

ISSN: 1988-2688<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2011 5(1):69-102*

PUNTOS CUÁNTICOS: NUEVA APORTACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN INVESTIGACIÓN Y MEDICINA.

QUANTUM DOTS: THE NEW CONTRIBUTION OF NANOTECHNOLOGY TO RESEARCH AND MEDICINE.

Pombo Barros, V y Goyanes Villaescusa V.

Dto. Genética, Facultad de Veterinaria, UCM

RESUMEN

Los Puntos Cuántico (PCs) son nanocristales más fotoestables, monocromáticos y brillantes que cualquier fluorocromo. Estas cualidades y su capacidad de formar múltiples constructos (funcionalización con anticuerpos, oligonucleótidos, Biotina, lectinas, iones magnéticos, etc.) les otorgan una enorme versatilidad analítica y una sensibilidad a nivel de molécula única.

Además de mejorar determinaciones estándar como el PSA, los PCs ofrecen nuevas alternativas en Western blotting y citometría de flujo. La manufacturación de “laboratorios en un chip” es uno de los productos nanotecnológicos más destacados ya que permiten múltiples análisis simultáneos, a tiempo real, con un coste reducido y cantidades ínfimas de muestra. En el campo de la biotecnología los PCs son útiles en la identificación génica por código de barras multicolor en microchips. Los PCs unidos a ACs específicos permiten la detección por fluorescencia de diversas dianas en rutas metabólicas intracitoplasmáticas de células vivas sin alterar su fisiología. Más aún, permiten comprender, a la vez, el tráfico de proteínas, su localización, reciclaje y función en lo que se viene llamando Proteómica Visual.

Nuevas aplicaciones en oncología clínica permiten identificar células cancerosas aisladas en sangre circulante y una mayor exactitud en el mapeado de Glanglio centinela en neoplasias de mama, así como conseguir discriminar selectivamente el nódulo tumoral en neurocirugía cerebral. ¿Estamos a las puertas del diagnóstico y terapia secuenciales por PCs en el mismo acto médico; biopsia óptica?. La medicina regenerativa promete terapias sustitutivas de órganos y tejidos generados “in vitro”. Los nanotubos de carbono actúan mejorando los

sustratos para el crecimiento celular diferenciado de células madre. Además, son útiles para la liberación controlada de medicinas, en particular citoestáticos unidos a ACs oncoespecíficos, y como vehículo de vectores genéticos. La Nanotecnología y los Puntos Quánticos en particular representan el futuro del diagnóstico del laboratorio, la biología celular y la terapia oncológica.

ABSTRACT

Quantum Dots (QDs) are more fotostable, monochromatic and brilliant than any standard fluorochrome. These qualities and their capacity to build different constructors (targeted with antibodies, oligonucleotides, Biotine, lectines, magnetic ions, etc) allow them a wide versatility and sensibility, even to single molecular levels. Furthermore, improving standard PSA and other tests QDs represent a new alternative in Western blotting and flow citometry. Laboratories-on-a-chip, one of the more original nanoproducts, makes possible a wide variety of clinical tests simultaneously at real time, low cost and a minimal amount of sample. QDs are also being employed in biotechnology to genetic identifications through multicolor barcodes on microchips. QDs nanocrystal-labeled antibodies allow simultaneous and safe detection of multiple molecules in metabolic tracts inside living cells. Even traffic, localization, turnover and function of proteins can be understood at a time, giving birth to Visual Proteomics. New implementations in clinical oncology enable cancer cells recognition in circulating blood, more precise identification of the sentinel node in breast neoplasia as well as selectively delimitate malignant growths in brain surgery. Are we close to a sequential diagnosis and therapy in a single medical act by Quantum Dots; the optical biopsy? Regenerative medicine promises replacement therapy of organs and tissues growth "in vitro". Carbon Nanotubes improve the substratum to steam cells differentiation as well as under control drugs release, particularly targeted citostatics or genetic vectors. Nanotechnology and particularly Quantum Dots represent the future tools for laboratory diagnosis, cell biology and cancer therapy.

La medicina desde siempre ha incorporado sistemáticamente los avances científicos más relevantes. La ciencia nanotecnológica, hasta ahora empleada en Química Analítica, física o Biología molecular experimental (1), aporta herramientas novedosas en clínica humana y, particularmente, en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

La inmunofluorescencia, técnica muy sensible de identificación, ha supuesto un gran avance en biomedicina, tanto que actualmente se ha hecho imprescindible en cualquier laboratorio de citodiagnóstico, anatomía patológica y hematología. Sin embargo, el período de emisión de señal de los fluorocromos decae rápidamente al ser excitados con luz ultravioleta, requiriéndose acoplamientos sucesivos de AGs-ACs marcados a fin de incrementar la señal (sandwiches).

La nanotecnología lo soluciona con PCs, uno de sus productos estrella. Estos nanocristales fluorescen durante días, con gran intensidad y sin necesidad de acoplamientos, pudiendo aplicarse “in vivo” e “in vitro”. Estas y otras novedosas ventajas han ocupado páginas de SCIENCE, NATURE, PNAS, etc.

Además, la nanotecnología renueva áreas fundamentales de la medicina como el diagnóstico por imagen y el tratamiento farmacológico y quirúrgico (2).

¿Se imaginan poder pesar una única bacteria o incluso una biomolécula aislada empleando un microinstrumento (3)?, ¿identificar moléculas únicas de cualquier metabolito (4)?, ¿detectar simultáneamente múltiples componentes en células vivas dando lugar a la Proteómica visual?

¿Qué es un Punto Cuántico? Estructura, síntesis, aplicaciones.

Definición, estructura y propiedades físicas

La nanotecnología diseña, fabrica y aplica instrumentos de dimensiones comprendidas entre unos pocos nanómetros a unas 2-3 micras, como PCs, nanotubos de carbono, nanorrobots, nanopartículas de oro y magnéticas.

Los PCs son cristales coloidales semiconductores, constituidos por cientos o miles de átomos ordenados en una estructura cristalina de forma habitualmente esférica y de dimensiones entre nanómetros y algunas micras. Su característica esencial es que los electrones que lo constituyen están obligados a mantenerse confinados en las tres dimensiones, lo que genera diversos fenómenos cuánticos. Para que dicho proceso tenga lugar, el tamaño de los PCs ha de ser similar al radio del excitón de Bohr (10nm para los semiconductores en general). Es decir, se comportan como un único átomo, por lo que también se les denomina “átomos artificiales”.

Un PC está formado por un núcleo de Sulfuro de Plomo, Sulfuro de Zinc, Seleniuro Cálculo o de compuestos fosforados de indio, aunque el más frecuente es de CdSe (2,5-4nm de diámetro). Cubriendo este núcleo cristalino central se encuentra una multicapa, usualmente de ZnS, de algunos átomos de espesor que mejora sensiblemente la capacidad del PC para emitir luz cuando es fotoexcitado evitando, así, fenómenos de aglutinación. Para solubilizarlos, se recubren externamente con una capa polimérica que puede ser de TOP (trioctilfosfina), de TOPO (óxido de trioctilfosfina), ormosil, etc (FIGURA 1). Finalmente y mediante el tratamiento con determinados componentes químicos que dependerá de la futura aplicación, se obtienen los radicales necesarios que sobresalen de este conjunto para unir el PC a diferentes moléculas dianas.

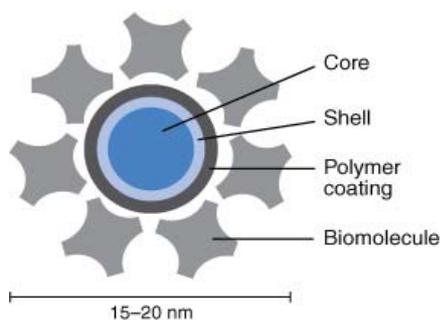


Figura 1. Estructura esquemática de un Punto Cuántico que muestra los distintos elementos necesarios para su uso en Biomedicina.

Destacamos algunas de sus **propiedades más importantes**:

1-El tamaño del PC es lo que determina la longitud de onda a la que emite y no su composición. Así, tamaños de 2nm emiten en azul, de 2,3nm en verde, de 3,5nm en naranja y tamaños de aproximadamente 6nm en rojo. (FIGURA 2). Los PCs más pequeños producen

luz de menor longitud de onda, por lo que las propiedades cuánticas de la luz emitida por los mismos son más acusadas y evidentes.

2- Cualquiera que sea la longitud de onda de excitación (visible, ultravioleta o infrarrojo), el PC emite un haz de luz monocromático, intenso y con un espectro de emisión siempre muy estrecho, simétrico y sin solapamientos. Estos factores mejoran notablemente su fotoestabilidad comparados con los colorantes fluorescentes comunes (5). Gracias a dicha propiedad, una vez fotoexcitado, un PC puede brillar durante horas o días, mientras que los fluorocromos convencionales permanecen estables sólo durante unos pocos segundos o minutos

3-En relación a estos últimos, los PCs son más brillantes debido a sus mayores coeficientes de excitación, campos cuánticos y similares niveles de saturación de emisión.

4-Con un único haz de luz de excitación se logra estimular simultáneamente PCs de diferentes tamaños (FIGURA 2), lo que permite, en la práctica, detectar a la vez muchos componentes moleculares en una misma célula viva o fijada.

5- Pueden ser añadidas diferentes moléculas al PC a fin de conferirle una gran variedad de aplicaciones.

6-Su empleo no distorsiona la fisiología celular.

Excitación simultánea a 365nm



Figura 2. Nanocristales de diferentes tamaños, excitados con una misma fuente de luz ultravioleta emiten haces intensos y muy duraderos de luz monocromática. El tamaño del Punto cuántico, a escala de Amgstroms, determina el color.

