

# Nanotecnologia i diagnòstic *in vitro*

Arben Merkoçi  
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)  
Nanobioelectronics & Biosensors Group  
Institut Català de Nanotecnologia  
Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona  
Bellaterra

## Nanotecnologia, nanobiotecnologia i nanodiagnòstic

Nanotecnologia és la creació i utilització de materials, aparells, i sistemes a través del control de material en escala nanomètrica (1 nanometre =  $10^{-9}$  metres). Les diverses nanotecnologies i les seves aplicacions en ciències de la vida es descriuen en detall en diversos llibres i revistes, incloses les de divulgació, sota el nom de nanobiotecnologia [1, 2, 3].

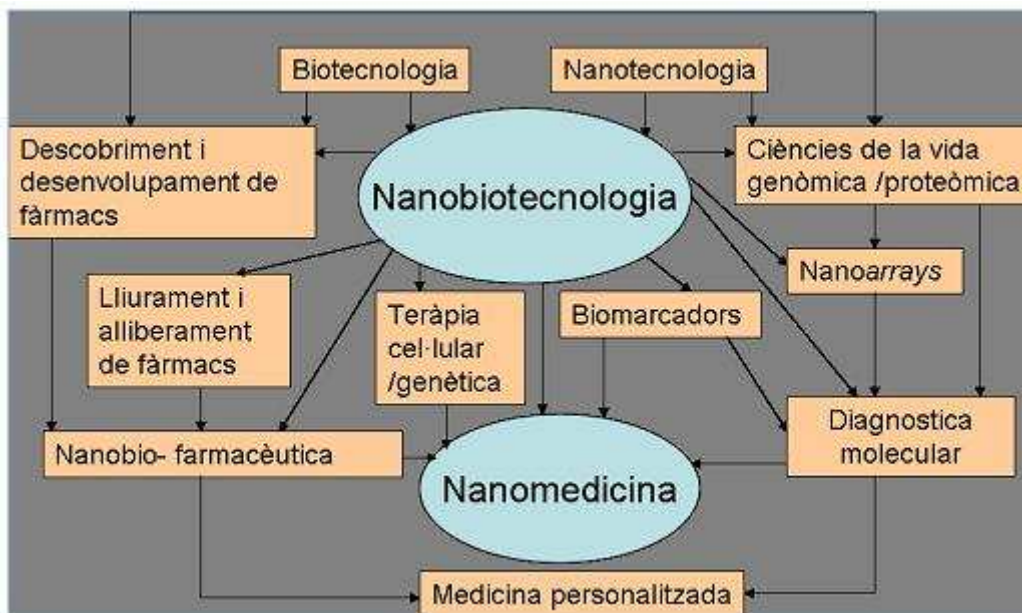
Diagnòstica, lliurament de fàrmacs, desenvolupament de pròtesis i implants són tres àrees on la nanotecnologia s'està introduint al sector biomèdic. Els sensors per dur a terme el diagnòstic i les tècniques de "lab-on-a-chip" estan dissenyats per efectuar l'anàlisi de sang i d'altres mostres i per llur integració en instruments analítics amb interès per la recerca i el desenvolupament de nous fàrmacs entre altres camps. Respecte a productes i dispositius per a ús terapèutic dins el cos humà s'estan desenvolupant fàrmacs contra el càncer basats en nanotecnologia, com la implantació de bombes d'insulina i teràpia de gens. S'està treballant també per al desenvolupament de pròtesis i implants que contenen materials "nanoestructurats" amb propietats físiques i químiques millorades, a part d'una biocompatibilitat adequada.

L'ús de nanobiotecnologia en el diagnòstic molecular s'anomena també diagnòstic nanomolecular i pot ser qualificat com a nanodiagnòstic. Diversos nanoaparells i nanosistemes ja són factibles per dur a terme la seqüenciació de DNA. Donada la mida nano dels receptors, els porus i altres components funcionals de les cèl·lules vives, el control detallat i l'anàlisi d'aquests components serà possible mitjançant el desenvolupament d'una nova classe de sondes a nanoescala.

