Inventor only
III-7-3	Inventor for	All designated States
III-7-4	Name (LAST, First)	VILLANUEVA LEAL, Carlos
III-7-5	Address	Plaza Joaquin Folguera, 74, 1 E-08022 Barcelona Spain

## 10. Apéndices

P12485PC00

3/5

## PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>III-8</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-8-1	This person is	Inventor only
III-8-3	Inventor for	All designated States
III-8-4	Name (LAST, First)	GÓMEZ DE PEDRO, Sara
III-8-5	Address	Avinguda Catalunya, 56 A, 2A E-43002 Tarragona Spain
<b>III-9</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-9-1	This person is	Inventor only
III-9-3	Inventor for	All designated States
III-9-4	Name (LAST, First)	GARCÍA RICO, Eduardo Manuel
III-9-5	Address	Monteagudillo 19, Robledo de Chavela E-28294 Madrid Spain
<b>IV-1</b>	<b>Agent or common representative; or address for correspondence</b>	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	Agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene
IV-1-2	Address	ABG PATENTES, S.L. Avda. de Burgos, 16D Edificio EUROMOR E-28036 Madrid Spain
IV-1-3	Telephone No.	+34 91 417 13 00
IV-1-4	Facsimile No.	+34 91 417 13 01
IV-1-5	e-mail	informacion@abgpatentes.com
IV-1-5(a)	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent)
IV-1-6	Agent's registration No.	9251760
<b>V</b>	<b>DESIGNATIONS</b>	
<b>V-1</b>	<b>The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.</b>	
<b>VI-1</b>	<b>Priority claim of earlier regional application</b>	
VI-1-1	Filing date	03 March 2016 (03.03.2016)
VI-1-2	Number	16382093.9
VI-1-3	Regional Office	EP

# Biopsia Líquida

P12485PC00

4/5

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

<b>VI-2</b>	<b>Priority document request</b> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s).	<b>VI-1</b>
<b>VI-3</b>	<b>Incorporation by reference :</b> where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
<b>VII-1</b>	<b>International Searching Authority Chosen</b>	<b>European Patent Office (EPO) (ISA/EP)</b>
<b>VII-2</b>	<b>Request to use results of earlier search; reference to that search</b>	
<b>VII-2-1</b>	Filing date	<b>03 March 2016 (03.03.2016)</b>
<b>VII-2-2</b>	Application Number	<b>EP16382093.9</b>
<b>VII-2-3</b>	Country (or regional Office)	<b>EP</b>
<b>VII-2-5</b>	Documents are available to the ISA in a form and manner acceptable to it and therefore do not need to be submitted by the applicant to the ISA (Rule 12bis.1 (f)).	<b>A copy of the results of the earlier search</b> <b>A copy of the earlier application</b> <b>A copy of any document cited in the results of the earlier search</b>
<b>VIII</b>	<b>Declarations</b>	Number of declarations
<b>VIII-1</b>	Declaration as to the identity of the inventor	-
<b>VIII-2</b>	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-
<b>VIII-3</b>	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-
<b>VIII-4</b>	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-
<b>VIII-5</b>	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-



## 10. Apéndices

P12485PC00

5/5

**PCT REQUEST**

Print Out (Original in Electronic Form)

IX	Check list	Number of sheets	Electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	<b>5</b>	✓
IX-2	Description	<b>49</b>	✓
IX-3	Claims	<b>4</b>	✓
IX-4	Abstract	<b>1</b>	✓
IX-5	Drawings	<b>8</b>	✓
IX-7	TOTAL	<b>67</b>	
	<b>Accompanying Items</b>	Paper document(s) attached	Electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	-	✓
IX-20	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-21	Language of filing of the international application	<b>English</b>	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	<b>(PKCS7 Digital Signature)</b>	
X-1-1	Name (LAST, First)	<b>VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene</b>	
X-1-3	Capacity (if such capacity is not obvious from reading the request)	<b>(Representative)</b>	

**FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY**

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	<b>03 MAR 2017 (03.03.2017)</b>
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	✓
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	<b>ISA/EP</b>
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

**FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY**

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2017/055023

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene  
ABG Patentes, S.L.  
Avda. de Burgos, 16D  
Edificio EUOMOR  
28036 Madrid  
ESPAGNE

**RECEIVED**

**16 MAR. 2017**

ABG Patentes, S.L.