¿Cómo se sintetiza un Punto Cuántico?

El procedimiento más simple y universalmente seguido es la **síntesis coloidal** o también denominada **síntesis orgánica**. Con el uso de soluciones madre de Selenio, Teluro, Sulfuro u otros y mediante pirólisis en un solvente de coordinación muy caliente como el TOP o TOPO, se obtienen PCs de alta calidad, tal como los formados por CdTe, CdSe, CdS y derivados. Esta cobertura de TOP o TOPO evita procesos de agregación. Por otra parte, el proceso de síntesis puede ser mejorado sustituyendo el Cd (CH₃)₂ por CdO como donador del Cadmio. En general, los PC resultantes de la síntesis coloidal presentan una excelente cristalinidad y bajísimos defectos estructurales (6).

Otra ruta para constituir nanocristales de CdTe se denomina **fase acuosa**. Se basa en la reacción de sales metálicas (NaHTe, NaHSe o sales de Cadmio) que, junto con compuestos tiónicos (como reactivos para cubrir el PC), mercaptoetanol y tioglicerol estabilizan el nanocristal. En este caso, se emplea Al₂Te₃ como fuente de H₂Te. Por este proceder también se han obtenido nanocristales de CdSe, CdTe y HeTe. El uso de altas temperaturas empleando el microondas (7) mejora sensiblemente el campo cuántico y logra acortar los tiempos de síntesis.

Comparativamente con la síntesis orgánica, la acuosa resulta más barata y sencilla, obteniéndose cristales de baja toxicidad, solubles en agua y estables (8).

Partiendo de PCs producidos por síntesis coloidal, para biocompatibilizarlos se encapsulan con polímeros anfifílicos que los solubilizan en agua, haciéndolos resistentes a la degradación por enzimas o agentes químicos.

En Biomedicina los PCs suelen emplearse como estructuras individuales organizadas en complejos de dos o tres dimensiones, conservando sus propiedades físicas y su naturaleza como cristales semiconductores. Pero su utilización más general creó la necesidad de nuevas formas de organización. Así, surgió la idea de conectarlos en hileras, fabricando “alambres” con diversas conformaciones para emplearlos como estructuras moleculares activas, tanto eléctrica como ópticamente. Un paso más allá supuso la creación de láminas poliméricas, en donde los PCs se estructuran en organizaciones complejas bi y tridimensionales. Estas últimas se construyen superponiendo varias láminas consecutivas de PCs sobre una base cristalina.

Estos complejos sistemas se emplean habitualmente en identificación molecular.

Puntos cuánticos en Biomedicina.

Unión a biomoléculas (funcionalización)

Los PCs desnudos y en contacto con materiales biológicos son tóxicos. Para obtener PCs funcionales, primero han de solubilizarse con polímeros anfifílicos, como TOP/TOPO, ormosil u otros, para funcionalizarlos posteriormente ligándolos a diversas proteínas tales como ACs, lectinas, péptidos, a iones magnéticos, metales, inmunoligantes (Biotina, Avidina, Streptabidina), hormonas vegetales, oligonucleótidos, etc. Pronto se evidenció que estos constructos eran una herramienta óptima por la excepcional estabilidad de sus propiedades ópticas (9) y por no dañar a las células vivas o tejido diana.

Para funcionalizarlos pueden seguirse varias estrategias: unir los PCs a proteínaA/Proteína G, a proteínas de fusión unidas posteriormente a ACs, péptidos marcados con histidina, Streptabidina asociada a un Ac biotinilado, etc. Así, la orientación de la unión con la biomolécula puede ser controlada, lo que posibilita su uso en tecnologías como arrays, inmunomarcado de proteínas y microtúbulos (10).

Una mejora consiste en emplear PCs multifuncionales. Para ello, se crean PCs unidos a diversos ligantes de afinidad tumoral como los ya mencionados péptidos específicos, ACs primarios e incluso medicamentos. La posterior inyección de estos constructos nos permitirá identificar simultáneamente diversas dianas como las células neoplásicas, su red vascular y demás.

Estos grupos de ligamiento de superficie también pueden emplearse para convertir los PCs en sondas multipotentes capaces de: cruzar membranas celulares “in vivo”, liberar medicamentos, realizar funciones enzimáticas, etc.

¿Pero, cómo se une un PC a un Ac? ¿Cómo ligarlo al extremo de un oligonucleótido?: Los grupos OH- de TOP/TOPO, por ejemplo, pueden ligarse a ACs mediante el empleo de EDC (*N*-ethyl-*N'*-3-diethylaminopropyl carbodiimida), que induce enlaces cruzados entre los

grupos $-NH_2$, $-SH$ o $-COOH$ de los PCs y las aminas propias de la proteína (FIGURA 3). Esta técnica es directa, lo que evita modificaciones posteriores. Otro método emplea polímeros anfifílicos como el PDMAEMA (polidimetilaminoetil metacrilato) el PEI (polietilenamina) o el ácido mercaptoacético.

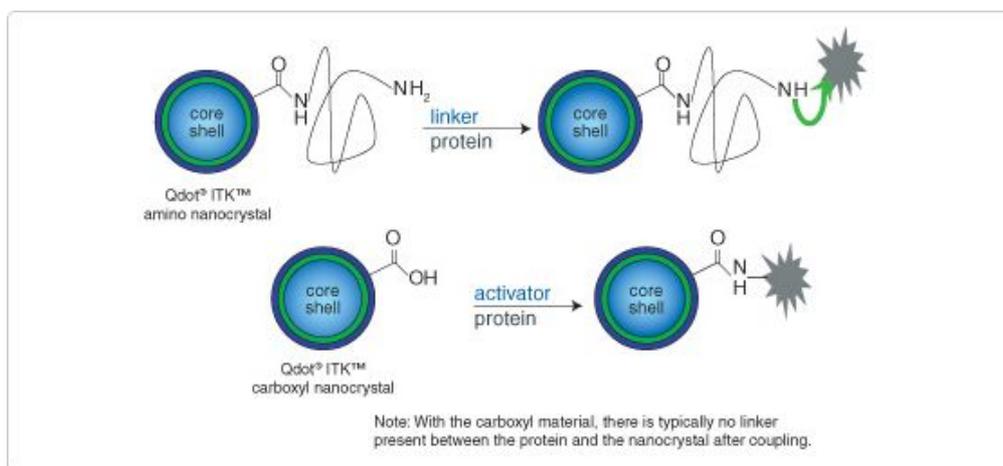


Figura 3. Funcionalización de PCs vía PEG (arriba) o vía EDC (carbodiimida) (abajo).

Finalmente, para evitar uniones no específicas, suelen ligarse a polietilenglicol (PEG) o a otros compuestos similares. Además, en algunos casos, se realizaron funcionalizaciones consecutivas con el fin de añadir o modificar la actividad biológica de los PCs.

Análisis Clínicos.

Determinación de PSA: Es una glucoproteína presente en el citoplasma de las células epiteliales prostáticas. El PSA total en suero, así como el PSA libre y el algoritmo que los relaciona, son el marcador de elección para detectar precozmente el carcinoma prostático humano. La nanotecnología ofrece **novedosas posibilidades:**

Härmä H. et al. (11), partiendo de PCs-europium cubiertos de Streptavidina (emitiendo a 107nm) identificaron moléculas de PSA biotiniladas a un límite de detección de 0,38ng/L. Este protocolo pudo aplicarse en fase líquida, sólida e incluso pudieron detectarse moléculas individuales de PSA por microscopía fluorescente.

Otra aproximación bioquímica, rápida e ingeniosa, emplea por un lado, nanopartículas

magnéticas unidas a ACs monoclonales contra el PSA y por otro, nanopartículas de oro unidas a ACs policlonales contra dicho marcador. A éstas últimas se le unieron oligonucleótidos que actuarían como un código de barras (ver apartado genética molecular). Para su detección emplearon técnicas de identificación de ADN alcanzándose niveles de sensibilidad de 30 nmol/L por 10 microlitros de muestra. Puede mejorarse la sensibilidad aumentando la concentración de la partícula magnética (12).

Determinación del Alzheimer: Se ha descubierto para esta entidad un biomarcador difusible a través de membranas derivado de un β -amiloide (ADDLs). Empleando un Ac monoclonal específico contra dicho biomarcador y otro policlonal, Georganopoulou et al. (13), mediante una prueba de código de barras de ADN, determinaron la concentración del biomarcador en líquido cefalorraquídeo. Esta prueba, también aplicable a suero, es de tal sensibilidad que permite cuantificar hasta 5 moléculas de ADDLs por mL de líquido cefalorraquídeo, demostrándose que su sensibilidad supera en cientos de miles de veces la del ELISA habitual.

Western blotting: En comparación con los sistemas convencionales, el empleo de PCs mejora la linealidad y definición de las bandas de electroforesis a la vez que posibilita un marcado simultáneo multicolor con niveles de sensibilidad superiores a los obtenidos con los métodos tradicionales de quimioluminiscencia (FIGURA 3). Con ello se logró una excelente detección de proteínas diana TRF1 y Tin2 a concentraciones crecientes en células leucémicas mediante enlaces cruzados entre ACs biotinilados y PCs-Avidina, demostrando la bondad del sistema.

