

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



**Revisión de métodos de detección del antígeno  
carcinoembrionario utilizando nanosensores**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE  
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA**

**AUTOR:**

Johan Farfan Benito

**ASESORA:**

Dra. Yulán Hernández

Lima, setiembre del 2020

## Resumen

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un biomarcador tumoral cuya detección cumple un rol importante en el diagnóstico y monitoreo del tratamiento de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, aún existe un amplio campo de desarrollo para mejorar la sensibilidad y especificidad de los ensayos actualmente utilizados en clínica para su detección. En ese sentido, la incorporación de los nanomateriales en el diseño de biosensores se presenta como una alternativa reciente para la obtención de mejores resultados en la detección de este biomarcador que pueden llevar al diagnóstico precoz de algunos tipos de cáncer.

En este trabajo de investigación, se estudian los diferentes aspectos a tener en cuenta en el desarrollo de biosensores basados en nanomateriales para la detección de CEA. En primer lugar, se describen en detalle tres de los nanomateriales más utilizados, puntos cuánticos, nanopartículas magnéticas y nanopartículas de metales nobles, así como sus propiedades únicas y cómo éstas se pueden aprovechar en el diseño de biosensores. En segundo lugar, se presentan los dos tipos de bioreceptores más empleados, anticuerpos y aptámeros, los cuales permiten la captura selectiva del analito para su posterior detección, y las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. En tercer lugar, se presentan las estrategias de conjugación para funcionalizar el nanomaterial con el bioreceptor y las situaciones en las que se emplea cada una de ellas.

Finalmente, se describe cómo todos estos aspectos se han integrado en el diseño de varios tipos de biosensores del biomarcador CEA empleando técnicas analíticas diversas como la espectrometría de masas, la detección eléctrica y la detección óptica. Se discuten las ventajas y desventajas de estos métodos, y las tendencias futuras en este campo con el objetivo final de aplicar estos sensores en clínicas y hospitales para mejorar la calidad de vida del paciente.

## Tabla de contenidos

Tabla de contenidos.....	ii
Lista de tablas.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
1 Introducción.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Biomarcadores.....	1
1.2.1 Biomarcadores tumorales.....	1
1.3 Antígeno carcinoembrionario (CEA).....	3
1.4 Biosensores.....	4
2 Nanomateriales utilizados en el desarrollo de nanosensores.....	6
2.1 Nanopartículas magnéticas.....	7
2.2 Puntos cuánticos.....	9
2.3 Nanopartículas de metales nobles.....	12
3 Moléculas dirigidas para la identificación de biomarcadores tumorales.....	17
3.1 Anticuerpos.....	17
3.2 Aptámeros.....	20
4 Estrategias de conjugación para funcionalización de nanopartículas.....	25
4.1 Entrecruzamiento químico.....	25
4.2 Interacciones físicas.....	30
5 Estrategias de detección de CEA basados en nanopartículas.....	33
5.1 Espectrometría de masas.....	34
5.2 Detección eléctrica y electroquímica.....	37
5.3 Detección óptica.....	42
5.3.1 Fluorescencia y quimioluminiscencia.....	42
5.3.2 Detección colorimétrica.....	46
5.3.3 Resonancia del plasmón superficial (SPR).....	50
5.3.4 Espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS).....	52
6 Conclusiones.....	56
7 Referencias bibliográficas.....	57

## Lista de figuras

Figura 1. Representación de CEA. Tomada de Boehm y colaboradores. <sup>12</sup> .....	4
Figura 2. Esquema de un biosensor. Adaptada de Šmuc y colaboradores. <sup>14</sup> .....	4
Figura 3. Aproximaciones <i>top-down</i> o <i>bottom-up</i> para la síntesis de nanopartículas. Adaptada de Pareek y colaboradores. <sup>16</sup> .....	6
Figura 4. Estructura de la MNP. Tomada de Shevtsov y colaboradores. <sup>17</sup> .....	7
Figura 5. Dependencia de la coercitividad con el tamaño de la MNP. Adaptada de Durán y colaboradores. <sup>22</sup> .....	8
Figura 6. Comparación de MNP ferromagnéticas y superparamagnéticas. Adaptada de Vatta y colaboradores. <sup>23</sup> .....	9
Figura 7. Estructura del QD. Adaptada de Fontes y colaboradores. <sup>28</sup> .....	10
Figura 8. Relación del tamaño del QD con el espectro de emisión a una sola longitud de onda de excitación. Adaptada de Altintas y colaboradores. <sup>34</sup> .....	12
Figura 9. Diferentes formas y tamaños de las NP. Adaptada de Bolaños y colaboradores. <sup>35</sup> .....	12
Figura 10. Síntesis de AuNP cuasi-esféricas por el método de reducción con citrato. ..	13
Figura 11. Ilustración esquemática de la resonancia de plasmón de superficie localizado. Adaptada de Peiris y colaboradores. <sup>42</sup> .....	14
Figura 12. Principio de SERS. Adaptada de Ding y colaboradores. <sup>47</sup> .....	15
Figura 13. Estructura básica del Ab y representación de la interacción antígeno – anticuerpo. ....	17
Figura 14. Estructura de un anticuerpo (Ab) de 150 kDa unida a su antígeno (amarillo). Las líneas rojas son los puentes disulfuro. VL: Región variable de la cadena ligera, VH: Región variable de la cadena pesada, CL: Región constante de la cadena ligera, CH <sub>1,2,3</sub> : Región constante de la cadena pesada. Tomada de Conroy y colaboradores. <sup>51</sup> .....	18
Figura 15. Especificidad de los anticuerpos policlonales y monoclonales. <sup>53</sup> .....	19
Figura 16. Estructura de un complejo aptámero-objetivo. <sup>60</sup> .....	21
Figura 17. Motivos estructurales de una secuencia de ADN. Adaptada de Yurushkin y colaboradores. <sup>64</sup> .....	22
Figura 18. Proceso SELEX. Adaptada de Šmuc y colaboradores. <sup>14</sup> .....	23
Figura 19. Estrategias de conjugación más comunes en síntesis de nanosensores. (a) Hidrazida-aldehído, (b) maleimida-tiol, (c) ácido carboxílico-amina primaria con carbodiimida (EDC) y (d) superficie de oro y moléculas tioladas. Adaptada de Werengowska-Cieciewicz y colaboradores. <sup>67</sup> .....	26
Figura 20. Funcionalización de las AuNP con derivados tiolados. Las estructuras químicas no están dibujadas a escala. (1) 11-Mercapto-1-undecanol, (2) ácido 11-mercaptoundecanoico, (3) proteína enlazada al ácido 11-mercaptoundecanoico por medio de un enlace amida, (4) ADN enlazado al ácido 11-mercaptoundecanoico por medio de un enlace amida, (5) ADN directamente enlazado a la superficie de oro a través de un espaciador de citosinas o de (6) timinas, (7) ADN enlazado a la superficie de oro a través de una cadena complementaria parcial modificada con tiol, (8) proteína enlazada a la superficie de oro a través de un enlace amida con 4-aminotiofenol, (9)	

