

Nanopartículas de oro en la medicina: Biosensor basado en agregación para la detección de la hormona hCG

Matías Landeira¹

¹Facultad de Ingeniería, UdelaR

Resumen— Un biosensor es un dispositivo que permite la detección de un analito mediante la conversión de una respuesta biológica en una señal medible. Los biosensores ópticos cuentan con transductores que capturan señales y las transforman en datos en otros formatos. Entre los transductores más utilizados se encuentran las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos. Los biosensores que las emplean se valen de las propiedades ópticas únicas que poseen las mismas, como lo es la resonancia del plasmón de superficie (SPR). El SPR induce la absorción de la luz que incide sobre las mismas, fenómeno que puede ser detectado con un espectrofotómetro. En caso de agregación producto de la presencia del analito, la banda del SPR presenta un corrimiento que puede correlacionarse con la concentración del analito presente en la muestra. En este principio se basa un biosensor colorimétrico basado en la agregación de nanopartículas de oro. Este tipo de biosensores puede ser empleado para la detección de variadas moléculas en muestras complejas. En particular, este trabajo utiliza como analito modelo para la descripción del sistema a la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), importante biomarcador involucrado tanto en la detección temprana del embarazo como en la detección de varios tumores.

Palabras clave—AuNPs, biosensor, espectrofotómetro, hCG, nanopartículas.

I. INTRODUCCIÓN

UN biosensor es un dispositivo que permite la detección de un analito mediante la conversión de una respuesta biológica en una señal medible [1]. Estos biosensores se componen de un elemento de reconocimiento (bioreceptor), que se encarga de reconocer al analito; y un transductor, que traduce el evento de reconocimiento en la señal medible [1]. Generalmente, los biosensores destinados a la cuantificación necesitan de un procesador que convierta la señal del transductor en datos para su posterior análisis, mientras que los

biosensores destinados a la determinación cualitativa no siempre necesitan del mismo [1], [2]. Los biosensores se utilizan en la actualidad con distintos fines, desde la detección de alérgenos en comida o tóxicos en el agua, hasta la determinación de un embarazo o el diagnóstico y control de enfermedades [3].

Existen diferentes tecnologías en lo que se refiere a biosensores. En particular, aquellos que se basan en nanopartículas metálicas son ampliamente utilizados tanto en la industria como en la medicina [4]. A su vez, el desarrollo de los mismos despierta en la actualidad el interés de la comunidad científica, existiendo numerosas publicaciones sobre el tema [3], [5]–[9]. Estos biosensores se valen de las propiedades únicas que poseen las nanopartículas producidas a partir de metales nobles, como lo son el oro, la plata y el platino [10]. Estas nanopartículas son fácilmente funcionalizables, cuentan con una alta relación superficie/volumen y tienen la capacidad de responder óptica y electroquímicamente a estímulos externos [6]. Las nanopartículas metálicas más ampliamente utilizadas como transductores en biosensores son las de oro (AuNPs) [5].

Los formatos de detección de este tipo de biosensores se pueden clasificar principalmente en sistemas ópticos y electroquímicos. En particular, los sensores ópticos cuentan con transductores que capturan señales en forma de radiaciones ultravioletas, visibles o infrarrojas a partir de una reacción química, física o biológica y las transforman en datos en otros formatos [6]. Estos sensores se valen de las propiedades ópticas dependientes de tamaño de las nanopartículas, especialmente las de oro, que cuando se encuentran en forma coloidal pueden cambiar su color dependiendo del diámetro de las mismas o de su estado de agregación [6]. Los electrones en la superficie de las nanopartículas oscilan en respuesta a estímulos electromagnéticos externos. La amplitud de la oscilación es máxima a una determinada longitud de onda, a esta banda se la

conoce como plasmón de resonancia superficial (SPR, por sus siglas en inglés). El SPR induce la absorción de la luz que incide con una longitud de onda determinada y este fenómeno puede detectarse utilizando un espectrofotómetro [6]. Si la distancia entre las nanopartículas disminuye producto de la agregación de las mismas, la longitud de onda de absorción cambia, en este principio se basan los biosensores colorimétricos basados en agregación de nanopartículas de oro [6].