Com a conseqüència de la seva petita mida, gran part de les aplicacions de nanobiotecnologia en el diagnòstic molecular cauen sota la categoria de *bioxips/microarrays*, o més correctament qualificats com a *nanoxips* i *nanoarrays*.

*Nanotecnologia-en-un-xip* és un descripció general que es pot aplicar a uns quants mètodes. Alguns de aquests no utilitzen nanotecnologies sinó que merament tenen la capacitat per analitzar nanolitres de líquids.

És difícil classificar una gamma tan àmplia de nanotecnologies però aquelles amb aplicacions potencials en el diagnòstic molecular es presenten en la Figura 1. Les tecnologies de diagnòstic molecular s'utilitzen en la recerca biològica, detecció d'agents de bioterrorisme, diagnòstic clínic, descoberta i desenvolupament de fàrmacs, així com en el control de tractaments mèdics incloent-hi mètodes nous com teràpia de gens, estudis de RNA, etc. El diagnòstic molecular és una part essencial del desenvolupament de medicina personalitzada on alguns dels procediments de diagnòstic es realitzen prop del pacient (pel mateix pacient o en el despatx del metge de capçalera, per exemple).



**Figura 1.** Interrelació entre diverses tecnologies que contribueixen al nanodiagnòstic clínic. Les mateixes tecnologies contribueixen en el desenvolupament de "nanomedicina" sota el concepte de medicina personalitzada. Adaptada de la referència [4].

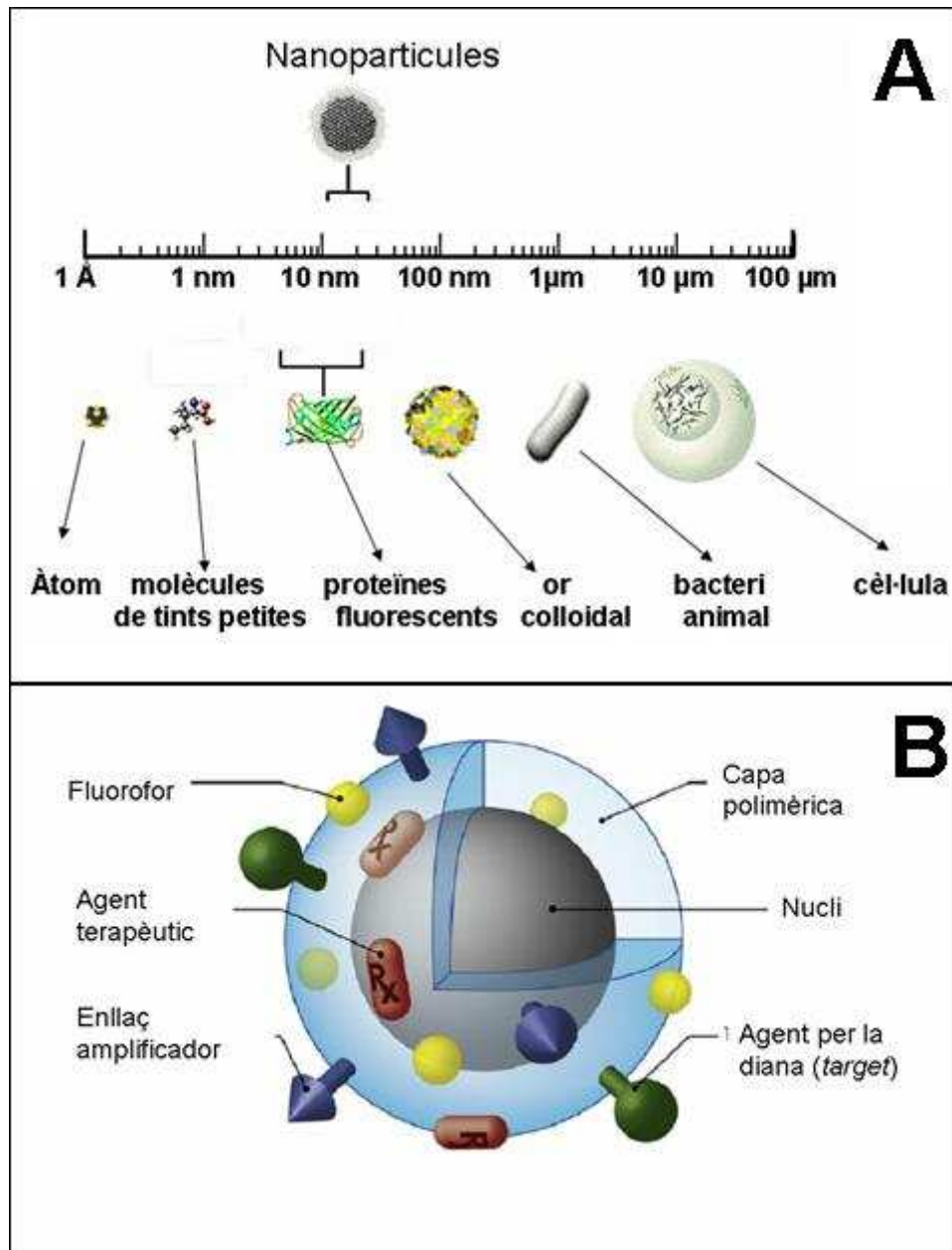
Aquest article tracta de l'aplicació d'aquestes tecnologies dins el context d'un laboratori clínic. A continuació es presenten alguns camps d'interès per la diagnostica on les nanotecnologies i els nanomaterials estan aportant millores quant a la sensibilitat, selectivitat i temps de resposta, entre altres avantatges, en comparació amb les tecnologies actuals. Altres camps d'interès per al nanodiagnòstic com els sensors de mida nano o xips, representen altres alternatives però no seran objecte d'aquest article.