ditiol, (10) PEG tiolado, (11) ácido mercaptopropiónico. Adaptada de Yüce y colaboradores. <sup>70</sup> .....	27
Figura 21. Mecanismo de reacción del EDC con un ácido carboxílico para la formación de la amida. Adaptada de Hermanson y colaboradores. <sup>72</sup> .....	28
Figura 22. Esquema de reacción del acoplamiento de grupos –COOH y –NH <sub>2</sub> con EDC y sulfo-NHS. Tomada de Hernández y colaboradores. <sup>74</sup> .....	29
Figura 23. (a) Estructura de la biotina. (b) Esquema de la interacción biotina estreptavidina. La estreptavidina puede enlazarse a cuatro moléculas de biotina las cuales pueden estar conjugadas con otras. <sup>77</sup> .....	31
Figura 24. Representación esquemática del ensayo tipo sándwich. ....	33
Figura 25. Diagrama esquemático del inmunoensayo sándwich y amplificación con plata para la detección de CEA con AuNP funcionalizadas con Ab. Adaptada de Liu y colaboradores. <sup>82</sup> .....	35
Figura 26. (a) Síntesis del ZnSe funcionalizado con el anticuerpo secundario de CEA; (b) Inmunoensayo magnético del tipo sándwich utilizando nanopartículas magnéticas y QD de ZnSe. Adaptada de Cao y colaboradores. <sup>83</sup> .....	36
Figura 27. Esquema del inmunoensayo desarrollado por Zhang y colaboradores. Adaptada de Zhang y colaboradores. <sup>84</sup> .....	37
Figura 28. Esquema de la preparación del inmunosensor y principio de la detección electroquímica. Adaptada de Peng y colaboradores. <sup>88</sup> .....	39
Figura 29. Diagrama sobre la detección electroquímica del nanoaptasensor basado en la amplificación de señal por medio de AuNP para la detección de CEA. Adaptada de Shu y colaboradores. <sup>89</sup> .....	40
Figura 30. (A) Fabricación del conjugado HO-GNR-HRP. (B) Esquema del ensamblaje del electrodo y estrategia de detección de CEA. Adaptada de Wen y colaboradores. <sup>63</sup> .....	41
Figura 31. Representación esquemática de la estrategia de detección fluorimétrica basada en FRET. Adaptada de Qian y colaboradores. <sup>48</sup> .....	43
Figura 32. Representación esquemática de la determinación simultánea de CEA y CYFRA21-1 basado en el uso de QB y MB. Adaptada de Ding y colaboradores. <sup>92</sup> .....	44
Figura 33. Representación del inmunoensayo basado en quimioluminiscencia para la detección de CEA. Adaptada de Hao y colaboradores. <sup>94</sup> .....	45
Figura 34. Fabricación del inmunosensor del tipo sándwich y proceso de detección electroquimioluminiscente de CEA. Adaptada de Zheng y colaboradores. <sup>96</sup> .....	46
Figura 35. Esquema de detección de CEA. (a) Preparación de AuNP funcionalizadas con el anticuerpo de CEA y HRP, y de MMP funcionalizadas con anticuerpo de CEA. (b) Inmunoensayo colorimétrico basado en la formación del complejo sándwich de CEA. Adaptada de Liu y colaboradores. <sup>97</sup> .....	47
Figura 36. Principio del biosensor colorimétrico basado en HRCA. Adaptada por Liang y colaboradores. <sup>98</sup> .....	48
Figura 37. Esquema de la detección colorimétrica de CEA utilizando aptámeros de CEA y AuNP sin funcionalizar. Adaptada de Luo y colaboradores. <sup>99</sup> .....	49
Figura 38. Metodología de detección de CEA por SPR mediante amplificación con nanopartículas de oro. Adaptada de Li y colaboradores. <sup>78</sup> .....	51

Figura 39. Diagrama esquemático de un canal del sensor de tres biomarcadores mediante SPR. Adaptada de Wang y colaboradores.<sup>102</sup> ..... 52

Figura 40. Metodología de detección de CEA por SERS utilizando MIP. Adaptada de Carneiro y colaboradores.<sup>104</sup> ..... 54

Figura 41. Representación esquemática de la detección de múltiples biomarcadores. Adaptada de Bai y colaboradores.<sup>105</sup> ..... 55



## Lista de tablas

Tabla 1. Biomarcadores proteicos aprobados por la FDA <sup>7</sup> .....	3
Tabla 2. Características de los anticuerpos monoclonales y policlonales. <sup>51</sup> .....	19



## Lista de abreviaturas

Ab	Anticuerpo
Apt	Aptámero
AuNP	Nanopartículas de oro
CEA	Antígeno carcinoembrionario ( <i>Carcinoembryonic Antigen</i> )
CV	Voltametría cíclica ( <i>Cyclic voltammetry</i> )
DPV	Voltametría de pulso diferencial ( <i>Differential Pulse Voltammetry</i> )
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> '-etilcarbodiimida
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU. ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster ( <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> )
HRP	Peroxidasa de rábano ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente ( <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
LOD	Límite de detección ( <i>Limit of Detection</i> )
LSPR	Resonancia del plasmón superficial localizado ( <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i> )
MNP	Nanopartículas magnéticas ( <i>Magnetic Nanoparticles</i> )
MS	Espectrometría de masas
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccimida
NP	Nanopartículas de metales nobles
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial ( <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> )
SERS	Espectroscopía Raman mejorada en superficie ( <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> )
SPR	Resonancia del plasmón superficial ( <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
QD	Puntos cuánticos ( <i>Quantum Dots</i> )