Estos biosensores pueden ser utilizados para determinar la concentración de una gran variedad de moléculas presentes en una muestra. En particular, este trabajo se enfoca en la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). La hCG es un importante biomarcador presente en la orina y sangre de mujeres embarazadas. A su vez, niveles elevados de esta hormona fueron encontrados en numerosos tumores, como coriocarcinomas, tumores de células germinales, embarazos molares, tumores de próstata y tumores de células de los islotes pancreáticos [11]. Por estas razones es que resulta de interés la cuantificación de esta hormona en el suero o en la orina.

El objetivo de esta monografía es enfocarse en los distintos componentes que incluye un biosensor basado en la agregación de nanopartículas de oro para cuantificar hCG y su función dentro del sistema. Se busca además destacar el rol del espectrofotómetro y las bases de su funcionamiento para la determinación de la concentración exacta del analito.

II. DETECCIÓN DE LA HORMONA HCG

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica compuesta por dos subunidades distintas α y β -unidas de forma no covalente, con un peso total de 36,7 kDa [12], [13]. Esta hormona es normalmente sintetizada por las células de la placenta de las mujeres embarazadas, siendo un importante biomarcador para la detección del embarazo [11], [13]. No obstante, se ha comprobado la producción de hCG por una variedad de tumores malignos, por lo que la detección de esta hormona en el suero o en la orina es un indicador tanto de embarazo como de neoplasia [13]. Dada la importancia de este antígeno y su cuantificación es que se plantea como analito modelo en la descripción de un biosensor basado en la agregación de nanopartículas de oro.

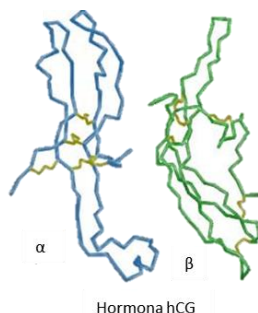


Fig. 1. Estructura de la hormona hCG. Adaptado de McGill Physiology Virtual Lab [14].

Como se mencionó con anterioridad, la detección de esta hormona no solo permite determinar embarazos de forma temprana sino que también posibilita el diagnóstico y el seguimiento en el tratamiento de varios cánceres. La posibilidad de determinar una baja en la concentración de hCG en una muestra de un paciente oncológico indica un tratamiento exitoso [13]. La detección de esta hormona utilizando anticuerpos resulta compleja ya que la estructura de la subunidad α de la hCG es muy similar a las subunidades α de otras hormonas como la tirotrópina o la hormona luteinizante. Por esta razón, con el fin de minimizar la posibilidad de uniones inespecíficas que lleven a falsos positivos, la detección de esta hormona se da generalmente a través de la interacción del anticuerpo con su subunidad β (Fig.1) [13].

III. COMPONENTES DE UN NANOBIOSENSOR DE AGREGACIÓN

Los biosensores en general se componen por tres elementos fundamentales (Fig. 2)[1]:

- Bioreceptor: Elemento de reconocimiento de naturaleza biológica que interactúa con el analito.
- Transductor: Encargado de convertir el evento de reconocimiento en una señal medible.
- Detector: Dispositivo que capta la señal emitida por el transductor y permite el procesamiento de datos.

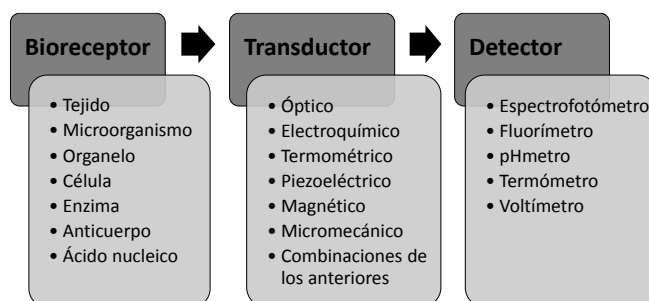


Fig. 2. Componentes básicos de un biosensor. Adaptado de Velusamy *et al* [1].