## Nanopartícules

Les nanopartícules són partícules que tenen una dimensió fins a 100

nanometres. Les propietats de molts materials convencionals canvien quan passen a nanopartícules. Això és típicament perquè les nanopartícules tenen una àrea de superfície més gran per pes que les partícules més grans; són per això més reactives que altres molècules i demostren una sèrie de propietats òptiques i electroquímiques que les fan atractives per una sèrie d'aplicacions en medicina, a part d'altres camps.

La Figura 2a mostra l'escala de diversos materials i la posició de les nanopartícules dins d'aquesta varietat de mides. Les nanopartícules, de diverses composicions, mides i formes, es poden fer activar mitjançant protocols ja quasi establerts. La Figura 2b mostra una nanopartícula amb el seu nucli envoltat d'una capa polimèrica sobre la qual es poden dur a terme diversos tipus de modificacions amb interès especial en diversos camps. El camp farmacèutic representa un dels més importants, on el desenvolupament de nous fàrmacs basats en noves estratègies de lliurament i alliberament de fàrmacs, gràcies a l'ús de nanopartícules i nanocàpsules, s'està duent a terme últimament [3]. A continuació es presenten dos altres camps emergents d'ús de nanopartícules en la "nanomedicina" actual: a) desenvolupament de noves estratègies per a l'obtenció d'imatges i b) la biodetecció en general, amb un enfocament al camp de biosensors, ambdues d'interès especial per al nanodiagnòstic.