# **1 Introducción**

## **1.1 Cáncer**

El cáncer es la segunda causa de muerte más común en el mundo y solo en el 2018 fue la responsable de 9.6 millones de defunciones.<sup>1</sup> A pesar de la elevada cantidad de recursos invertidos para enfrentar esta enfermedad, aún no se ha encontrado la forma más adecuada de combatirla. Una de las razones es que el cáncer, a diferencia de otras enfermedades, no es solo una enfermedad sino un conjunto de enfermedades relacionadas. En todos los tipos de cáncer, algunas células del cuerpo empiezan a dividirse sin parar y se esparcen en los tejidos cercanos.

Debido a la alta tasa de mortalidad, los fuertes efectos secundarios y la falta de tratamientos eficaces para combatir esta enfermedad, hay una tendencia hacia la transición desde la medicina terapéutica a la medicina preventiva. Siguiendo estrategias preventivas como una forma de combatir el cáncer, se estima que se podrían evitar entre un tercio y la mitad de casos.<sup>2</sup>

Sin embargo, la detección temprana del cáncer se dificulta pues los síntomas de esta enfermedad no aparecen hasta que el paciente se encuentra en etapas más avanzadas. Por este motivo, es necesario contar con pruebas de alta sensibilidad que brinden un diagnóstico certero y que, además, permitan monitorear el estadio del cáncer.

En consecuencia, la demanda de este tipo de métodos de diagnóstico se ha incrementado. Muchas de las investigaciones se han enfocado en el estudio de los cambios en el cuerpo de un paciente que sufre esta enfermedad que puedan servir para dar un diagnóstico preciso de su avance. Uno de los descubrimientos más importantes dentro de esta área ha sido la identificación de los biomarcadores.

## **1.2 Biomarcadores**

Los biomarcadores o marcadores biológicos son indicadores objetivos y medibles de un estado biológico o condición. Estos marcadores son normalmente medidos y evaluados para examinar procesos biológicos, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.<sup>3</sup> Dentro de los procesos patológicos donde se suelen estudiar los biomarcadores se encuentra el cáncer. Para este caso, al marcador biológico asociado a esta patología se le denomina biomarcador tumoral.

### **1.2.1 Biomarcadores tumorales**

Los biomarcadores tumorales se pueden definir como moléculas biológicas presentes en, o producidas por, un tumor, o segregadas por el cuerpo en respuesta a las células cancerígenas.<sup>4</sup> Estas moléculas se suelen encontrar en las células, tejidos, sangre u otros fluidos y son utilizadas para diferenciar un tumor de un tejido normal o para determinar la presencia de éste por medio de mediciones en la sangre u otros fluidos. Es por esto

que la medición y evaluación de estos marcadores tumorales puede servir como indicador de un proceso cancerígeno dentro de un cuerpo.

Un biomarcador tumoral ideal debería ser específico para un solo tipo de cáncer y detectable únicamente en presencia de las células cancerígenas. Sin embargo, muchos de los biomarcadores tumorales conocidos hasta el momento carecen de esta especificidad o sensibilidad debido a que es frecuente encontrarlos en diferentes tipos de tumores del mismo tipo de tejido.<sup>4</sup>

Los biomarcadores tumorales conocidos hasta el momento se pueden clasificar de acuerdo a los diferentes grupos bioquímicos a los que pertenecen como proteínas, ADN, ARN, micro-ARN, péptidos, hormonas, antígenos oncofetales, citokeratinas y carbohidratos.<sup>5</sup> Además, se pueden detectar en el sistema circulatorio (sangre, suero o plasma), en secreciones (heces, orina, esputo o secreción del pezón) o en otros fluidos humanos biológicos.<sup>6</sup> Esta detección puede brindar información acerca de la presencia del tumor, del estado de la enfermedad, o de la respuesta del paciente frente a algún tratamiento.

Los diversos trabajos de investigación realizados desde hace unas décadas han permitido el descubrimiento de biomarcadores tumorales para uso clínico. Hasta la fecha, la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU. (FDA) ha aprobado 19 biomarcadores tumorales proteicos (Tabla 1), de los cuales 11 son detectables en la sangre. Algunos de estos biomarcadores son utilizados en aplicaciones clínicas, como por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA), utilizado para el monitoreo del cáncer colorectal.

**Tabla 1.** Biomarcadores proteicos aprobados por la FDA.<sup>7</sup>

<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Biomarcador</b>
Hígado	Fibrina/productos de degradación de fibrinógeno (FDP)
	Matriz de proteína nuclear 22 (NMP-22)
	Antígeno tumoral del hígado (BTA)
	CEA de alto peso molecular y mucina
Mama	Antígeno carbohidrato 15.3 (CA 15-3)
	Antígeno carbohidrato 27.29 (CA 27-29)
	Receptor de estrógeno (ER)
	Receptor de progesterona (PR)
	Oncogen c-erB-2 (HER2-neu)
Colorectal	Antígeno carcinoembrionario (CEA)
	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
Gastrointestinal	Homólogo del sarcoma viral felino tipo 4 v-kit Hardy-Zuckerman (KIT)
Ovario	Antígeno carbohidrato 125 (CA 125)
	Proteína 4 de epidídimo humano (HE4)
Pancreático	Antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9)
Próstata	Antígeno específico prostático (PSA)
Testicular	$\alpha$ -fetoproteína (AFP)
	Gonadotropina coriónica humana- $\beta$ ( $\beta$ -hCG)
Tiroides	Tiroglobulina (TG)

### 1.3 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína (Figura 1) de masa molecular aproximada de 180 kDa<sup>8</sup> involucrada en la adhesión celular. Normalmente su producción ocurre durante el desarrollo fetal, y se detiene después del nacimiento.