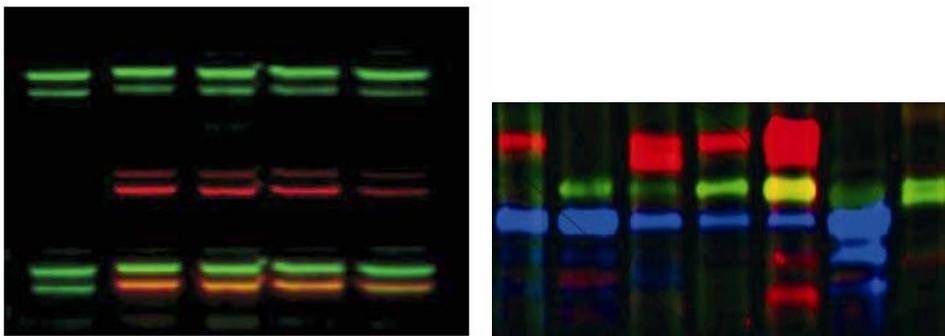


Figura 3. Western blotting multicolor utilizando Puntos Cuánticos de diferentes tamaños conjugados a anticuerpos secundarios. Se mejora la linealidad de las bandas ofreciendo una óptima identificación y permitiendo además, una sensibilidad tan elevada como la de la quimioluminiscencia, pero con mayor estabilidad (permanecen brillando horas o días), resultando tan sencillo como el uso de fluorescentes habituales.

Citometría de flujo-FACS: Con la ayuda de un software específico, este método separa

moléculas o células enteras marcadas con fluorocromos al atravesar un capilar de cristal iluminado con láser. Este proceder es ya imprescindible en la clasificación y cuantificación de diversos tipos celulares en enfermedades hematológicas malignas, cinética celular normal y tumoral, etc. La aplicación de inmunomarcados utilizando ACs-PCs mejora el sistema a cuatro niveles: permite trabajar simultáneamente con un número superior a diez PCs de diferentes tamaños (diferentes emisiones de luz, por tanto, diferentes colores); emplear láser violeta (entre 410-480 nm) y ultravioleta simultáneamente, a la vez que ACs primarios y secundarios y también añadir al sistema fluorocromos convencionales. Todo ello incrementa muy notablemente la sensibilidad, precisión, versatilidad y resolución respectivamente, llevando a este sistema a límites hasta ahora no alcanzados.

Nanocápsulas de oro en análisis directo de sangre total: Las nanopartículas de oro presentan un comportamiento muy similar a los coloides de su misma composición. Su núcleo dieléctrico está constituido por sulfuro de oro recubierto de una fina capa áurica. Una elección cuidadosa del grosor del núcleo y de su envoltura, posibilita una resonancia óptica hacia la mitad del infrarrojo. Con pequeños cambios posteriores en su estructura podemos llegar a longitudes de onda de absorción cercanos al infrarrojo, situándolos entre la absorción de la Hemoglobina y la del agua, lo que faculta el análisis directo de sangre entera. Así, podemos inmunoanalizar simultáneamente diversos elementos antigénicos, más rápida y económicamente que en el laboratorio de rutina.

Microlaboratorio en un chip: Recientemente se ha desarrollado una tecnología analítica revolucionaria denominada “lab-on-a-chip” para el diagnóstico clínico. Su importancia es de tal magnitud, que ya contamos con una revista llamada *Lab on a chip* dedicada exclusivamente a esta herramienta.

A groso modo, consiste en una placa base sobre la que se integran miniplataformas que contienen micropalanca molecular (Cantilevers) donde se llevan a cabo las reacciones químicas. Las micropalanca se doblan algunos nanómetros en el momento en el que la molécula investigada interacciona con ellas, generando una señal indicadora de la positividad de la reacción. Dicha señal viene dada por la oscilación de la micropalanca y por su posición media.

Los diseñadores de estos nuevos ingenios pronostican que los “laboratorio-en-un-chip” revolucionarán la praxis analítica ya que pueden realizarse a domicilio múltiples análisis simultáneamente depositando una gota de sangre sobre la placa, ofreciendo rapidez, sencillez y bajo consumo (14).

Además, es útil en diferentes campos de laboratorio: en la identificación de especies bacterianas como la Salmonela a niveles de detección tan sensible que, incluso con 25 de estos microorganismos, obtendríamos positividad en la prueba; en la detección de PSA; troponinas miocárdicas (marcadores para lesiones de corazón); acetona y dimetilamina en el aliento, etc.

Jeremy Levitan, matemático del MIT (15), ha creado un laboratorio en un chip para ser aplicado en personal de las fuerzas armadas. Se trata de una plaquita de cristal de 1 cm cuadrado equipada con pequeños canales de oro, cromo y electrodos de cobre. La clave reside en que los electrodos no están colocados en los extremos de los canales, sino en diversos lugares dentro de ellos. Los fluidos no se mueven mediante presión, sino por cargas eléctricas que aprovechan los iones del fluido, como la sangre, orina, etc. Controlar el flujo permite someter los fluidos analizados a cientos de reacciones químicas en un único dispositivo. El sistema utiliza una tapita de cristal cuya textura permite fijar las moléculas o dejar que pasen a su través. Los fluidos, al ser transportados a gran velocidad, forman remolinos que permiten a las moléculas subir y entrar en contacto con la tapa de cristal. Una de las ventajas del instrumento es poder emplear sangre muy diluida en lugar de entera y aún así analizar los mismos componentes: proteínas, ACs, AGs, ADN, etc.

Una significativa aplicación consiste en averiguar en unos minutos si un soldado ha sido expuesto a agentes biológicos o químicos. Dicho instrumento es tan pequeño que puede llevarse cosido en la ropa y sólo sería necesario un pinchacito en el dedo o una ínfima cantidad de saliva u orina para el análisis. Tras éste, los datos serían recibidos por control remoto, monitorizados para tomar las decisiones oportunas a tiempo real, lo que salvaría muchas vidas. Levitan, en un paso más allá, propone sistemas que no sólo diagnostiquen, sino que apliquen en cada caso los tratamientos correspondientes.

Según sus aplicaciones, se están diseñando **diferentes “lab-on-a-chip”**:

Nagrath y colaboradores (16) del Massachusetts General Hospital Cancer Center han logrado detectar, con un 99,1% de exactitud, células cancerosas circulando en sangre periférica, permitiendo obtener células vivas, lo que posibilita estudios genómicos comparativos entre las células cancerosas en sangre periféricas con capacidad metastásica y las del nódulo tumoral primario. Este sistema, consistente en una plaquita de 3 cm cuadrados, demostró una exactitud del 100% en voluntarios sanos.

Un equipo de investigadores de la Universidad de Pennsylvania (17) describieron un “laboratorio en un chip” para identificar biomarcadores de cánceres bucales, abriendo la puerta al rastreo de otros tipos tumorales.

Lucas L.J. et al. (18) han conjugado PCs con microesferas para permitir diagnósticos múltiples e incrementar sus límites de detección. A esta configuración la han llamado “nano-on-micro” o “NOM”. Una vez irradiado con luz ultravioleta (380nm), se obtuvo una señal lumínica más potente que la obtenida por PCs o microesferas por separado. Además, los NOMs son más fáciles de manejar que los PC y mejoran la sensibilidad del sistema de detección. Así, los autores han podido identificar dos ACs diferentes simultáneamente empleando dos protocolos distintos de detección con una mínima cantidad de muestra en un solo paso y con un único “laboratorio en un chip”.

Genética molecular.

ADN-Microchips.

Crut et al. (19) aportaron un nuevo diseño de microarrays para la detección de ADN empleando PCs. Los microarrays comunes identifican secuencias de ADN específicas o proteínas con un fluorocromo rojo y otro verde. La novedad de los PCs se basa en generar un “código de barras” de colores. Cada PC emite en seis colores distintos y cada color ofrece una escala de diez intensidades. Cada combinación generada tras la hibridación corresponde a una secuencia génica específica. Con la ayuda de un fluorómetro o un microscopio de fluorescencia podemos identificarla mediante una cuantificación simple y disponer así, de un código de barras para cada gen individual en pocos minutos.

El código de barras permite, además, el **Marcado óptico multicolor** (20) que consiste en introducir PCs de diferentes tamaños en microbolas poliméricas para incrementar aún más la sensibilidad del sistema (21).

El tamaño de los PCs dificulta posicionarlos en arrays. La solución se basó en unir el conjugado ADN-PC a clústers de oro que pueden ser fácilmente dirigidos. Ello permitió situarlos a distancias predeterminadas para obtener arrays funcionales.

Otra estrategia que hemos denominado **“determinación de la orientación a dos colores”**, liga

a cada extremo del nucleótido un PC de un determinado color mediante el sistema Biotina/Digoxigenina para conocer su orientación espacial. Ya se han diseñado nanoestructuras nanofotométricas en dos y tres dimensiones para este fin.

Nanopartículas de oro: El oro es estable y versátil. Por ello, se han utilizado nanopartículas de oro de tamaños específicos para aislar secuencias de ADN o proteínas y posteriormente identificarlas por electroforesis en geles comunes. Fortina P. et al. (22), empleando espectroscopía RAMAN, descubrieron que las nanopartículas de oro y plata son sensibles en la detección. Así, cubriendo nanopartículas de oro con plata (que alcanzan tamaños entre 40 y 100nm), detectaron proteínas y ADN por microscopía convencional de campo oscuro utilizando luz visible. Se obtuvo con ello un límite de detección para oligos por debajo de 10 fmol, una sensibilidad 50 veces mayor que con los fluorocromos convencionales.