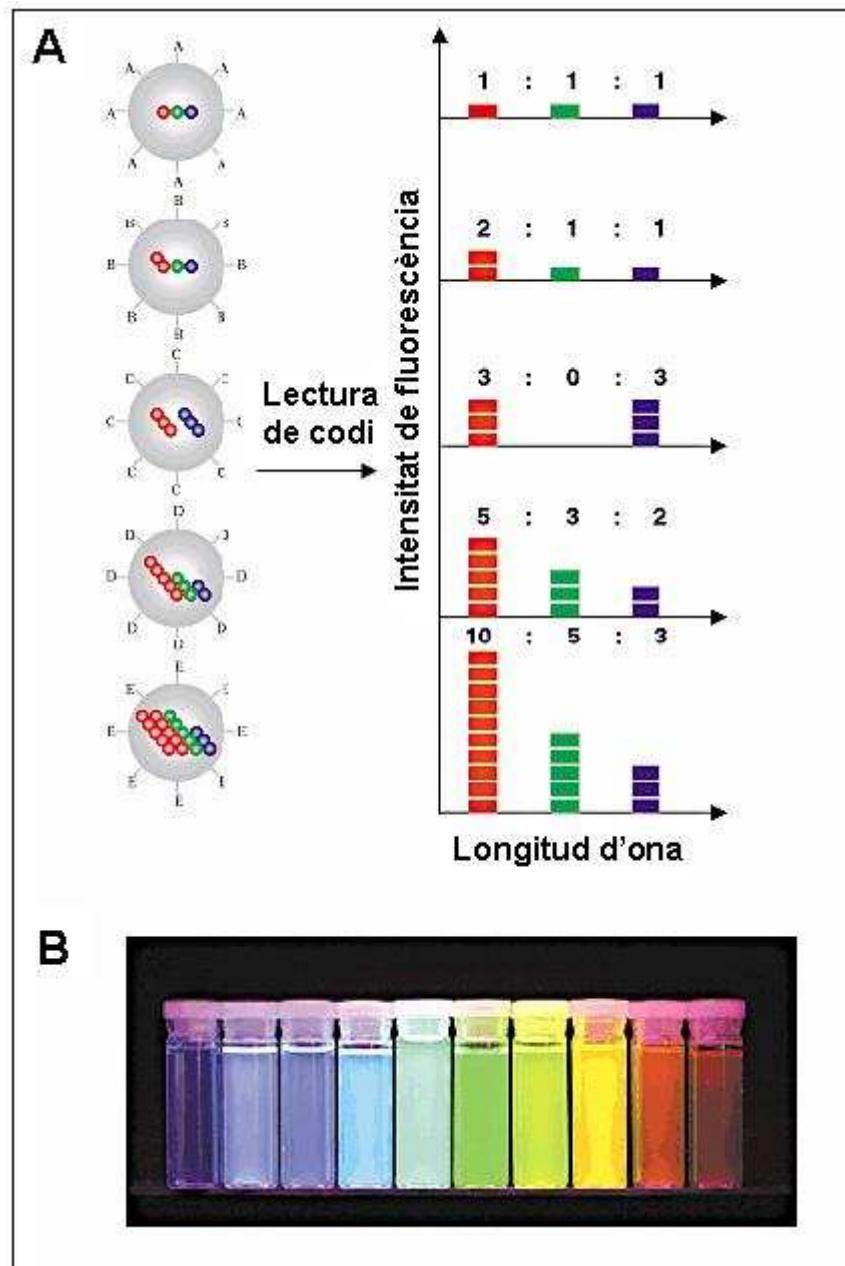


**Figura 2.** A) Escala de diversos materials i la posició de les nanopartícules dins aquesta varietat de mides. B) Nanopartícula amb el seu nucli (no a escala) envoltat d'una capa polimèrica sobre la qual es poden dur a terme diversos tipus de modificacions amb interès especial en diversos camps de les ciències de la salut.

### Detecció i quantificació de DNA i proteïnes

Els punts quàntics són una classe especial de nanopartícules. Tenen espectres d'excitació amples, espectres d'emissió aguts, i propietats d'emissió fàcils de canviar, i a part del seu ús per obtenir imatges de cèl·lules, són també candidats potencials per reemplaçar els marcadors fluorescents convencionals en assajos de biodetecció.

El primer exemple de punts quàntics modificats amb DNA implicava l'ús de partícules polimèriques. Utilitzant aquesta estratègia, Han *et al.* [5] van demostrar, com a prova de concepte, la possibilitat d'utilitzar els punts quàntics com a marcadors per la detecció de tipus *multiplexing* de DNA. (Figura 4). En aquest treball es marcava el DNA "diana" amb micropartícules polimèriques amb punts quàntics dissenyats per emetre a diverses longituds d'ona. Les micropartícules amb proporcions diferents de punts quàntics exhibeixen espectres de fluorescència diferents. Després de la captura del DNA "diana" prop de la micropartícula, i de la seva posterior connexió amb els punts quàntics, mitjançant mesures espectromètriques es revelen tant la presència com la quantitat del DNA "diana".