Sin embargo, el CEA es más conocido por su relación con el cáncer. Esta proteína se encuentra en niveles bajos en el suero sanguíneo de personas sanas (< 2 ng/mL) y ligeramente superiores en fumadores.<sup>9</sup> Sin embargo, el CEA se sobreexpresa en tumores de origen epitelial incluyendo carcinoma colorectal, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de ovario mucinoso.<sup>10</sup> Es por esto que el CEA es uno de los biomarcadores clínicos tumorales más utilizados para la detección de carcinomas colorectal primarios y metastásicos debido en parte a su limitada expresión en tejido normal adulto, al incremento de su expresión en tumores, y a una buena correlación entre los niveles de CEA en el suero y el grado tumoral de pacientes con carcinoma colorectal.<sup>10,11</sup>

Debido a la información que puede brindar una detección efectiva del CEA para el diagnóstico y control de ciertos tipos de cáncer, se han diseñado diversos biosensores de CEA cada vez más rápidos, simples y sensibles.



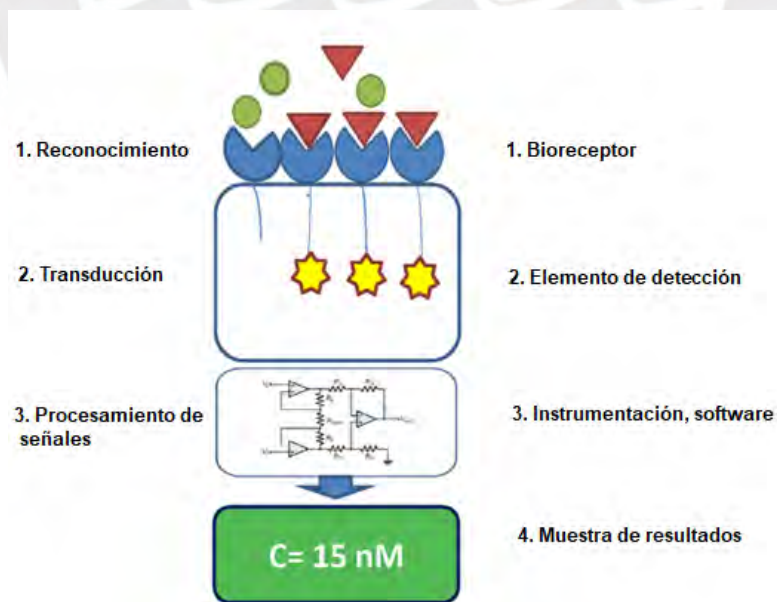
**Figura 1.** Representación de CEA. Tomada de Boehm y colaboradores.<sup>12</sup>

## 1.4 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo que detecta la presencia o la concentración de una biomolécula específica, microorganismo u otro analito biológico. Este dispositivo combina un receptor de reconocimiento biológico; un transductor fisicoquímico que convierte ese reconocimiento en una señal detectable; y una instrumentación que procesa esa señal (Figura 2).<sup>13</sup>

El proceso de detección se lleva a cabo en tres pasos: 1) la captura del analito por parte de un elemento específico de reconocimiento (bioreceptor), el cual puede ser una enzima, un anticuerpo o secuencias específicas de ADN o ARN; 2) la transformación del proceso de captura del analito en una señal fisicoquímica (transducción), la cual puede ser óptica, eléctrica o mecánica; y 3) el procesamiento de la señal para obtener información útil como la presencia y la concentración del analito.

Siguiendo este esquema, se han desarrollado múltiples biosensores selectivos y con bajos límites de detección para diferentes analitos, entre los cuales se encuentran los biomarcadores tumorales.



**Figura 2.** Esquema de un biosensor. Adaptada de Šmuc y colaboradores.<sup>14</sup>

En la búsqueda de nuevos materiales para el desarrollo de sensores, se ha descubierto que los nanomateriales presentan el potencial para incorporarse en los biosensores ofreciendo soluciones sensibles, específicas, rápidas y de bajo costo.

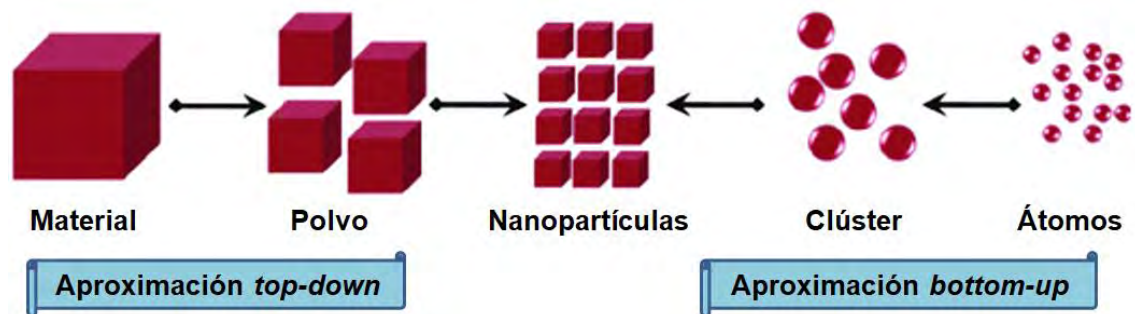


## 2 Nanomateriales utilizados en el desarrollo de nanosensores

Los nanomateriales son sistemas que poseen al menos una dimensión a nanoescala (entre 1 y 100 nm).<sup>15</sup> Este tipo de materiales presentan propiedades ópticas, electrónicas, y mecánicas únicas, las cuales pueden ser aprovechadas para el desarrollo de materiales novedosos con aplicaciones variadas en diferentes campos.

Las características que más resaltan en los nanomateriales son: 1) su amplia área superficial (elevada relación área:volumen) lo cual permite la funcionalización con una alta cantidad de moléculas; 2) sus propiedades nuevas con respecto a sus homólogos macroscópicos que, además, se pueden modular mediante cambios en la morfología y el tamaño, entre otros factores; y 3) su tamaño comparable a sistemas biológicos.