¿Una alternativa a la PCR?: códigos de barras: Se basa en el empleo de oligos idénticos uniendo uno de ellos a micropartículas magnéticas y el otro a nanopartículas de oro. Tras hibridarlos a la muestra de ADN, se obtienen cientos o incluso miles de códigos de barras por diana. Posteriormente, se retiran las nanopartículas de oro. Con la ayuda de imanes, las micropartículas magnéticas permiten separar el híbrido con el ADN de interés. Tras varios lavados para eliminar los códigos de barras no hibridados, los hibridados son detectados mediante colorimetría. Llegamos así, a concentraciones de 500zmol/L. Resulta una alternativa mucho más sensible que la ELISA tradicional y similar a la ofrecida por la PCR. En sí mismo, este protocolo no amplifica, sino que permite agrupar gran cantidad de secuencias nucleotídicas idénticas en una misma muestra, evitando los riesgos típicos de contaminación de la PCR por ADN de otras procedencias.

Genotipado múltiple de SNPs: En el genoma existen polimorfismos que afectan a un único nucleótido (SNP). En muchos casos estas mutaciones se traducen en cambios silenciosos, es decir, sin efecto aparente. Xu et al. (23) emplearon microesferas de poliestireno codificadas mediante PCs de dos tonos de verde para identificar SNPs concretos en una muestra de ADN. Para ello usaron oligos unidos a las microbolas-PCs. Tras hibridarlos con oligos diana, el complejo oligo diana-oligo-microbola-PC fue separado por citometría de flujo. Seguidamente, se amplificó la secuencia diana con primers específicos para los diez tipos de SNPs seleccionados. La exactitud de este método llega al 100% con tan sólo 1

nanogramo de muestra por paciente.

Micropalanca (cantilevers) en la detección de ADN: Secuencias específicas de ADN se ligan a la superficie de la micropalanca molecular (24). Una vez que el ADN a investigar reconoce su secuencia complementaria en la micropalanca, ésta sufre una inclinación que se traduce en una señal óptica proporcional a la cantidad de ADN que hibridó. Si este sistema se organiza como un microarray, puede utilizarse para análisis genéticos múltiples.

Cromosomas-cariotipos.

Hoy en día aún es necesario profundizar en el conocimiento de la bioquímica y las propiedades estructurales de los cromosomas humanos para optimizar el diagnóstico de enfermedades citogenéticas. Tras obtener metafases de calidad y clasificar los cromosomas por bandeado, la hibridación “in Situ” fluorescente (FISH y FISH-painting) ha sido la técnica rutinaria en el reconocimiento y localización de secuencias o regiones cromosómicas específicas. Pero estos métodos han llegado a su límite. Un primer intento de mejora se basó en la microdissección de ADN, extrayéndolo de las Bandas G de los cromosomas mediante agujas de cristal o láser. Estos fragmentos se analizan a nivel molecular para conocer sus secuencias.

Otro intento de mejora consistió en emplear microscopía fluorescente confocal y de fuerza atómica para obtener más información acerca de bandas G y sondas cromosómicas (25), pero se necesita para ello laboratorios altamente especializados.

La opción nanotecnológica consiste en unir PCs a genes u oligos. Tras un FISH sobre cromosomas de células normales o tumorales, pueden localizarse dichas secuencias con un poder de resolución de 5 a 10 veces mayor que con el FISH convencional por fluorocromos (9, 26, 24).

Análisis de células vivas.

Los PCs son monocromáticos, más estables y brillantes que los fluorocromos. Además

de precisar menores intensidades de excitación láser y ultravioleta, posibilitan identificar a la vez: diversos componentes de la célula; tipos celulares dentro de un mismo tejido o diferenciar entre células normales y tumorales de una misma estirpe. Evitan las molestas superposiciones de longitudes de onda generadas por los fluorocromos, logrando una señal muy neta que discrimina con más exactitud los elementos de estudio. Su sensibilidad es tal que puede diferenciarse una molécula individual con un único PC. Así, en el campo de la Biología celular, permiten un estudio molecular por imagen sin necesidad de destruir la célula, ofreciendo tanta o más información que la técnica tradicional Western blot.

Una de sus mayores ventajas es poder realizar estudios moleculares a tiempo real, es decir, seguir la evolución etemporal de una molécula (sintética o propia de la célula) o estructura en células vivas. Este abordaje es más enriquecedor que cuando se trabaja sobre material fijado, ya que nos permite observar la gran pluralidad de las rutas metabólicas y sus interacciones en cada instante. Pero en ocasiones, supone mayor dificultad al tener que asumir fenómenos de agregación intracitoplasmática y superposición temporal de organelas.

Según la mayoría de publicaciones, los PCs una vez funcionarizados adecuadamente, no alteran las funciones de las biomoléculas, permitiendo así, una normal fisiología celular (FIGURA 4).

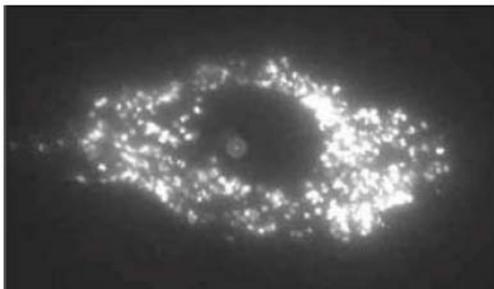


Figura 4: PCs distribuidos en vesículas a lo largo del citoplasma de células Hella. Imagen obtenida con microscopía confocal (excitación a 488nm).

Existen ya varias **modalidades para el empleo de los PCs:**

La más simple y directa, diseñado para identificar proteínas, consiste en conjugarles ACs primarios (24). Otra implica la utilización de ACs secundarios. En un ejemplo se inmunizan ratones contra un Ag específico de un tipo celular tumoral humano. Seguidamente, se obtienen en cabra AGs secundarios contra IgG de ratón, uniéndolos, acto seguido, a PCs de

tamaño definido. Este proceder facilita mucho el manejo del inmunomarcado en células vivas, fijadas o en animales enteros (FIGURA 5).

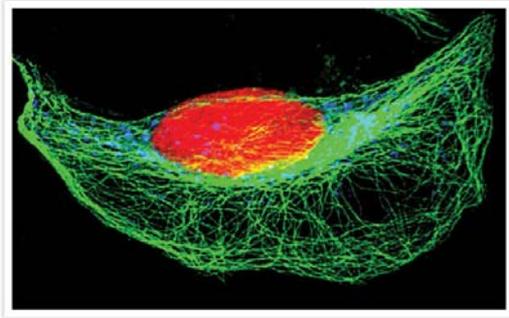


Figura 5. Célula cancerosa humana Hella. Las estructuras intracelulares fueron visualizadas utilizando PCs asociados a distintos anticuerpos secundarios. El núcleo en rojo (IgG de cabra anti-ratón), el aparato de Golgi en amarillo (IgG de cabra anti-conejo) y los microtúbulos en verde (streptavidina).

Una tercera aproximación multimodal se beneficia de la versatilidad de la unión Streptavidina-Biotina (7). El PC-Streptavidina se conjuga a un Ac biotinilado. Este complejo se añade a la muestra, lográndose la unión específica del Ac al receptor antigénico celular, localizable por microscopía de fluorescencia. Al estar el PC totalmente recubierto con Streptavidina, pueden emplearse diferentes moléculas biotiniladas para un mismo PC (27). Ya están disponibles comercialmente una gran variedad de proteínas marcadas con Biotina o Avidina, lo que facilita su uso en laboratorios pequeños. Un cuarto acercamiento fusiona el Ac a péptidos cargados positivamente o a derivados de oligohistidina, lo que evita biotinar la diana.

Cualquiera de estos procedimientos puede ser empleado en microscopía de luz, citometría de flujo, western blotting, ELISA o placas microtiter.

Receptores y proteínas de membrana.

Los receptores son estructuras proteicas que median en diferentes procesos: apoptosis, migración, proliferación y secreción celular. Su estudio permite conocer diversas respuestas fisiológicas específicas de las células.

Empleando PCs de CdTe conjugados a UEA1 (proteína de *Ulex europeaus*), se estudiaron por análisis de imagen células vivas tras la unión del PC al receptor de membrana

celular. Para el mismo fin ya se emplean IgG-PCs (27), al igual que PCs -aglutininas vegetales.

Dianas internas. Organelas y moléculas intra-citoplasmáticas.

Los PCs pueden marcar **células enteras individuales** y **moléculas específicas** dentro del citoplasma o del núcleo. En ambos casos pueden internalizarse por electroporación (para la permeabilización de membranas), microinyección o por transportadores peptídicos (el método más eficaz para introducir PCs).

En el primer sistema marcamos células enteras con PCs desnudos. Para el marcaje específico de moléculas se emplean PCs funcionalizados. En el caso de la microinyección se introduce en el citoplasma un número indiscriminado de PCs, inconveniente que no surge cuando se marcan receptores externos de membrana.

En el caso de los transportadores peptídicos, se introducen PCs conjugados para que se unan a su diana en la posición exacta, evitando ser atrapados en el transcurso de la ruta endocítica. Permite, además, visualizar este viaje microscópicamente. Chan y Nie (9) publicaron el primer trabajo donde se marcaban células vivas con PCs. En él, complejos PCs-transferrina eran endocitados por células Hella. Posteriormente, Vu y sus colaboradores (28) trabajando sobre células de mamífero, utilizaron PCs-dominio GH3 (primer dominio preapoptótico conocido) que, tras unirse a las mitocondrias, desencadenaron la apoptosis 18 horas después. Otra posibilidad para endocitar PCs en células vivas consiste en conjugarlos con albúmina. Pero resultaban en acúmulos endosoma-lisomales que pudieron evitarse empleando micelas fosfolipídicas. También los PCs permiten analizar la interacción entre **diversas poblaciones celulares**, marcando cada una con un color específico y diferente al resto.

Por último, para identificar **levaduras y bacterias** patógenas se indujo la endocitosis de PCs desnudos mediante lípidos catiónicos, excepto en las Gram positivas que se detectaron mejor con PCs-leptinas.