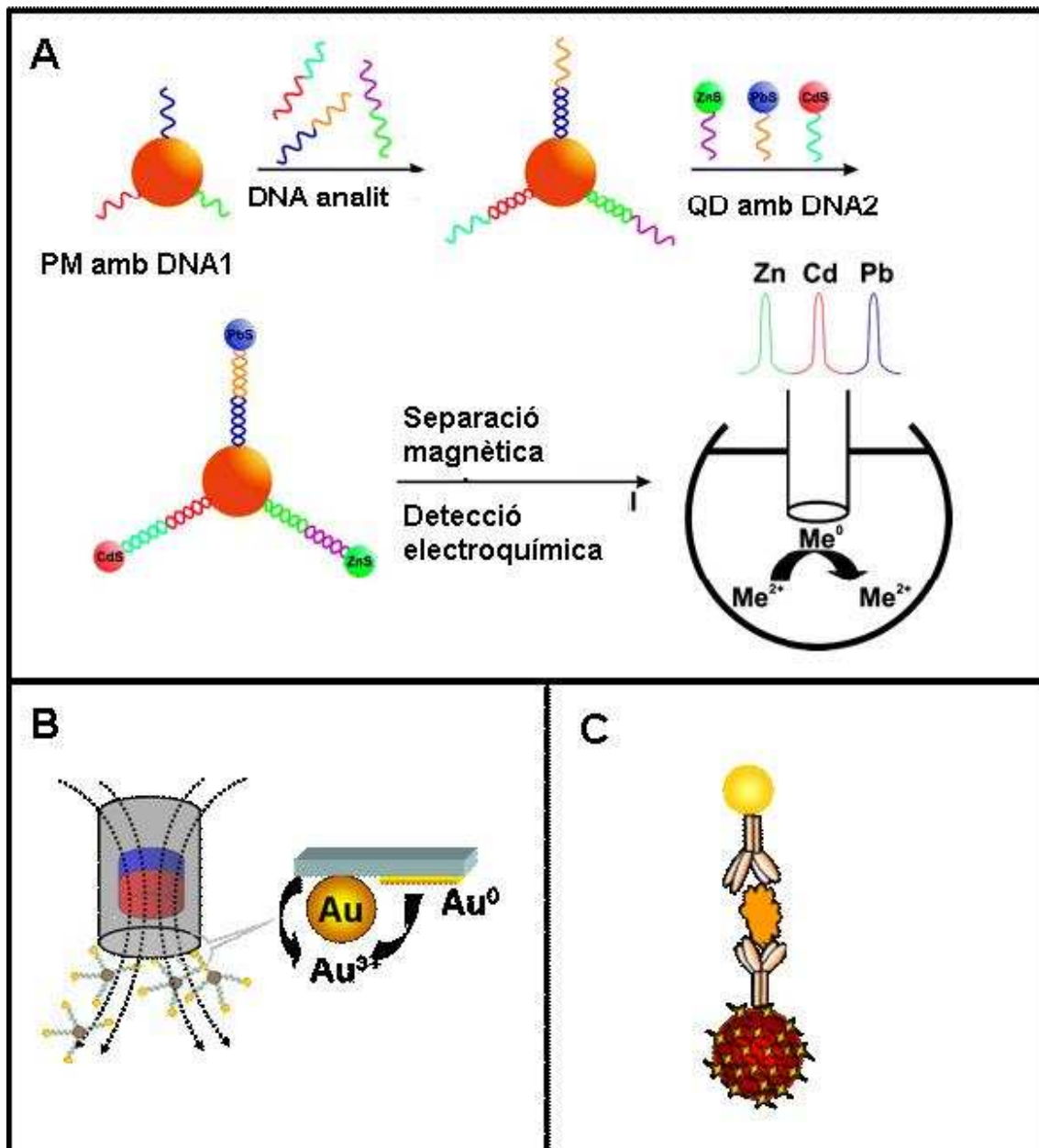
**Figura 3.** Il·lustració esquemàtica de la codificació òptica utilitzant el multiplexing i fent servir la longitud d'ona i la intensitat de la fluorescència. A)