En las siguientes secciones se tratará acerca de algunos de los nanomateriales más utilizados en el desarrollo de biosensores para biomarcadores tumorales: nanopartículas magnéticas (MNP), puntos cuánticos (QD) y nanopartículas de metales nobles (NP). Se mostrarán brevemente los métodos de síntesis de cada uno de estos nanomateriales, los cuales, en términos generales, se pueden clasificar en dos estrategias: *top-down* y *bottom-up* (Figura 3). Las estrategias *top-down* hacen referencia a la ruptura controlada de los materiales de partida sobre moldes que permiten darle forma a la nanopartícula, mientras que las estrategias *bottom-up* consisten en la construcción paso a paso de las nanopartículas a partir de sus átomos.

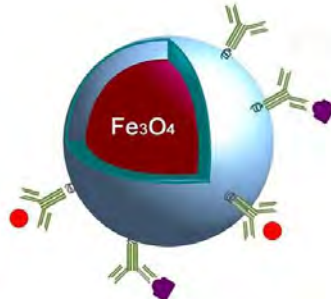


**Figura 3.** Aproximaciones *top-down* o *bottom-up* para la síntesis de nanopartículas. Adaptada de Pareek y colaboradores.<sup>16</sup>

Además, se mostrarán las propiedades únicas de estos nanomateriales que los diferencian significativamente de sus análogos macroscópicos (p.ej. el superparamagnetismo de las MNP, el confinamiento cuántico en los QD, y la resonancia del plasmón superficial de las NP). Además, se discutirá cómo se pueden aprovechar estas propiedades peculiares en el desarrollo de nanosensores.

## 2.1 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (MNP) son una clase de nanomateriales que pueden ser manipuladas utilizando campos magnéticos. Estas nanopartículas están compuestas por un núcleo magnético (normalmente hierro, níquel, cobalto o sus óxidos), un revestimiento de la superficie, y un componente químico que le dará funcionalidad a este material en la capa externa (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura de la MNP. Tomada de Shevtsov y colaboradores.<sup>17</sup>

### Síntesis

Se han sintetizado diferentes tipos de MNP dentro de las cuales se encuentran las de óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ); ferritas de manganeso, cobalto, níquel y manganeso; partículas de FePt, cobalto, hierro, níquel, CoPt y FeCo; y MNP multifuncionales como los heterodímeros  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ ,  $\text{FePt-Ag}$ ,  $\text{CdS-FePt}$ , entre otras.<sup>18</sup> Estas MNP se pueden sintetizar por diferentes métodos, de los cuales los más conocidos son los de co-precipitación, microemulsión, descomposición térmica, hidrotermal y deposición química de vapor.<sup>19</sup>

Luego de la síntesis del núcleo, es necesario estabilizar las MNP con el fin de evitar su aglomeración irreversible. Esta estabilización se puede conseguir mediante el recubrimiento de la superficie de la MNP utilizando los polímeros o surfactantes adecuados.

### Superparamagnetismo

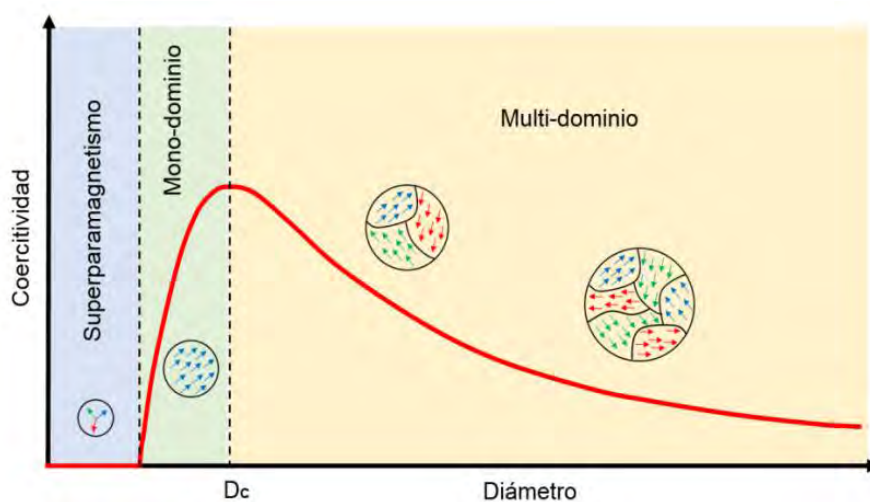
Las propiedades magnéticas son ocasionadas por el movimiento de partículas que presentan masa y carga eléctrica. Una partícula cargada girando crea un dipolo magnético conocido como magnetón.<sup>20</sup>

Las orientaciones del momento magnético en un material permiten identificar y clasificar los diferentes tipos de magnetismo observados en la naturaleza. Son cinco los tipos de magnetismo: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo, y ferrimagnetismo.<sup>20</sup>

Los materiales paramagnéticos presentan momentos atómicos magnéticos desacoplados (o magnetones desacoplados), mientras que, en los materiales ferromagnéticos, estos

magnetones se encuentran asociados en grupos. Al volumen del material ferromagnético en los cuales todos los magnetones están alineados se le conoce como dominio magnético o dominio de Weiss.<sup>21</sup> Este dominio es lo que diferencia un material paramagnético de uno ferromagnético.

Los dominios de un material ferromagnético determinan una dependencia del comportamiento magnético con el tamaño de la partícula ya que a medida que se reduce el tamaño, el número de dominios también disminuye. Una forma de medir esta dependencia es con la coercitividad, es decir, analizando el campo magnético necesario para que el material se desmagnetice después de haberlo magnetizado hasta saturación (Figura 5).