Persistencia de los Puntos Cuánticos en sistemas vivos.

En diferentes tipos de **cultivos celulares** los conjugados PCs-ACs marcaron

estructuras extra e intracitoplasmáticas durante varios días. Tras varias generaciones, las dianas intracelulares marcadas permanecían sin modificarse, lo que permitió visualizar la motilidad celular, sus cambios morfológicos y las relaciones intercelulares.

Incluso, se pudo estudiar la evolución celular en **embriones enteros**, como en *Xenopus*, en los que se inyectaron grandes cantidades de micelas fosfolipídicas (estables, hidrófilas y no tóxicas) conteniendo PCs. Tras ser observados los embriones por fluorescencia durante días, se rastrearon generaciones celulares consecutivas según se iban diferenciando en tejidos demostrándose la inocuidad del sistema.

Sobre células y tejidos fijados. Correlaciones óptico-electrónico. La Proteómica visual.

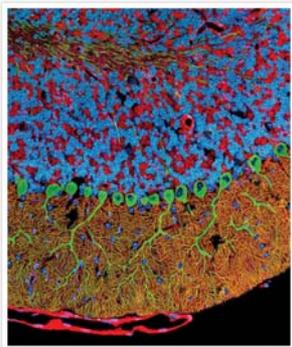


Figura 6: Corte de intestino de ratón. Imagen por inmunofluorescencia multicolor con PCs-ACs secundarios. En rojo se muestra la actina. En verde la laminina y los núcleos están teñidos en azul con Hoechst 33342.

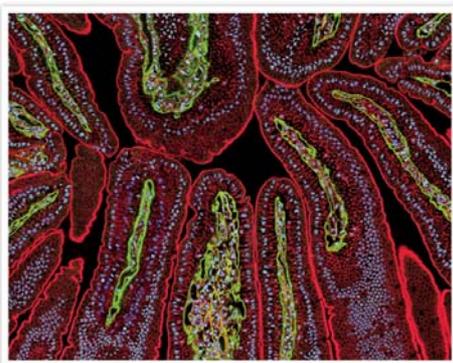


Figura 7. Corte de cerebelo de ratón visualizado con PCs conjugados a ACs secundarios. Los receptores IP3 se muestran en verde; la actina en rojo y los núcleos teñidos en azul DAPI.

Los sistemas de reconocimiento molecular o estructural en células vivas pueden aplicarse a cualquier tipo celular o tejido fijado (FIGURA 6,7). Es más, tras ligar un complejo PC-Ac específico a su proteína diana en el citoplasma o núcleo, podremos beneficiarnos de la

densidad electrónica natural del núcleo cristalino de los PCs (CdSe o CdTe) para identificar la posición de la proteína.

Giepmans B.N. et al. (29, 30) a través de un procedimiento similar, obtuvieron correlaciones morfológicas entre imágenes fluorescentes de microscopía óptica y electrónica sobre la misma muestra y en cualquier material biológico estudiado.

La microscopía electrónica emplea haces de electrones, por lo que la longitud de onda es muy inferior a la fotónica de la microscopía óptica, obteniéndose un incremento de 40-200 veces en el poder de resolución. De esta manera se logra una visión de conjunto de todas las estructuras y organelas celulares, sistemas membranosos y organizaciones macromoleculares tales como los polirribosomas.

Podemos beneficiarnos de la versatilidad de ambos sistemas **óptico-electrónico** para marcar múltiples dianas celulares simultáneamente. Es más, podemos afinar la resolución hasta un límite de un PC por molécula diana, lo que unido a la posibilidad de reconstrucciones 3D, acompañadas con estudios cuantitativos estereológicos, nos aporta una magnífica y poderosa herramienta. De hecho, los resultados obtenidos están revolucionando nuestros conocimientos sobre la organización estructural de la célula.

Veamos algunos ejemplos:

Zhang et al. (31) estudiaron el tráfico de las vesículas sinápticas liberadoras de neurotransmisores cerebrales. Hoy se conocen dos modalidades de comportamiento de estas vesículas una vez liberadas en la placa sináptica. En la “clásica”, la vesícula se colapsa dentro de la membrana celular, tras lo cual, la clastrina media la producción de una nueva vesícula. Es la *fusión de colapso total*. En la otra modalidad, conocida como “*besa y corre*”, un poro temporal en la membrana permite la fusión sin que se pierda la estructura de la propia vesícula, consiguiéndose un incremento del flujo en la neurotransmisión. En este estudio, desarrollaron un sistema de reconocimiento óptico específico para identificar el proceso de *fusión de colapso total*. Emplearon PCs con grupos carboxilos libres en su periferia para permitir que fuesen captados por las vesículas. Bajo microscopía electrónica, los PCs de 15 nm aparecían en el interior de cada vesícula y sólo eran liberados tras la rotura de la misma. Dado que este paso no ocurre durante el proceso de “*besa y corre*”, el sistema permitió discriminar claramente la cinética diferencial de ambos procesos. Además, se pudo afirmar

que la *fusión de colapso total* era sólo una parte de los procesos de fusión. Todo ello aportó un conocimiento cuantitativo nuevo de los acontecimientos moleculares en la sinapsis.

Dahan M. et al. (32) estudiaron la cinética de los receptores de Glicina en los espacios sinápticos de neuronas en cultivo. Los PCs permitieron seguir la dinámica del receptor a tiempo real y durante largos períodos, algo impensable hasta entonces dada la estrechez entre membranas sinápticas, lo que impidió el empleo de partículas de oro de 40 nm o bolas de látex aún mayores. Gracias al pequeño tamaño de los PCs pudo seguirse todo el proceso durante 15-20 minutos en comparación con los 5-9 segundos permitidos por los fluorocromos habituales y una resolución 4 veces superior. Con el empleo de microscopía electrónica, un Ac primario, fragmentos Fab de ACs biotinilados anti-ratón y PCs-Streptavidina se consiguió una **correlación muy precisa** en la localización exacta de los receptores anteriormente estudiados por fluorescencia. Así, se clasificaron, a través de los patrones de difusión del neurotransmisor observado, los receptores de Glicina sinápticos, perisinápticos y extrasinápticos.

El uso de la correlación óptico-electrónico junto con los nuevos avances metodológicos de marcado y seguimiento de cascadas de proteínas “in vivo” a tiempo real (33), está permitiendo una mejor comprensión del tráfico intracitoplasmático de las proteínas, su localización, reciclaje y función. Estos estudios son la base de la llamada **Proteómica Visual** (34).

A pesar de su amplia versatilidad, los PCs no agotan la batería de herramientas ofrecida por la Nanotecnología para la localización de proteínas mediante microscopía electrónica (35). En cortes ultrafinos se han visualizado nanopartículas de oro coloidal conjugadas con ACs (con tamaños entre 5-20nm) tras reaccionar con su Ag, obteniendo una gran sensibilidad en la detección de proteínas y ADN (22).

Ya existen partículas de oro de 1-3 nm de diámetro que son fácilmente introducibles en el interior celular aunque resultan difíciles de visualizar. Para resolverlo, tras su penetración, se incrementó su tamaño mediante precipitados de más moléculas de oro o plata (36). Además de por microscopía electrónica, estos marcajes pueden reconocerse mediante microscopía de fluorescencia si utilizamos sondas de “fluoronanoro” (nanopartículas de oro de 2 nm que fluorescen al unirlos con el fluorocromo Cy3, permitiéndonos identificar

proteínas).

Así, **¿Son los PCs más útiles como marcadores proteicos que las nanopartículas de oro?**: Ello dependerá del material y del tema a estudiar. En principio, autores como Giepmans consideran que los PCs son más ventajosos por su mejor interiorización celular y sus múltiples posibilidades en correlaciones óptico-electrónico (34, 30). Además, facilitan identificaciones moleculares a varias micras de profundidad de la superficie del corte, en contraste con las bolas de oro.

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilizar PCs de diferentes tamaños en una misma muestra, podremos lograr diferenciar con microscopía fluorescente diversas proteínas en función del color del PC. También podemos reconocer esas mismas proteínas al microscopio electrónico según el tamaño del PC, consiguiéndose correlaciones óptico-electrónico como nunca antes.

Finalmente, el uso conjunto de nanopartículas de oro y PCs posibilita marcar “in vivo” simultáneamente un número aún mayor de dianas, facilitando la correlación rigurosa entre la localización de cada proteína en estudio y su evolución secuencial en el tiempo y en el espacio.

Cáncer.

Esta nueva tecnología está siendo aplicada en cáncer a nivel molecular, celular e incluso “in Vivo”. Se está explorando el marcaje diferencial y simultáneo de células normales y cancerosas en un mismo organismo y así identificar la velocidad de reproducción, capacidad migratoria y metastásica de las células cancerosas. Incluso, detectar precozmente el crecimiento de un nódulo tumoral cuando aún está constituido por unas pocas células.

Estudios moleculares.

Un abordaje nuevo en oncología se basa en el empleo de PCs aprovechando el efecto de resonancia que se genera cuando dos o más PCs están situados a una distancia crítica entre sí (efecto FRET: Fluorescent Resonance Energy Transfer).

Dicho fenómeno físico, basado en la enorme capacidad de los PCs como donadores de un par de transferencia de energía de resonancia fluorescente, genera un intensísimo haz de luz cuya longitud de onda depende del tamaño de los PCs implicados.

El efecto FRET, que emplea Microscopia Confocal de doble fotón, está revolucionando las técnicas de marcaje de biomoléculas implicadas en cáncer.