*Les esferes gran representen micropartícules polimèriques dins les quals hi ha els punts quàntics de diversos colors i amb una proporció determinada entre ells. Les superfícies de les esferes polimèriques estan modificades amb biomolècules (DNA, anticossos) que reconeixen les biomolècules complementaries (DNA, proteïnes) que s'han d'analitzar. B) Per fer les mesures s'utilitzen els valors absoluts d'intensitats de fluorescència en longituds d'ona diferents. S'han utilitzat 10 punts quàntics de sulfur de zinc coberts amb seleniur de cadmi, que s'exciten amb raigs UV. Adaptació de la referència 5.*

Les propietats electroquímiques dels punts quàntics fan que siguin fàcils de ser detectades utilitzant, a més, una instrumentació simple com la requerida per a l'anàlisi de redissolució electroquímica que permet el disseny de procediments amb una gran capacitat de detecció i, al mateix temps, una detecció simultània de diversos analits (DNA, proteïnes, cèl·lules) presents en la mateixa mostra. El nombre de "dianes" que es poden detectar simultàniament és controlat pel nombre dels marcadors (punts quàntics o altres nanopartícules) que són distingibles per l'anàlisi de redissolució electroquímica. A continuació es descriu un assaig d'hibridació basat en l'ús de tres punts quàntics (ZnS, CdS i PbS) [6]. Les sondes de DNA connectades amb punts quàntics representen pics de redissolució ben definits en els potencials: -1,12 V (Zn), -0,68 V (Cd) i -0,53 V (Pb) utilitzant un elèctrode de carboni vitrificat cobert d'una capa de mercuri (utilitzant l'elèctrode de referència d'Ag/AgCl) després de dissoldre les nanopartícules de metall mencionades (vegeu la Figura 5A).

Altres estratègies, per a la detecció de DNA, es basen en l'ús de nanopartícules d'or. De manera semblant amb el cas anterior, es fan servir partícules magnètiques. La detecció de les nanopartícules d'or es fa directament sobre l'elèctrode gràcies a l'ús d'un imant petit, incorporat dins la superfície de l'elèctrode, fent possible l'acumulació de les partícules magnètiques amb les sondes de DNA de manera semblant amb el cas anterior però amb nanopartícules d'or utilitzades com a marcadors [7]. Aquesta estratègia s'ha fet servir també per la detecció de proteïnes [8] i últimament ha estat combinada amb una estratègia d'amplificació amb plata per disminuir els límits de detecció [9].