Date of mailing (day/month/year) 15 March 2017 (15.03.2017)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P12485PC00	International application No. PCT/EP2017/055023

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:  
**MEDCOM ADVANCE, S.A. et al (all designated States)**

International filing date: **03 March 2017 (03.03.2017)**  
Priority date(s) claimed: **03 March 2016 (03.03.2016)**  
Date of receipt of the record copy by the International Bureau: **14 March 2017 (14.03.2017)**  
List of designated Offices:

**AP:** BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW  
**EA:** AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM  
**EP:** AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR  
**OA:** BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
**National:** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

**ATTENTION:** The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to:**

- time limits for entry into the national phase (see [www.wipo.int/pc/en/texts/time\\_limits.html](http://www.wipo.int/pc/en/texts/time_limits.html) and *PCT Applicant's Guide*, National Phase, especially Chapters 3 and 4)
- requirements regarding priority documents (if applicable) (see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraph 5.070)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <b>RANA Sohel</b> e-mail <a href="mailto:pct.team5@wipo.int">pct.team5@wipo.int</a> Telephone No. +41 22 338 74 05
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Form PCT/IB/301 (July 2010)

I/D3RVWTUP63L3J0

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,  
OBTENTION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:  VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene ABG Patentes, S.L. Avda. de Burgos, 16D Edificio EUROMOR 28036 Madrid ESPAGNE	<b>RECEIVED</b>  <b>23 MAR. 2017</b>  ABG Patentes
--	--

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2017 (22.03.2017)	
Applicant's or agent's file reference P12485PC00	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/EP2017/055023	International filing date (day/month/year) 03 March 2017 (03.03.2017)
International publication date (day/month/year) <b>Not yet published</b>	Priority date (day/month/year) 03 March 2016 (03.03.2016)
Applicant MEDCOM ADVANCE, S.A. et al	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
03 March 2016 (03.03.2016)	16382093.9	EP	17 March 2017 (17.03.2017)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "\*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Nora Lindner e-mail pct.team5@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	---

## OPTOFLUIDIC DEVIDE AND METHOD FOR DETECTING CIRCULATING TUMOUR CELLS (ESTUDIO III DE ESTA TESIS DOCTORAL)



### Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300229811	
Application number	EP17382192.7	
File No. to be used for priority declarations	EP17382192	
Date of receipt	07 April 2017	
Your reference	P14110EP00	
Applicant	UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI	
Country	ES	
Title	OPTOFLUIDIC DEVICE AND METHOD FOR DETECTING CIRCULATING TUMOUR CELLS	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf/AAF_P14110E P00_Text for filing.pdf (71 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) f1002-1.pdf (2 p.)
Submitted by	CN=Irene Vázquez Vázquez 38114	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	07 April 2017, 14:52:40 (CEST)	
Official Digest of Submission	D3:8D:7B:79:E6:E8:F5:60:DF:19:64:4D:38:22:BB:89:B2:A5:D4:EF	

/Madrid, Oficina Receptora/

## Form 1002 - 1: Public inventor(s)

## Designation of inventor

User reference: P14110EP00  
 Application No:

Public

	<b>Inventor</b>  Name: ÁLVAREZ-PUEBLA, Mr. Ramón A. Address: Departamento de Química Física e Inorgánica, Universitat Rovira i Virgili. Edifici N5, Campus de Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n E-43007 Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
	<b>Inventor</b>  Name: PEDROL, Mr. Eric Address: Departamento de Química Física e Inorgánica, Universitat Rovira i Virgili. Edifici N4, Campus de Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n E-43007 Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	Under agreement:
	<b>Inventor</b>  Name: MASSONS, Mr. Jaume Address: Departamento de Química Física e Inorgánica, Universitat Rovira i Virgili. Edifici N4, Campus de Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n E-43007 Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
	<b>Inventor</b>  Name: DÍAZ, Mr. Francisco Address: Departamento de Química Física e Inorgánica, Universitat Rovira i Virgili. Edifici N4, Campus de Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n E-43007 Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer

# Biopsia Líquida

User reference: P14110EP00  
Application No:

<b>Inventor</b>	Name: GARCÍA ALGAR Manuel Company: Medcom Advance S.A Address: Sant Plàcid, 21- 1- 1 E-43760 El Morell-Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
<b>Inventor</b>	Name: NAZARENUS, Mr. Moritz Julian Company: Medcom Tech S.A. Address: Edifici N5, Campus de Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n. E-43007 Tarragona Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
<b>Inventor</b>	Name: GARCÍA-RICO FERNÁNDEZ, Mr. Eduardo Company: Fundación de investigación HM Hospitales Address: Plaza Conde Valle Suchil, 16 E-28015 Madrid Spain  The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer

## Signature(s)

Place: **Madrid**  
Date: **07 April 2017**  
Signed by: **Irene Vázquez Vázquez 38114**  
Association: **ABG Patentes, S.L.**  
Representative name: **VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene**  
Capacity: **(Representative)**



**Request for grant of a European patent**

<i>For official use only</i>	
<b>1</b> Application number:	MKEY
<b>2</b> Date of receipt (Rule 35(2) EPC):	DREC
<b>3</b> Date of receipt at EPO (Rule 35(4) EPC):	RENA
<b>4</b> Date of filing:	

**5** Grant of European patent, and examination of the application under Article 94, are hereby requested.

Request for examination in an admissible non-EPO language:

Se solicita el examen de la solicitud según el artículo 94.

**5.1** The applicant waives his right to be asked whether he wishes to proceed further with the application (Rule 70(2))

Procedural language: en

Description and/or claims filed in: en

**6** Applicant's or representative's reference: P14110EP00

Filing Office: ES

**Applicant 1**

**7-1** Name: UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**8-1** Address: Escorxador, s/n  
E- 43003 Tarragona  
Spain

**10-1** State of residence or of principal place of business: Spain

**Applicant 2**

**7-2** Name: FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS

**8-2** Address: Passeig Lluís Companys, 23  
E-08010 Barcelona  
Spain

**10-1** State of residence or of principal place of business: Spain



## Biopsia Líquida

### Applicant 3

7-3 Name: FUNDACIÓ PRIVADA CENTRE TECNOLÒGIC DE LA QUÍMICA DE CATALUNYA  
8-3 Address: Marcel·lí Domingo, s/n  
E-43007 Tarragona  
Spain  
10-1 State of residence or of principal place of business: Spain

### Applicant 4

7-4 Name: FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN HM HOSPITALES  
8-4 Address: Plaza del Conde Valle Suchil, 2  
E-28015 Madrid  
Spain  
10-1 State of residence or of principal place of business: Spain

### Applicant 5

7-5 Name: MEDCOM TECH, S.A  
8-5 Address: Avenida Partenón, 10  
Planta 2, Puerta 3  
E-28042 Madrid  
Spain  
10-1 State of residence or of principal place of business: Spain

### Applicant 6

7-6 Name: MEDCOM ADVANCE, S.A.  
8-6 Address: Avenida de Roma número 35, entresuelo 1ª  
E-08029 Barcelona  
Spain  
10-1 State of residence or of principal place of business: Spain

14.1 The/Each applicant hereby declares that he is an entity or a natural person under Rule 6(4) EPC.

### Representative 1

15-1 Name: ABG Patentes, S.L.  
Association No.: 234  
16-1 Address of place of business: Avenida de Burgos ,16D  
Edificio Euromor  
E-28036 Madrid  
Spain