Uno de los puntos más interesantes de la magnífica revisión de Brewer M. et al. (37) trata de la aplicabilidad del efecto FRET y de los diferentes abordajes prometedores que no precisarían la amplificación por PCR ni procesos de purificación en la identificación de oncogenes.

La nanotecnología está permitiendo el desarrollo de una nueva **proteómica del cáncer**. Soman C.P. y Giorgio T.D. (38) diseñaron un método para la detección de proteínas mediante PCs en una técnica de un solo paso. Basándose en fenómenos a nanoescala y utilizando PCs-ACs específicos, reconocieron la proteína diana a través de los grandes agregados que se generaban. Estas macroestructuras pudieron caracterizarse individualmente mediante **chip de microfluidos** iluminándolo con luz láser o fluorescencia. En comparación con las técnicas de detección proteómicas convencionales, este sistema ofrece mayor sensibilidad, rapidez y menor coste por determinación. Es más, estos nanométodos de detección permiten identificar simultáneamente diversas proteínas con cantidades ínfimas de muestra. Se logra así, detectar proteínas cancerosas a concentraciones de sub-picomolar, un límite de detección muy por debajo del ofrecido por el ELISA o Western blot para los mismos marcadores cancerosos.

In vitro.

Wu et al. (10) en un trabajo pionero, con PCs recubiertos con ampifilina ligada a una IgG o a Streptavidina, lograron marcar actina, microtúbulos citoplasmáticos y diversos AGs intranucleares en células 3T3 tumorales de ratón.

Sorprendentemente, lograron identificar con gran claridad el marcador Her2 (con PCs-IgG emitiendo a 535nm) y un Ag nuclear (con PCs-Streptavidina a 630nm) en células cancerosas SK-BR-3 del carcinoma mamario. Demostraron que las señales específicas

obtenidas eran mucho más luminosas y estables que las obtenidas hasta entonces con colorantes orgánicos.

Un claro ejemplo de la excepcional permanencia de la señal por PCs quedó demostrada en células MCF7 de adenocarcinoma mamario fijadas con formaldehído. Se realizaron cuatro pruebas. En todas ellas se marcó la glicoproteína de unión a membrana (p-gp) con un Ac policlonal de ratón. En la primera de estas pruebas se asoció el Ac a un PC. En las restantes el Ac se ligó respectivamente a los fluorocromos FITC, R-Ficoeritrina y AlexaFluor488. Tras efectuar diversas reconstrucciones 3D con microscopía confocal, se observó que el brillo de dichos fluorocromos fue 4200, 2600 y 4020 veces respectivamente menos fotoestables que el cojugado PC-Ac.

Parak et al. (39), cultivando células tumorales MDA-MB-231 durante 24 horas en presencia de PCs cubiertos de colágeno, observaron que éstas endocitaban los microcristales los cuales incluso alcanzaban la región perinuclear. En su estudio pudieron seguir con precisión los trayectos migratorios de esta estirpe demostrando así su posible potencial metastatizante.

Un Ac primario biotinilado consiguió marcar la p-gp en células Hella (carcinoma humano de cuello de útero) mediante su asociación a un PC-Streptavidina por enlaces cruzados, lográndose gran precisión en la localización de la proteína diana en la superficie celular.

Estrategias de este tipo permiten discriminar células leucémicas de las normales en frotis de pacientes, en citometría de flujo, etc. PCs funcionalizados con péptidos reconocieron integrinas en células de neuroblastoma humano, endotelio pulmonar y carcinoma de mama. En un enfoque más cinético, se analizaron con PCs los estadios iniciales de la transducción de señal del receptor tipo Tiroxin kinasa. A tal efecto, se conjugaron PCs al EGF mediante el sistema biotina-avidina (7) para unirlos al receptor ErbB1. Debido a que ErbB1, receptor del EGF, aparece masivamente en la superficie de células cancerosas, la presencia del EGF induce la división incontrolada. Los conjugados EGF-PCs se unieron a dicho receptor de forma exponencial y sin embargo, el complejo EGF-PCs-ErbB1 era internalizado linealmente. Estos resultados muestran un equilibrio entre internalización y reciclaje del receptor ErbB1 en dichas células.

In vivo.

Se puede rastrear el comportamiento de las células cancerosas en el organismo a través de dos estrategias; pasiva y activa (40, 41). En la pasiva, se aprovecha el pequeño tamaño de los PCs. Los capilares neoformados por el tumor consisten en una única lámina de células endoteliales, pericitos y células musculares lisas. Los PCs, al ser inyectados en el torrente sanguíneo de animales portadores de tumores, atraviesan pasivamente los poros de 200 micras de dichos capilares. De este modo penetran en la masa de tejido tumoral, pudiéndose localizar sus límites y su posición simplemente iluminando la zona. Así lo demostraron Gao et al. (42) en carcinoma prostático de ratón (FIGURA 8). Incluso, tras una biopsia, se podría analizarlo directamente bajo microscopía de fluorescencia.

Pero la mayoría de los experimentos “in vivo” siguen la ruta “activa”, en la que PCs conjugados a ACs contra receptores de células normales o contra AGs tumorales son inyectados vía intravenosa para buscar y marcar neoplasias.

Akermann M.E. et al. (40) lograron marcajes de endotelio vascular sanguíneo y linfático con péptidos asociados a PCs. Así mismo, ya se han marcado “in vivo” dianas tumorales como: ErbBs y CA-125.

Introduciendo en el torrente vascular diversos PCs de cinco tamaños ligados a ACs específicos, se detectaron simultáneamente: endotelio, fibroblastos del estroma, las células inflamatorias y las tumorales. Se pudo seguir su interrelación y evolución durante el proceso de crecimiento iluminando con fluorescencia el animal entero. Su aplicación no sólo se limitó a tumores sólidos, sino que se hizo extensible a leucemias.

Los sistemas de “código de barras” y cantilevers son también válidos para la detección precoz o chequeo de componentes celulares en sangre.

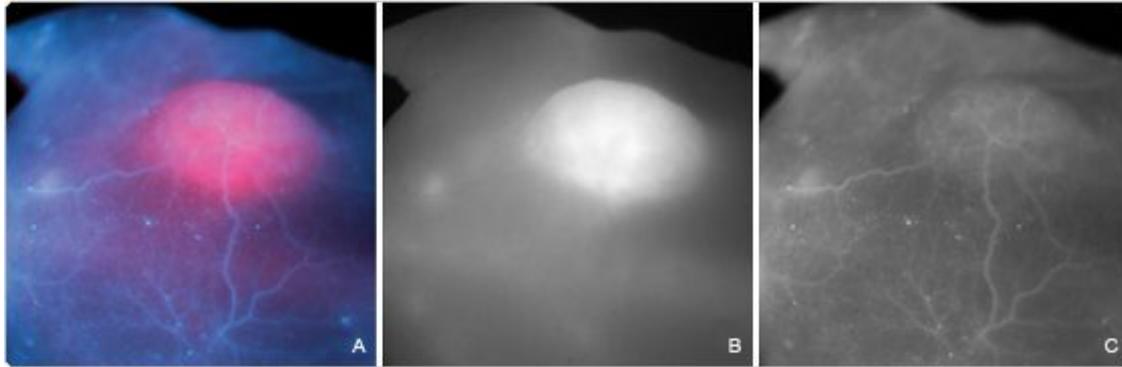


Figura 8. Imágenes complementarias del nódulo tumoral y su irrigación en un modelo murino. El contraste vascular se obtuvo con PCs no funcionalizados, marcándose simultáneamente el tejido canceroso con Alexa Fluor 680 unidos a ACs anti-CEA (antígeno carcino-embriionario). La red vascular pudo observarse durante varias horas.

Estos procedimientos se popularizaron por sus usos en el diagnóstico canceroso ultra-precoz en animales. Nie et al. (43) reportaron el desarrollo de sensores de biorreconocimiento (PC-Ac) que identifican la presencia de una célula cancerosa en cualquier medio corporal líquido mediante una señal óptica.

Cristofanilli M. et al. (44) estudiando cánceres de mama, lograron reconocer células tumorales circulantes mediante instrumentos a nanoescala, así como su incidencia en la progresión del tumor y su relación con la producción de metástasis. Comprobaron que, si la cantidad de estas células es muy baja (1-5 unidades /ml o inferior), pueden concentrarse con un imán tras ser ligadas a nanopartículas magnéticas y PCs.

También la neurocirugía se beneficia de los PCs para marcar receptores de neuronas en pacientes que están siendo operados de tumores cerebrales. Iluminando el campo con la luz de excitación adecuada, el cirujano puede reconocer el tejido cerebral normal y precisar los límites del nódulo para ser extirpado con mayor precisión, empresa a veces imposible en las condiciones de visión habituales.

Mapeando el ganglio linfoide centinela.

Larson D.R. et al. (5) lograron realizar angiografías “in vivo” a través del tejido adiposo, avance hasta entonces inimaginable. Para ello diseñaron PCs de CdSe-ZnS con cápsula ampifilínica que emitían luz cercana al infrarrojo (550nm) y los inyectaron en ratones.

Tanto la grasa corporal como la sangre total absorbían poca de la luz que emitían estos PCs. Además, se evitó la autofluorescencia tisular, disminuyendo así la fluorescencia basal. Cuando fueron excitados por un sistema de dos fotones se volvían excepcionalmente brillantes, logrando imágenes de excelente calidad. Pudieron visualizar la vascularización y detectar los latidos cardíacos a través de las distintas capas de la piel, tejido adiposo y muscular con resultados netamente superiores a los obtenidos con FITC-dextrano.