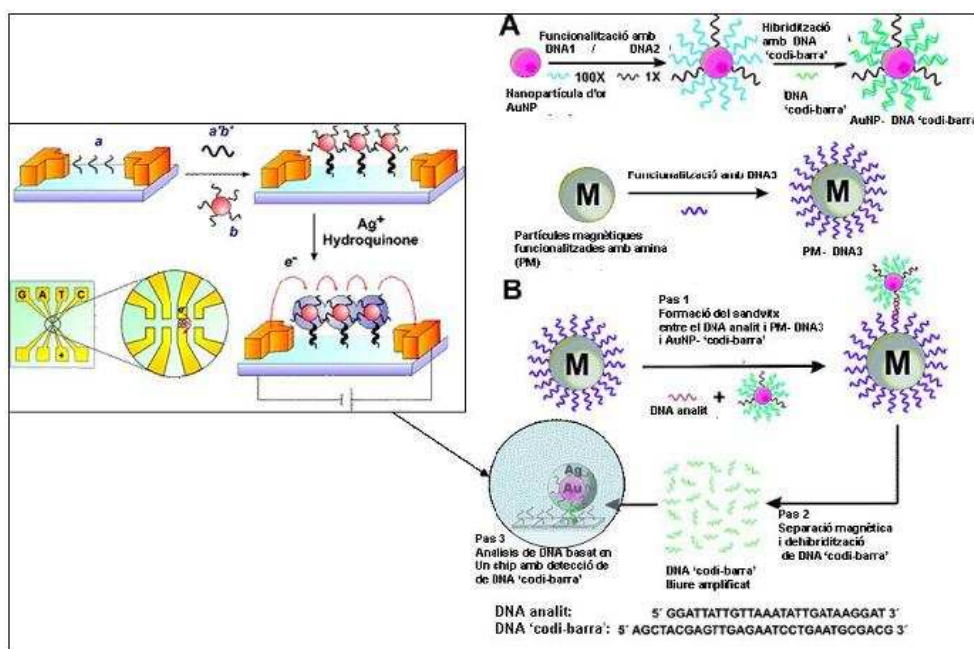


**Figura 4.** Representacions esquemàtiques, no en escala, de: A) Detecció simultània de tres sondes de DNA relacionades amb el càncer de mama detectades simultàniament mitjançant l'ús de tres punts quàntics (QDs; ZnS, CdS i PbS). Cada un dels punts quàntics té un potencial red-ox diferent i fa la detecció simultània en una sola mesura de corrents durant un escombrat de potencial. En aquest assaig s'utilitzen partícules magnètiques (PM) com a plataformes d'immobilització de les sondes de captura (DNA1) que s'hibriditzen amb el DNA analít. Posteriorment el conjugat PM/DNA1/DNA analít s'hibriditza amb el DNA2 connectat amb els QDs seguit d'una separació magnètica i la detecció electroquímica. Els pics de corrent es relacionen amb el DNA analít. El seu potencial indica el punt quàntic utilitzat —i d'aquesta manera el tipus de DNA i l'altura del pic es relaciona amb la quantitat de les punts quàntics— que és proporcional amb la quantitat de DNA analít. B) Principi d'un nou genosensor basat en l'ús de nanopartícules d'or. Es fa servir un nou material per al èlectrode que inclou un imant en el seu interior. Aquest magnetosensor atrau

les partícules paramagnètiques amb el conjugat de DNA connectat amb les nanopartícules d'or. Després de la captura del conjugat es du a terme la voltametria de polsos diferencial de les nanopartícules d'or i el senyal obtingut es relaciona amb la quantitat del DNA "diana" present en la mostra. C) Un sistema de detecció basat en nanopartícules d'or i un magnetosensor (semblant al cas anterior de DNA, per la detecció de proteïnes). Es mostra una partícula magnètica modificada amb un anticòs en un sistema sandvitx amb la proteïna a detectar i un altre anticòs modificat amb nanopartícules d'or. Esquemes adaptats de les referències 6, 7 i 8 per cada exemple respectivament.

Una altra estratègia per a la detecció de DNA es basa en l'ús de nanopartícules modificades amb seqüències de DNA utilitzades com a codi de barres ('codi-barra' en la Figura 5) per a la seva posterior utilització com a marcadors per la detecció de DNA. Aquesta estratègia d'amplificació s'ofereix com a nova alternativa a la reacció en cadena per la polimerasa [10]. Des que es va introduir en el 1985, la reacció en cadena per la polimerasa ha impactat significativament en la comunitat científica que la utilitza per a la detecció i quantificació de DNA en diverses aplicacions incloent la diagnòstica. Malgrat els seus avantatges, la reacció en cadena per la polimerasa ha estat sovint criticat pel consum de temps i el procediment relativament laboriós necessari per dur a terme l'anàlisi.

En la tècnica proposta (vegeu la Figura 5) s'ha aconseguit una selectivitat i capacitat de detecció comparable a la reacció en cadena per la polimerasa sense la necessitat d'usar cap d'enzim i amb uns temps d'anàlisi de 3 a 4 hores. Per a la detecció es fa servir la tècnica conductomètrica combinada amb una segona amplificació amb plata (deposició —via reducció— de plata sobre les nanopartícules d'or).