**Figura 5.** Dependencia de la coercitividad con el tamaño de la MNP. Adaptada de Durán y colaboradores.<sup>22</sup>

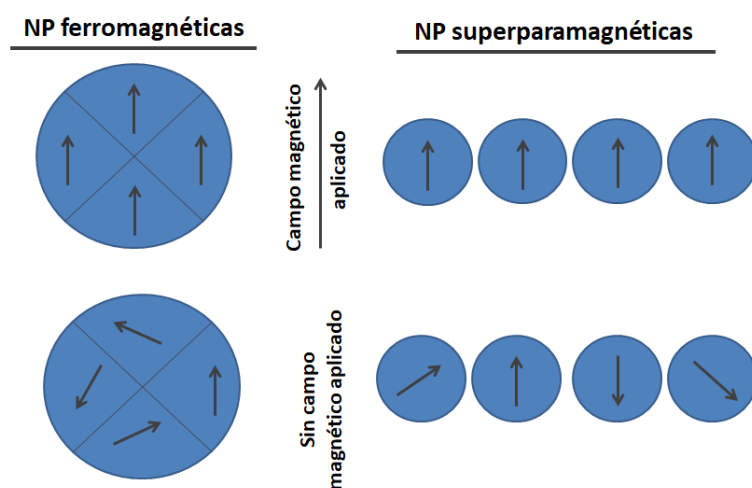
Cuando la partícula alcanza un tamaño nanométrico, puede convertirse en un material superparamagnético. Esto significa que no presenta magnetización remanente al retirar el campo magnético externo, lo cual se ve reflejado en su coercitividad, igual a cero. Sin embargo, cuando se aplica un campo magnético a la MNP, se induce un dipolo magnético y habrá un alineamiento de los momentos magnéticos con el campo (Figura 6).

Esta propiedad es útil, pues, al solo estar magnetizadas en presencia del campo magnético externo mas no en ausencia de éste, se evita la agregación de las MNP.<sup>23</sup>

### Aplicación en el diseño de biosensores

Estas propiedades magnéticas son las más explotadas de las MNP en el desarrollo de biosensores; ya que se las pueden utilizar para capturar y concentrar el analito aplicando un campo magnético externo, o para atraerlas a la superficie activa de detección del biosensor.<sup>18</sup> Mediante estas estrategias se pueden conseguir límites de detección más bajos y mejorar así la sensibilidad del sensor.





**Figura 6.** Comparación de MNP ferromagnéticas y superparamagnéticas. Adaptada de Vatta y colaboradores.<sup>23</sup>

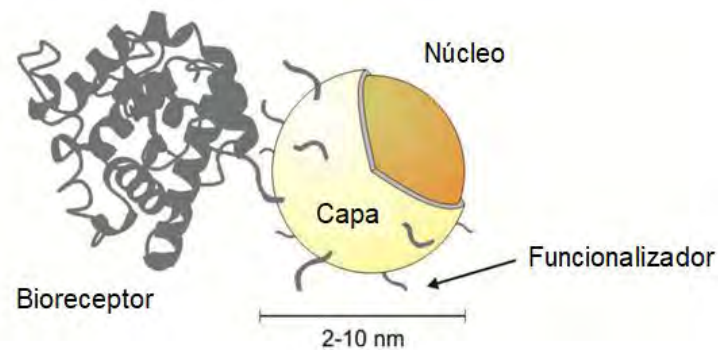
## 2.2 Puntos cuánticos

Los puntos cuánticos (QD) son nanocrisales semiconductores coloidales que presentan propiedades ópticas únicas debido a que están confinadas en un espacio 3D de dimensiones nanométricas. Estas propiedades ópticas están relacionadas con la brecha de banda (*i.e.* separación entre la banda de conducción y la banda de valencia) asociada a todo material semiconductor.

Cuando este material absorbe un fotón, un electrón ( $e^-$ ) se puede excitar de la banda de valencia a la de conducción, dejando un hueco ( $h^+$ ) en la banda de valencia. De esta manera, cuando el electrón regresa a la banda de valencia, se emite la fluorescencia.

Luego de la absorción de luz, el  $e^-$  y  $h^+$  interactúan mutuamente y no se mueven independientemente, debido a la atracción Coulómbica que existe entre ellos (excitón).<sup>24</sup> A la distancia entre el par  $e^-$  y  $h^+$  se le conoce como radio de Bohr y cuando las dimensiones del material semiconductor son menores que este radio de Bohr del excitón, se dice que se encuentra en un confinamiento cuántico y al material se le denomina punto cuántico (QD).

Los QD están compuestos por un núcleo hecho de un semiconductor metálico que normalmente está cubierto por otro material semiconductor llamado capa, el cual presenta mayor brecha de banda que la del núcleo (Figura 7). El núcleo es el responsable de las propiedades ópticas fundamentales como absorción y emisión.<sup>25</sup> Por otro lado, la capa se encarga de pasivar la superficie del núcleo de manera que mejore sus propiedades ópticas y se reduzca el ataque químico, y, en menor medida, de modular las propiedades ópticas.<sup>26,27</sup> De esta manera, las propiedades ópticas del QD son menos sensibles a cambios en el medio que se encuentra como la presencia de oxígeno o variaciones en el pH.



**Figura 7.** Estructura del QD. Adaptada de Fontes y colaboradores.<sup>28</sup>

Para que la emisión por fluorescencia se encuentre en la región visible, tanto el núcleo como la capa deben estar compuestos por elementos del grupo II-B y VI-A de la tabla periódica. Los principales QD de este tipo son CdSe/ZnS, CdTe/CdS y ZnSe/ZnS.<sup>26</sup>

### Síntesis de QD

Siguiendo las estrategias generales de síntesis (*top-down* y *bottom-up*), se han propuesto diversos métodos incluyendo procesos de calentamiento/combustión, técnicas hidrotermales, síntesis electroquímicas, oxidaciones ácidas y tratamiento con plasma, entre otros.<sup>25</sup>

La mayoría de métodos de síntesis del tipo *bottom-up* de los QD involucran los siguientes pasos: (i) nucleación, (ii) crecimiento del cristal preformado en partículas aisladas del tamaño deseado, y (iii) tratamientos post-preparativos como purificación del QD. Estos métodos de síntesis se pueden clasificar de acuerdo al medio en el que se lleva a cabo la síntesis, es decir, en medio orgánico o medio acuoso. Comparando estas dos rutas, las de medio acuoso son menos costosas, menos tóxicas y los QD obtenidos son biocompatibles.<sup>29</sup>