Cuando se trata de un nanobiosensor colorimétrico basado en la agregación de nanopartículas de oro, el bioreceptor es usualmente un anticuerpo, las nanopartículas ofician como transductores ópticos y la señal medible es detectada por un espectrofotómetro.

Los anticuerpos empleados para el reconocimiento en biosensores son preferiblemente monoclonales, generalmente producidos por hibridomas de ratón [2]. En particular, para el reconocimiento de la hormona hCG existen anticuerpos monoclonales comerciales, tanto para la subunidad α como la β [12]. Utilizando anticuerpos monoclonales se logra disminuir el riesgo de reacciones cruzadas, ya que como se mencionó con anterioridad, la hormona hCG presenta alta homología con otras hormonas presentes en el suero o la orina. Estos anticuerpos reconocen epítopes específicos de la hormona por lo que aumentan significativamente la especificidad del ensayo. De todas formas, a modo alternativo, se pueden emplear anticuerpos policlonales obtenidos a través de la inoculación de

animales con la subunidad β de la hormona hCG [13].

Las nanopartículas de oro (AuNPs) utilizadas como transductores en biosensores pueden adquirirse de fuentes comerciales o bien ser sintetizadas de manera simple en un laboratorio [15]. El método de síntesis de AuNPs esféricas más comúnmente utilizado es el de Turkevich, desarrollado en 1951. Este método utiliza citrato como agente reductor y estabilizador, que al ser agregado a una solución en ebullición de ácido cloroáurico participa en la formación de nanopartículas de 20 nm de diámetro [10]. Una de las ventajas del empleo de AuNPs es la posibilidad de modificar su superficie con estrategias de funcionalización [10]. Generalmente los anticuerpos, como todas las proteínas, pueden adsorberse a la superficie de las AuNPs por interacciones entre los residuos de la proteína y los ligandos presentes en la superficie. De todas formas, para crear una interacción más robusta se busca generar uniones covalentes entre el anticuerpo y la superficie de la AuNP [10].

La detección se lleva a cabo por un espectrofotómetro, un dispositivo capaz de medir la absorbancia de una muestra, en este caso, de una suspensión de AuNPs [16]. La absorbancia se define como:

$$Abs = \log_{10} \frac{I_0}{I_t} \quad (1)$$

Siendo I_0 la intensidad de luz inicial e I_t la intensidad de luz resultante luego de atravesar la muestra.

Un espectrofotómetro básico se compone de (Fig. 3):

- Fuente de luz: Generalmente poseen lámparas de deuterio y tungsteno para cubrir todo el espectro UV-Visible.
- Colimador: Lente encargado de homogenizar la trayectoria de los rayos de luz que viajan desde la fuente de luz al monocromador.
- Monocromador: Generalmente un prisma cuya función es separar espacialmente los haces de luz de diferente longitud de onda.
- Selector de longitud de onda: Ranura móvil que permite seleccionar la longitud de onda de la luz que atravesará la muestra.
- Compartimento de la muestra: Espacio destinado para la colocación de la cubeta conteniendo la muestra líquida a analizar.
- Detector: Célula fotoeléctrica que capta los fotones de la luz no absorbida por la muestra y los convierte en una señal eléctrica.
- Pantalla: Visualizador que muestra el valor de absorbancia calculado por el equipo a partir de los valores de I_0 e I_t obtenidos por el detector.

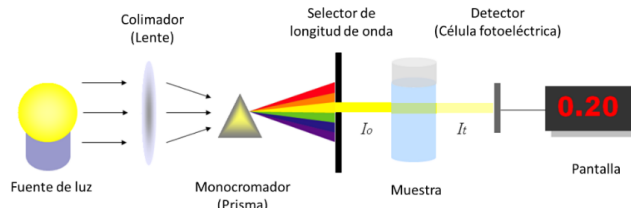


Fig. 3. Esquema general de un espectrofotómetro. Adaptado de Filip *et al* [17]

IV. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL NANOBIOSENSOR

Los biosensores colorimétricos basados en la agregación de AuNPs se valen de las propiedades únicas que poseen estas últimas. Además de poseer una alta relación superficie/volumen, alta conductividad eléctrica y ser fácilmente funcionalizables, las AuNPs tienen propiedades ópticas y espectrales únicas que les permiten responder óptica y electroquímicamente a estímulos externos [6].