El equipo de Larson demostró que la combinación de estos PCs con sistemas de visión multifotónicos producía un daño tisular casi nulo debido a los bajos requerimientos de energía para su estimulación y su iluminación. Aportaron, además, un novedoso enfoque al capturar imágenes “in vivo” en cortes ópticos de poca profundidad de campo, empleando microscopía confocal o resonancia magnética nuclear, lo que permitió reconstrucciones 3D de gran calidad.

Complementariamente, Kobayashi H. et al. (45) utilizaron PCs de distinto tamaño para mapear dos redes linfáticas diferentes en el mismo acto. Descubrieron que los PCs mayores (12nm) eran óptimos para el flujo de los miembros inferiores mientras que los menores (7nm) definían mejor la red linfática de la mama.

En una publicación sensacional, Frangioni y Bawendi, del MIT y del Massachusetts General Hospital de Boston, utilizando PCs de segunda generación, identificaron por primera vez el ganglio de drenaje linfático que representa la etapa inicial de la invasión metastásica del cáncer (46). El primer paso consistió en sintetizar PCs tipo II que producen una emisión de luz cercana al infrarrojo, lográndose una mejor penetración de la emisión lumínica a través del tejido.

El número romano del tipo de PC se relaciona con su posición en la tabla periódica de los elementos. Recientemente, se han sintetizado nuevos PCs, en concreto los llamados tipo III y tipo V que presentan ventajas respecto a los de tipo II y VI, pues son muy útiles como biomarcadores e inocuos para el ser humano.

En una segunda etapa, unieron PCs (con picos de emisión entre 840 y 860nm) a ACs específicos contra las células cancerosas. Su inyección intradérmica en ratones y su posterior iluminación, demostró su migración rápida por el sistema linfático y su penetración en la axila

infiltrada. En un experimento paralelo, inyectaron intradérmicamente 5 cerdos con 400 picomoles de los mismos PCs, localizando el ganglio centinela en sólo 3-4 minutos.

La aplicación clínica en humanos de este proceder aportaría diversas ventajas: minimizaría errores al permitir al cirujano seguir la progresión “in vivo” de los nanocristales; la identificación a tiempo real del nódulo linfoide afectado posibilitando su extracción selectiva; el patólogo podría reconocer la anatomía circundante y el análisis específico del ganglio infartado diana evitando reintervenir a la paciente.

Teniendo en cuenta que reconocer precozmente las células cancerosas en el ganglio resulta crucial en las decisiones a tomar por los cirujanos, su positividad implica automáticamente el “vaciamiento axilar” consistente en la extracción de los 20-30 ganglios del sistema de drenaje linfático mamario. Dicha medida produce, a veces, un entorpecimiento importante del drenaje linfático del brazo. El proceder de Kim S. et al. (46) evita la biopsia diagnóstica ganglionar durante la intervención, así como la inyección de colorantes orgánicos o compuestos radioactivos.

Por todo ello, esta técnica se perfila claramente como un futuro “predictor” en humanos para la identificación en el quirófano de los ganglios infiltrados y las diseminaciones regionales de nódulos secundarios diminutos casi siempre desapercibidos lográndose mejores decisiones terapéuticas y un perfil pronóstico más predecible.

Más todavía: ¿Diagnóstico y terapia secuencial por Puntos Cuánticos en el mismo acto médico? ¿Biopsia óptica?

Un paisaje futurista aplicable a corto plazo, lo conforma el diseño de “nanopartículas inteligentes” multifuncionales, cuyo empleo permitiría identificar por imagen células cancerosas y su subsiguiente destrucción siguiendo diversas estrategias terapéuticas.

Una de ellas consistiría primero en inyectar PCs-ACs específicos y tras su adhesión a las células cancerosas diana, se iluminarían para localizar los nódulos tumorales. A continuación, introduciríamos un fibroscopio hasta el nódulo. Dependiendo del Ac seleccionado, reconoceremos el tipo tumoral específico, diagnosticando el tumor mediante la denominada “**biopsia óptica**” sin necesidad de extraer el tejido. El sistema permitiría además,

aplicar radioterapia selectiva mediante luz a través del fibroscopio a tiempo real y en el mismo acto médico.

Con la ayuda de surfactantes ya se han construido PCs bifuncionales unidos a Fe₂O₃, FePt y al medicamento antitumoral. Si se inyectan al paciente, pueden ser guiados a la zona tumoral mediante imanes. Una vez allí, se calentarían con un campo magnético de baja intensidad. Logramos de este modo la muerte de las células cancerosas disminuyendo el efecto nocivo de los tratamientos habituales sobre las zonas sanas.

Otro avance espectacular se basa en la liberación de medicamentos a dosis controladas. Para ello se necesitan PCs cubiertos con un polímero preactivado ampifilínico, unidos por un lado a un Ac específico para receptores de la célula tumoral y por otro, a un medicamento antitumoral. La nanopartícula se unirá al receptor celular y tras aplicarle luz láser, el medicamento será liberado controladamente.

Kam N.W. et al. (47) emplearon nanotubos de carbono como transportadores biológicos multifuncionales en la destrucción selectiva de células cancerosas.

Resumiendo, estas y otras aplicaciones de los PCs posibilitarán de una sola vez: una mejora en la imagen diagnóstica, localización específica del tumor y un tratamiento “a la carta” para cada tipo tumoral.

Nanomedicina regenerativa, terapia génica y otras posibilidades.

La nanomedicina regenerativa e ingeniería tisular son nuevas estrategias que reemplazan mediante biotecnología (terapia génica, empleo de células madre, reconstrucción tisular y liberación “in Situ” de sustancias regenerativas como citoquinas y factores de crecimiento) órganos y tejidos.

Precisamos contar con materiales biocompatibles que posibiliten la proliferación y diferenciación de células y tejidos. Unos ejemplos: Para obtener matriz extracelular se cultivan fibroblastos sobre un sustrato de nanotubos de carbono para la regeneración de tejidos “in Vitro” e “in vivo”. Así mismo, cultivando células dérmicas con factores diferenciadores, se obtienen explantos de piel de grandes dimensiones utilizables en grandes

quemados, cirugía plástica y reconstructora. La medicina regenerativa promete fabricar válvulas cardíacas o regenerar matriz ósea moldeando polímeros.

En cuanto a la posibilidad real de aplicar terapias génicas, los nanotubos de carbono funcionalizados podrían transportar ADN como nanovectores o nanotransportadores. Una vez endocitados por la célula diana, liberarían el material genético permitiendo reemplazar genes o ser empleados para capacitar células.

Otras curiosas aplicaciones ya propuestas con nanoestructuras artificiales son:

-“Respirocitos”: Inyectados en el torrente sanguíneo sustituirían a la hemoglobina, posibilitando permanecer hasta cuatro horas en apnea o con el corazón en reposo.

-“Nanorrobots” (sondas moleculares multimodales circulantes en sangre periférica): Consisten en un constructo de nanopartículas paramagnéticas unidas a un PC y al medicamento. En la arterioesclerosis, unidos al *Fumagillin*, podrían reconocer la llegada del fármaco a la placa de ateroma del endotelio mediante resonancia magnética nuclear y disolverla. Al concentrarse específicamente el medicamento en la zona dañada, se reduce hasta 50000 veces la dosis del fármaco necesario.

La aplicación de los PCs y la Nanotecnología en general, no se agota con los ejemplos antedichos (48):

-Optoelectrónica: PCs de arseniuro de indio y fosfuro de indio, son empleados como diodos láser que emiten luz de un modo más eficiente, mejorando los actuales lectores de CD, códigos de barras, pantallas de TV de alta resolución y ofreciendo nuevas posibilidades en la iluminación doméstica.

-Criptografía cuántica o computación cuántica: se esperan futuros ordenadores cuánticos más rápidos en sus capacidades de cálculos y de menor consumo. Incluso, computadores moleculares basados en la capacidad del ADN para almacenar y procesar información.

-Semiconductores: Se incrementaría la eficacia de las células solares con PCs respecto a las actuales de silicio, que sólo transforman en electricidad el 15% de la luz incidente.

En definitiva, la química moderna ofrece nuevas herramientas nanotecnológicas tales como micropalancas, nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y PCs aportando una gran esperanza en diferentes campos como en la futura biomedicina, terapias moleculares, etc. En particular, los PCs serán, sin duda, un instrumento fundamental gracias a sus extraordinarias propiedades fotofísicas y a su gran potencial como sondas de molécula única.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Invitrogen Corporation el permiso de publicación de las imágenes presentes en este artículo.

Abreviaturas:

Ac: anticuerpo; **Ag:** antígeno; **EDC:** *N*-ethyl-*N'*-3-diethylaminopropyl carbodiimida; **EGF:** factor de crecimiento epitelial; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorter; **FISH:** hibridación “in Situ” fluorescente; **FRET:** Fluorescente Resonante Energy Transfer; **IgG:** inmunoglobulina G; **PC:** punto cuántico; **PDMAEMA:** polidimetilaminoetil metacrilato; **PEI:** polietilenamina; **TOP:** trioctilfosfina; **TOPO:** óxido de trioctilfosfina; **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; **PSA:** antígeno prostático específico; **SNP:** polimorfismo de nucleótido simple.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Parak, W.J.; Gerion, D.; Pellegrino, T.; Zanchet, D.; Micheel, C.; Williams, S. C.; Boudreau, R.; LeGros, M.A.; Larabell, C.A. and Alivisatos, A.P. (2003): Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. 14: 15-27.
- (2) Michalet, X.; Pinaud, F.F.; Bentolila, L.A.; Tsay, J.M.; Doose, S.; Li, J.J.; Sundaresan, G.; Wu, A.M.; Gambhir, S.S. and Weiss, S. (2005): Quantum Dots for life cells, in vivo imaging and diagnostics. *Science*. 307: 538-544.
- (3) Burg, T.P.; Godin, M.; Knudsen, S.M.; Shen, W.; Carlson, G.; Foster, J.S.; Babcock, K. and Manalis, S.R. (2007): Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*. 446: 1066-1069.
- (4) Weiss, S. (1999): Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*. 283: 1676-1683.
- (5) Larson, D.R.; Zipfel, W.R.; Williams, R.M.; Clark, S.W.; Bruchez, M.P.; Wise, F.W. and Webb, W.W. (2003): Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science*. 300: 1434-1436.
- (6) Murray, C.B.; Norris, D.J. and Bawendi, M.G. (1993): Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem.*

Soc. 115: 8706-8715.