Luego de la síntesis en cualquiera de los dos medios, los QD terminan cubiertos por moléculas orgánicas o inorgánicas (surfactantes), las cuales previenen la aglomeración y precipitación de los nanocristales formados. Además, los grupos carboxilos, tioles o aminas de estas moléculas se pueden utilizar para la funcionalización posterior con biomoléculas, las cuales les dan especificidad hacia un analito determinado (Figura 7).<sup>28</sup>

Por otro lado, en las síntesis en medio no acuoso, luego de obtener los QD, estos deben ser transferidos al medio acuoso para su uso en biosensores. Para ello, una alternativa es utilizar un método de intercambio de ligandos y el recubrimiento con lípidos o polímeros para conseguir mejor solubilidad en agua.<sup>30</sup>

## **Propiedades**

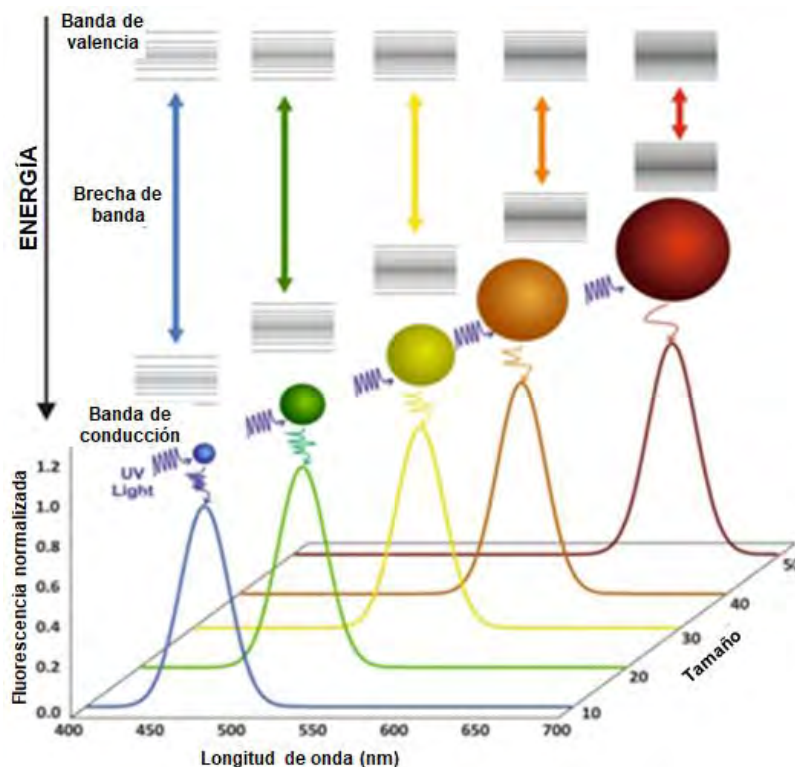
Una de las propiedades más resaltantes de los QD es la fluorescencia. Los QD presentan diversas ventajas sobre otros compuestos como los tintes orgánicos debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales son:

1. Los QD son más fotoestables que los tintes orgánicos tradicionales debido a su composición inorgánica.
2. El rendimiento cuántico de los QD es alto (10-20 veces más brillante que los tintes orgánicos).
3. Los QD son menos propensos a la degradación y presentan alta resistencia a la fotodesactivación.
4. Los QD presentan amplios espectros de absorción y espectros estrechos de emisión.<sup>31</sup>
5. El espectro de emisión depende del tamaño del QD (Figura 8) y éste se puede regular cambiando los parámetros de síntesis.<sup>31</sup>

## **Aplicación en el diseño de biosensores**

Muchos de los ensayos diseñados para la detección de biomarcadores tumorales utilizan la detección por fluorescencia.<sup>32</sup> En ese sentido, los QD son una gran herramienta como material de partida debido a las propiedades mencionadas anteriormente.

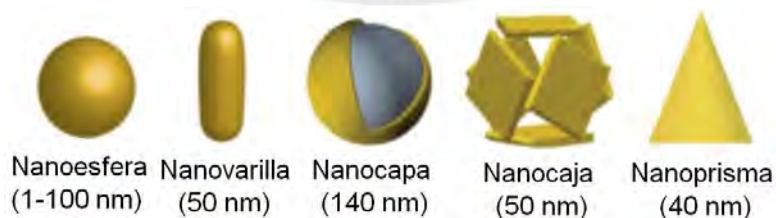
Dentro de estas propiedades, la dependencia del espectro de emisión con el tamaño del QD de un mismo material es de gran utilidad (Figura 8), y se puede aprovechar para el desarrollo de sensores de múltiples analitos utilizando una sola longitud de onda de excitación.<sup>33</sup>



**Figura 8.** Relación del tamaño del QD con el espectro de emisión a una sola longitud de onda de excitación. Adaptada de Altintas y colaboradores.<sup>34</sup>

### 2.3 Nanopartículas de metales nobles

Se conoce como metales nobles a aquellos metales que son resistentes a la corrosión y oxidación en aire húmedo. Dentro de estos metales se encuentran el rutenio, el rodio, el paladio, la plata, el osmio, el iridio, el platino y el oro. De todos estos materiales, las nanopartículas de oro y plata en sus diversas formas y tamaños son las más estudiadas (Figura 9). Esto ha conducido al desarrollo de diversas técnicas y métodos para diagnóstico molecular, terapia e imagen. Además, debido a sus propiedades ópticas únicas, también se ha explorado ampliamente su aplicación en el desarrollo de nuevos biosensores.