**Figura 5.** *Esquema de la detecció de DNA mitjançant l'ús de nanopartícules d'or (AuNPs) modificades amb DNA 'codi-barra'. A) Es mostra la modificació de AuNPs amb les sondes DNA1 i DNA2 seguit de la modificació —mitjançant hibridització— amb les sondes DNA 'codi-barra'. Les micropartícules magnètiques (PM) es modifiquen amb la sonda DNA3. B) Es mostren dos passos de la detecció: 1: formació del sandvitx entre PM-DNA3 i AuNP/DNA1/DNA3/DNA 'codi-barra' i el DNA analit; 2: el sandvitx format es separa mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic. S'aplica la deshibridització per lliurar el DNA 'codi-barra' que posteriorment es detecta fent servir un xip amb detecció conductomètrica i amplificació amb plata. Adaptació de les referències 10 i 11.*

## **Conclusions**

La nanotecnologia ofereix una sèrie de millores pels mètodes de diagnòstic convencional utilitzats als laboratoris clínics. La utilització de nanopartícules com a marcadors (com a alternativa a enzims, colorants, etc.) augmenta la capacitat de detecció i disminueix el temps d'anàlisi, fent possible el disseny de nous sistemes de biodetecció amb interès per al diagnòstic clínic. Els nanobiosistemes o nanobiosensors desenvolupats representen un camp d'interès per a l'anàlisi de DNA i proteïnes amb més capacitat de detecció i selectivitat. Els dispositius desenvolupats ofereixen més prestacions quant als camps d'aplicació, possibilitats de miniaturització, estabilitat i cost. Encara que la preparació d'un nanobiosensor ideal, que integra en un únic sistema totes les parts necessàries pel seu funcionament, encara no ha estat reportat, s'està fent un gran esforç per al desenvolupament d'una nova generació de biosensors que aprofita una sèrie d'avantatges que ofereixen els nanomaterials. El camp de l'ús de nanopartícules, com a marcadors de DNA o anticossos, és només una part d'aquestes aplicacions.

## **Agraïments**

L'autor d'aquest article de revisió agraeix les ajudes de MEC (Madrid) Projectes: MAT2008-03079/NAN i MAT2005-03553 i Consolider-Ingenio 2010, Projecte CSD2006-00012 per la investigació duta a terme en el camp de nanobiosensors. Agraeix també tot els seus col·laboradors, professors i doctorands que han contribuït per dur a terme els treballs esmentats.

## **Bibliografia**

1. Vo-Dinh T. Nanotechnology in biology and medicine. Methods, devices and applications. Boca Raton: CRC Press; 2007.
2. Merkoçi A, dir. Biosensing using nanomaterials. New York: Wiley-Interscience; 2009.
3. Merkoçi A. Nanobiotechnology - drug delivery, imaging and nanobiosensors using nanomaterials. A: Puigdomènech P, Gòdia F, dir.

- Les biotecnologies. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2007; 58:51-62.
4. Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics, Clin Chem 2007;53:2002-9.
  5. Han M, Gao X, Su J.Z., Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, Nat Biotech 2001;19:631-5.
  6. Wang J, Liu G, Merkoçi A. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. JACS 2003;125:3214-15.
  7. Pumera M, Castañeda M.T, Pividori M.I, Eritja R, Merkoçi A, Alegret S. Magnetically triggered direct electrochemical detection of DNA hybridization based Au67 quantum dot - DNA - paramagnetic bead conjugate. Langmuir 2005;21:9625-9.
  8. Ambrosi A, Castañeda M.T, Killard A.J, Smyth M.R, Alegret S, Merkoçi A. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis. Anal Chem 2007;79:5232-40.
  9. Escosura-Muñiz A, Maltez-da Costa M, Merkoçi A. Controlling the electrochemical deposition of silver onto gold nanoparticles: Reducing interferences and increasing the sensitivity of magnetoimmuno assays, Biosensors & Bioelectronics 2009; 24: 2475-82.
  10. Nam JM, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. JACS 2004;126:5932-3.
  11. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. Chem Rev 2005;105:1547-62.

---

Citació recomanada per a aquest document:

Merkoçi A. Nanotecnologia i diagnòstic *in vitro*. In vitro veritas 2009;10, art. 109:  
<[www.acclc.cat/](http://www.acclc.cat/)>