- (7) Weng, J. and Ren, J. (2006): Luminescent quantum dots: A very attractive and promising tool in biomedicine. *Current Med. Chem.* 13: 897-909.
- (8) Webb, W.W. (2003): Water soluble QDs for multiphoton fluorescence imaging in Vivo. *Science.* 300: 1434-1436.
- (9) Chan, W. C. and Nie, S. (1998): Quantum Dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science.* 281: 2016-2018.
- (10) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K.N.; Treadway, J.A.; Larson, J.P.; Ge, N.; Peale, F. and Bruchez, M.P. (2003): Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quanta Dots. *Nature Biotechnology.* 21: 41-46.
- (11) Härmä, H.; Soukka, T. and Lövgren, T. (2001): Europium nanoparticles and time-resolved fluorescence for ultrasensitive detection of prostate-specific antigen. *Clin. Chem.* 47: 561-568.
- (12) Nam, J.M.; Thaxton, C.S. and Mirkin, C.A. (2003): Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins. *Science.* 301: 1884–1886.
- (13) Georganopoulou, D.G.; Chang, L.; Nam, J.M.; Thaxton, C.S.; Mufson, E.J.; Klein, W.L. and Mirkin, C.A. (2005): Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 2273-2276.
- (14) Jain, K.K. (2003): Nanodiagnostics: Application of nanotechnology in molecular diagnostic. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3: 153-161.
- (15) Urbanski, J.P.; Levitan, J.A.; Burch, D.N.; Thorsen, T. and Bazant, M.Z. (2007): The effect of step height on the performance of three-dimensional AC electro-osmotic pumps. *J. Colloid. Inter. Sci.* 309: 332-341.
- (16) Nagrat, S., Sequist, L.V.; Maheswaran, S.; Bell, D.W.; Irimia, D.; Ulkus, L.; Smith, M.R.; Kwak, E.L.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; Ryan, P.; Balis, U.J.; Tompkins, R.G.; Haber, D.A. and Toner, M. (2007): Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 450: 1235-1239.
- (17) Ziober, B.L.; Mauk, M.G.; Falls, E.M.; Chen, Z.; Ziober, A.F. and Bau, H.H. (2007): Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head and Neck.* 30: 111-121.
- (18) Lucas, L.J.; Chesler, J.N. and Yoon, J.Y. (2007): Lab-on-a-chip immunoassay for multiple antibodies using microsphere light scattering and quantum dot emission. *Biosens Bioelectro.* 23: 675-681.

- (19) Crut, A.; Geron-Landre, B.; Bonnet, I.; Bonneau, S.; Desbiolles P. and Escude C. (2005): Detection of single DNA molecules by multicolor quantum-Dot end-labeling. *Nucleic acids Res.* 33: 98-103.
- (20) Gao, X. and Nie, S. (2005): Quantum Dot-encoded beads Methods. *Mol. Biol.* 303: 61-71.
- (21) Salata, O. (2004): Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology.* 2: 3-10.
- (22) Fortina, P.; Kricka, L.J.; Surrey, S. and Grodzinski, P. (2005): Nanobiotechnology: The promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trend. Biotechnol.* 23: 168-173.
- (23) Xu, H.; Sha, M.Y.; Wong, E.Y.; Uphoff, J.; Xu, Y.; Treadway, J.A.; Truong, A.; O'Brien, E.; Asquith, S.; Stubbins, M.; Spurr, N.K.; Lai, E.H. and Mahoney, W. (2003): Multiplex SNP genotyping using the Qbead™ system: a Quantum Dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic acids Res.* 31(8): E43.
- (24) Jain, K.K. (2005): Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta.* 358: 37-54.
- (25) Oberringer, M.; Englisch, A.; Heinz, B.; Gao, H.; Martin, T. and Hartmann, U. (2003): Atomic force microscopy and scanning near-field optical microscopy studies on the characterization of human metaphase chromosomes. *Eur. Biophys. J.* 32: 620-627.
- (26) Lidke, D.S.; Nagy, P.; Heintzmann, R.; Arndt-Jovin, D.J.; Post, J.N.; Grecco, H.E.; Jares-Erijman, E.A. and Jovin, T.M. (2004): Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nature Biotechnology.* 22: 198 – 203.
- (27) Goldman, E.R.; Balighian, E.D.; Mattoussi, H.; Kuno, M.K.; Mauro, J.M.; Tran, P.T. and Anderson G.P. (2002): Abidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 6378-6382.
- (28) Vu, T.Q.; Maddipati, R.; Blute, T.A.; Nehilla, B.J.; Nusblat, L. and Desai, T.A. (2005): Peptide-conjugated quantum dots activate neuronal receptors and initiate downstream signaling of neurite growth. *Nano. Lett.* 5: 603-605.
- (29) Giepmans, B.N.; Deerinck, T.J.; Smarr, B.; Jones, Y.Z. and Ellisman, M.H. (2005): Correlated Light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nat. Methods.* 2: 743-749.
- (30) Giepmans, B.N.; Adams, S.R.; Ellisman, M.H. and Tsien, R.Y. (2006): The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science.* 312: 217-224.

- (31) Zhang, Q.; Cao, Y. and Tsien, R.W. (2007): Quantum dots provide an optical signal specific to full collapse fusion of synaptic vesicles. *PNAS*. 104: 17843-17848.
- (32) Dahan, M.; Levi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B. and Triller, A. (2003): "dynamics of glycine receptors revealed by single-QD tracking. *Science*. 302: 442-445.
- (33) Nickell, S.; Kofler, C.; Leis, A.P. and Baumeister, W. (2006): A visual approach to proteomics. *Nat. Rev.Mol.Cell Biol.* 7: 225-230.
- (34) Sosinsky, G.E.; Giepmans, N.G.; Deerinck, T.J.; Galleta, G.M. and Ellisman, M.H. (2007): Markers for correlated Light and Electron Microscopy, in *Methods in cell biology*. Vol.79, pp.901-910. Elsevier Inc.ed.
- (35) Burry, R.W. (2000): Specificity controls for Immunocytochemical methods. *J.Histochem. Cytochem.* 48: 163-166.
- (36) Baschong, W. and Stierhof, Y.D. (1998): Preparation, use, and enlargement of ultrasmall gold particles in immunoelectron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 42: 66-79.
- (37) Brewer, M.; Zhang, T.; Dong, W.; Rutherford, M. and Tian, Z. (2007): Future Approaches of Nanomedicine in Clinical Science. *Medical Clinics of North America*. 91: 963-1016.
- (38) Soman, C.P. and Giorgio, T.D. (2008): Quantum dot self-assembly for protein detection with sub-picomolar sensitivity. *Langmuir*. 24: 4399-4404.
- (39) Parak, W.J.; Boudreau, R.; LeGros, M.; Gerion, D.; Zanchet, D.; Michael, C.M.; Williams, S.C.; Alivisatos, A.P. and Larabell, C.A. (2001): Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv.Mater.* 14: 882-884.
- (40) Akerman, M.E.; Chan, W.C.; Laakkonen, P.; Bhatia, S.N. and Ruoslahti, E. (2002): Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 12617-12621.
- (41) Cuenca, A.G.; Jiang, H.; Hochwalg, S.N.; Delano, M.; Gance, W.G. and Grobmyer, S.R. (2006): Emerging applications of Nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*. 107: 459-466.
- (42) Gao,X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Cheng, L.W. and Nie, S. (2004) : In Vivo cancer targeting and imaging with semiconductor QDs. *Nat. Biotechnol.* 22: 969-976.
- (43) Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G.J. and Simona, J.W. (2007): Nanotechnology applications in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9: 12.1-12.32.
- (44) Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M.C.; James, B.S; Reuben, M.; Doyle, G.V.; Allard, W.J.; Leon, W.; Terstappen, M. and Hayes, D.F. (2004): Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic

- breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 351: 781-791.
- (45) Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Sakai, Y.; Choyke, P.L.; Star, R.A.; Brechbiel, M.W.; Sato, N.; Tagaya, Y.; Morris, J.C. and Waldmann, T.A. (2004): Lymphatic Drainage Imaging of Breast Cancer in Mice by Micro-Magnetic Resonance Lymphangiography Using a Nano-Size Paramagnetic Contrast Agent. *JNCI.* 96: 703-708.
- (46) Kim,S.; Lim, Y.T.; Soltesz, E.G.; De Grand, A.M.; Lee, J.; Nakayama, A.; Parker, J.A.; Mihaljevic, T.; Laurence, R.G.; Dor, D.M., Cohn, L.H.; Bawendi, M.G. and Frangioni J.V. (2003): Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnology.* 22: 93–97.
- (47) Kam, N.W.; O'connell, M.; Wisdom, J.A. and Dai, H. (2005): Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agent for selective cancer cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 11600-11605.
- (48) Xu, X.; Sun, B.; Berman, P.R; Steel, D.G.; Bracker, A.S.; Gammon, D. and Sham, L.J. (2007): Coherent optical spectroscopy of a strongly driven quantum dot. *Science.* 317: 929-932.