Al incidir un rayo de luz sobre una nanopartícula de un metal noble como el oro, los electrones cercanos a la superficie oscilan [6]. La amplitud de esta oscilación es máxima a una determinada longitud de onda, a esta banda se le denomina plasmón de resonancia superficial (SPR) (Fig. 4B)[6]. Las características de la banda del SPR dependen tanto del diámetro de la nanopartícula como de su forma, el solvente en el que se encuentre, el ligando que posean en su superficie e incluso de la proximidad entre las mismas [18].

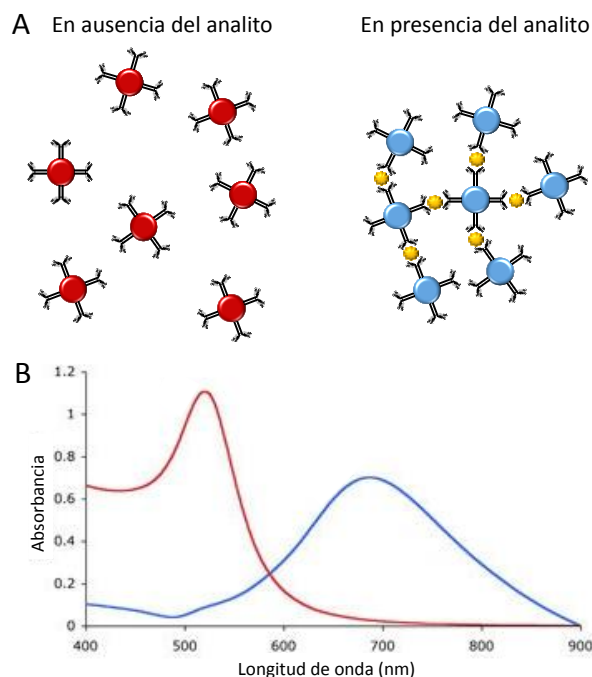


Fig. 4. A) Estado de agregación de AuNPs funcionalizadas con anticuerpos anti-hCG en ausencia o presencia de la hormona hCG. B) Corrimiento de la banda del SPR producto de la agregación de las AuNPs. Adaptado de Cytodiagnosics [19].

Una solución de AuNPs monodispersa emite en el color rojo. Cuando se da una interacción entre AuNPs funcionalizadas con anticuerpos específicos y el analito, en este caso la hormona hCG, resulta en el agregado y consecuente aumento en la proximidad de las AuNPs (Fig. 4A)[20]. El agregado de las AuNPs provoca un corrimiento de la banda correspondiente al SPR hacia longitudes de onda mayores, pasando a emitir en el color azul (Fig. 4B) [21]. Este fenómeno puede ser medido por absorción de la luz (absorbancia), con la ayuda de un espectrofotómetro [20].

Al desarrollar este tipo de biosensores, es importante encontrar una relación óptima de nanopartícula/analito, ya que el mismo se basa en la interacción entre ambos. En caso de tener un exceso de analito frente a la concentración de nanopartículas, la concentración de analito podrá ser subestimada, ya que será menos probable que una misma molécula de analito sea reconocida por más de una nanopartícula. Si en caso contrario se colocan nanopartículas en exceso, el reconocimiento del analito por parte de las mismas se verá enmascarado por la cantidad de nanopartículas libres que se encontrarán en el medio. En ambos casos es probable que no se produzca un corrimiento significativo de la banda del SPR.

La determinación de la concentración exacta de una muestra necesita además de la construcción de una curva de calibración. Para ello se debe probar el biosensor con concentraciones conocidas de un estándar de hCG y asociar el corrimiento de la banda del SPR con la concentración presente en la muestra.

V. CONCLUSIONES

En los últimos años, el uso de biosensores basados en nanopartículas de oro ha incrementado, siendo además tópico central de numerosas publicaciones científicas. La gran versatilidad de estas nanopartículas y sus propiedades únicas las hacen transductores ideales para su empleo en biosensores colorimétricos basados en agregación. Estos biosensores se basan en el corrimiento de la banda correspondiente al plasmón de resonancia superficial producto del aumento en la proximidad de las mismas en presencia del analito.