## 10. Apéndices

17-1 Telephone: [ ]  
17-1 Fax: [ ]  
17-1 E-mail: [ ]

### Inventor(s)

23 Inventor details filed separately

### 24 Title of invention

Title of invention: OPTOFLUIDIC DEVICE AND METHOD FOR  
DETECTING CIRCULATING TUMOUR CELLS

### 25 Declaration of priority (Rule 52)

A declaration of priority is hereby made for the following applications

25.2 This application is a complete translation of the previous application

25.3 It is not intended to file a (further) declaration of priority

### 26 Reference to a previously filed application

27 Divisional application

28 Article 61(1)(b) application

### 29 Claims

Number of claims: 15

29.1  as attached

29.2  as in the previously filed application (see Section 26.2)

29.3  The claims will be filed later

### 30 Figures

It is proposed that the abstract be published together with figure No. [ ]

### 31 Designation of contracting states

All the contracting states party to the EPC at the time of filing of the European patent application are deemed to be designated (see Article 79(1)).

### 32 Different applicants for different contracting states

**33 Extension/Validation**

This application is deemed to be a request to extend the effects of the European patent application and the European patent granted in respect of it to all non-contracting states to the EPC with which extension or validation agreements are in force on the date on which the application is filed. However, the request is deemed withdrawn if the extension fee or the validation fee, whichever is applicable, is not paid within the prescribed time limit.

**33.1** It is intended to pay the extension fee(s) for the following state(s):

**33.2** It is intended to pay the validation fee(s) for the following state(s):

**34 Biological material**

**38 Nucleotide and amino acid sequences**

The European patent application contains a sequence listing as part of the description

The sequence listing is attached in computer-readable format in accordance with WIPO Standard ST.25

The sequence listing is attached in PDF format

**Further indications**

**39** Additional copies of the documents cited in the European search report are requested

Number of additional sets of copies:

**40** Refund of the search fee under to Article 9 of the Rules relating to Fees is requested

Application or publication number of earlier search report:

**42 Payment**

Mode of payment

The European Patent Office is hereby authorised, to debit from the deposit account with the EPO any fees and costs indicated on the fees section below.

Currency: |

Deposit account number: |

Account holder: |

**43 Refunds**

Any refunds should be made to EPO deposit account: |

Account holder: |

## 10. Apéndices

Fees	Factor applied	Fee schedule	Amount to be paid
001 Filing fee - EP direct - online			
002 Fee for a European search - Applications filed on/after 01.07.2005			
015 Claims fee - For the 16th to the 50th claim			
015e Claims fee - For the 51st and each subsequent claim			
501 Additional filing fee for the 36th and each subsequent page			
Total:			

44-A Forms	Details:	System file name:
<b>A-1</b>	Request	as ep-request.pdf
<b>A-2</b>	1. Designation of inventor 1. Inventor	as f1002-1.pdf

44-B Technical documents	Original file name:	System file name:
<b>B-1</b>	Specification AAF_P14110EP00_Text for filing.pdf Description; 15 claims; 5 figure(s); abstract	SPECEPO-1.pdf

44-C Other documents	Original file name:	System file name:
<b>45</b>	General authorisation:	<input style="width: 200px; height: 20px;" type="text"/>

### 46 Signature(s)

Place: **Madrid**

Date: **07 April 2017**

Signed by: **Irene Vázquez Vázquez 38114**

Association: **ABG Patentes, S.L.**

Representative name: **VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Irene**

Capacity: **(Representative)**

CRÉDITOS

Plantilla: Kayla Friedman y Malcolm Morgan (PhD Thesis/ Masters Dissertation Word Template and Information and Requirements for Cambridge University)

Dibujo Agradecimientos (página iii): Adolfo de Carolis (Ilustración en L'Odissea, 1926, Nicola Zanichelli editore; Bologna 1926).

Verso en dedicatoria: A. Machado

Versos en agradecimientos (página iii): Ítaca; C. P. Cavafis,



Ulysses Defying the Cyclops, LF Schutzenberger