Este tipo de biosensores puede ser utilizado para detectar una gran variedad de moléculas en muestras biológicas complejas. En particular, en este trabajo se utiliza como analito modelo la hormona hCG. La detección de esta hormona en muestras de orina o suero es fundamental, ya que no solamente se emplea para detección temprana del embarazo, sino que también puede indicar la presencia de varios tipos de tumores. La hormona hCG es un importante marcador tumoral que se encuentra presente en la sangre y orina de pacientes que padecen de coriocarcinomas, tumores de células germinales, tumores de próstata o tumores de células de los islotes pancreáticos entre otros. Un biosensor de este tipo resulta una herramienta de gran utilidad para el seguimiento del tratamiento de estos pacientes, pudiendo detectar cambios en la concentración de la hormona

que permitan determinar el éxito del mismo.

REFERENCIAS

- [1] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, 2010.
- [2] K. M. Koczula and A. Gallotta, "Lateral flow assays," *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 111–120, 2016.
- [3] D. Quesada-González and A. Merkoçi, "Nanoparticle-based lateral flow biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 73, pp. 47–63, 2015.
- [4] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications – A review," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016.
- [5] L. Syedmoradi, M. Daneshpour, M. Alvandipour, F. A. Gomez, H. Hajghassem, and K. Omidfar, "Point of care testing: The impact of nanotechnology," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, pp. 373–387, 2017.
- [6] R. Sharma, K. V. Ragavan, M. S. Thakur, and K. S. M. S. Raghavarao, "Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 612–627, 2015.
- [7] P. Wang, Z. Lin, X. Su, and Z. Tang, "Application of Au based nanomaterials in analytical science," *Nano Today*, vol. 12, pp. 64–97, 2017.
- [8] C. I. L. Justino, A. C. Duarte, and T. A. P. Rocha-Santos, "Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 36–60, 2016.
- [9] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. Marago, and M. A. Iati, "Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 29, 2017.
- [10] C. Couto, R. Vitorino, and A. L. Daniel-da-Silva, "Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 238–250, 2017.
- [11] L. Cao, C. Fang, R. Zeng, X. Zhao, Y. Jiang, and Z. Chen, "Paper-based microfluidic devices for electrochemical immunofiltration analysis of human chorionic gonadotropin," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 92, no. January, pp. 87–94, 2017.
- [12] S. A. Butler, S. A. Khanlian, and L. A. Cole, "Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices," *Clin. Chem.*, vol. 47, no. 12, pp. 2131–2136, 2001.
- [13] J. Parsons, *Peptide Hormones*, Macmillan. London, 1976.
- [14] McGill Physiology Virtual Lab, "Background concepts: Reproduction hormones." [Online]. Available: https://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/Other_exps/endo/repro_d_horm.htm. [Accessed: 01-Jul-18C].
- [15] Millipore, "Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for product development," 2008.
- [16] GE Healthcare Life Sciences, "Spectrophotometry Handbook," Boston, 2012.
- [17] M. S. Filip, E. V. Macocian, A. M. Toderas, and A. Cărbăban, "SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS TECHNIQUES FOR BASE THEORY FOR UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS," 2012.
- [18] Y. Panahi *et al.*, "Preparation, Surface Properties, and Therapeutic Applications of Gold Nanoparticles in Biomedicine," *Drug Res. (Stuttg.)*, vol. 67, no. 2, pp. 77–87, 2016.
- [19] Cytodiagnosics, "Introduction to Gold Nanoparticle Characterization." [Online]. Available: <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Introduction-to-Gold-Nanoparticle-Characterization-d3.htm>. [Accessed: 01-Jul-18C].
- [20] M. Perfèzou, A. Turner, and A. Merkoçi, "Cancer detection using nanoparticle-based sensors," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2606–2622, 2012.
- [21] C.-C. Chang, C.-Y. Chen, C.-P. Chen, and C.-W. Lin, "Facile colorimetric detection of human chorionic gonadotropin based on the peptide-induced aggregation of gold nanoparticles," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 29–33, 2015.