**Figura 9.** Diferentes formas y tamaños de las NP. Adaptada de Bolaños y colaboradores.<sup>35</sup>

## Síntesis

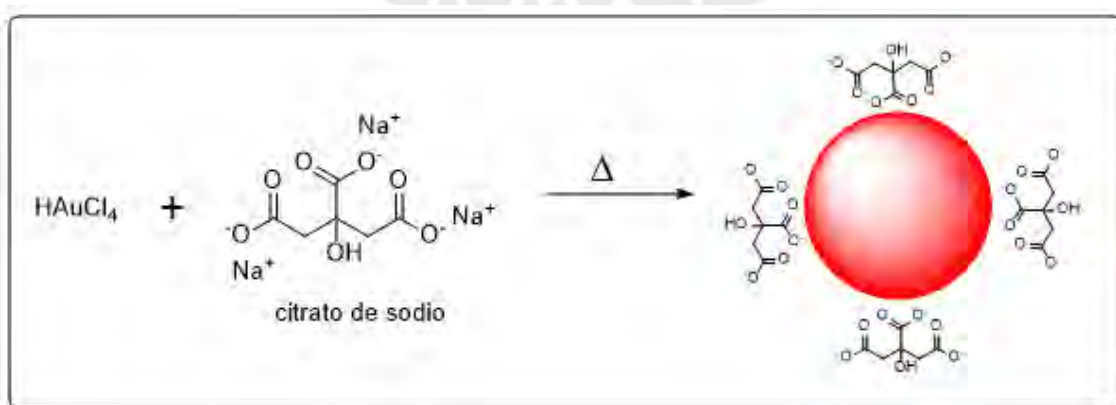
En las últimas décadas, se han desarrollado diversos métodos nuevos y prometedores para la síntesis de las nanopartículas de metales nobles (NP), debido a que es uno de los aspectos fundamentales en el estudio y aplicación de estos materiales. La razón de esto es que las propiedades fisicoquímicas dependen de su forma, tamaño y composición.

La mayoría de métodos de síntesis descritos en la literatura son *bottom-up* debido a que mediante estos métodos se pueden sintetizar nanoestructuras homogéneas con estructuras cristalográficas perfectas, sin necesidad de instalaciones especializadas.<sup>16</sup>

Por otra parte, los métodos de síntesis se pueden clasificar como métodos físicos (por ejemplo, deposición de vapor, ablación láser, molienda, etc) y químicos (por ejemplo, reducción química, reducción fotoquímica, co-precipitación, descomposición térmica, hidrólisis, etc).<sup>36</sup> Todas estas técnicas de síntesis que se han desarrollado y se están mejorando, tienen como finalidad la obtención de NP con un elevado nivel de homogeneidad (monodispersidad), y un control fino en su tamaño y forma.

Muchos de los sensores basados en NP que se han propuesto hasta el momento están basados en nanopartículas de oro (AuNP) debido a sus propiedades ópticas únicas, su facilidad de derivatización con diferentes biomoléculas en solución acuosa, y su gran estabilidad frente a la oxidación que les da una gran ventaja frente a las AgNP.<sup>37</sup> Las AuNP se pueden sintetizar fácilmente con tamaños que están entre 3 y 200 nm de diámetro, siendo las más comunes las de forma cuasi-esférica.

Generalmente, el método más común para sintetizar AuNP cuasi-esféricas es la reducción química de los iones Au(III) a Au(0) utilizando iones citrato como agente reductor, el cual fue desarrollado por Turkevich<sup>38</sup> y luego fue optimizado por Frens<sup>39</sup> (Figura 10). En este método, el citrato actúa como agente reductor y como agente de recubrimiento o surfactante ya que a medida que las AuNP se forman, previene que estas sigan creciendo, y las estabiliza debido a la repulsión entre las NP una vez recubiertas. Mediante modificaciones en la relación Au/citrato se puede modular el tamaño de las nanoesferas de oro resultantes desde 9 a 120 nm de diámetro.<sup>40</sup>



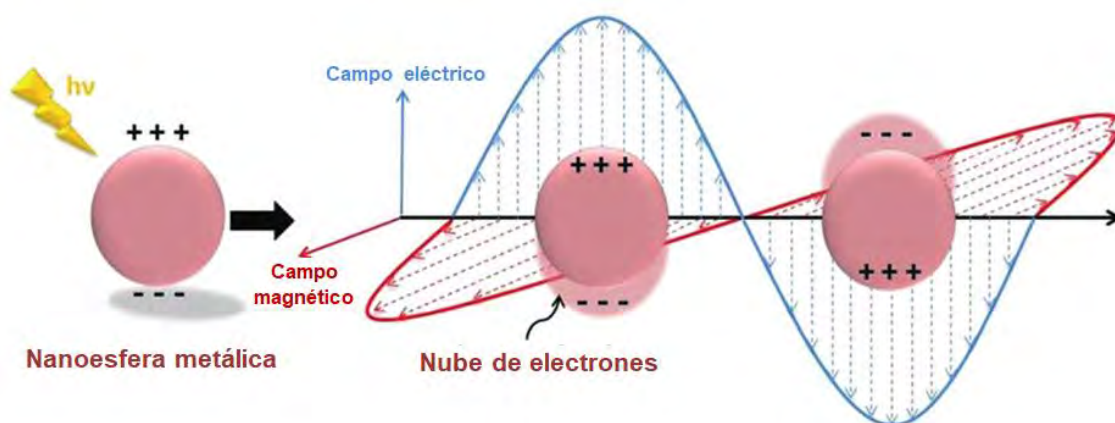
**Figura 10.** Síntesis de AuNP cuasi-esféricas por el método de reducción con citrato.

Alternativamente, se han estado desarrollando otras metodologías para la síntesis controlada de diferentes NP. Estos métodos incluyen NP esféricas o no esféricas; puras o del tipo núcleo/capa.<sup>36</sup>

## Propiedades

Las nanopartículas de metales nobles presentan propiedades que se pueden utilizar en el desarrollo de biosensores como la resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR), la dispersión Raman mejorada en superficie (SERS), el aumento o desactivación de la fluorescencia, la actividad electroquímica, etc.

Una de las propiedades fisicoquímicas únicas de las nanopartículas de metales nobles que ha sido más explorada para el desarrollo de biosensores, es su resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR). Este fenómeno ocurre cuando una onda electromagnética (como la luz) incide en la superficie de la nanopartícula metálica a una frecuencia en resonancia con la frecuencia de oscilación de los electrones de conducción del metal, lo cual genera que estos oscilen de forma coherente, lo que se conoce como LSPR (Figura 11).<sup>41</sup> Esta oscilación colectiva produce una intensa absorción y/o dispersión de la luz.

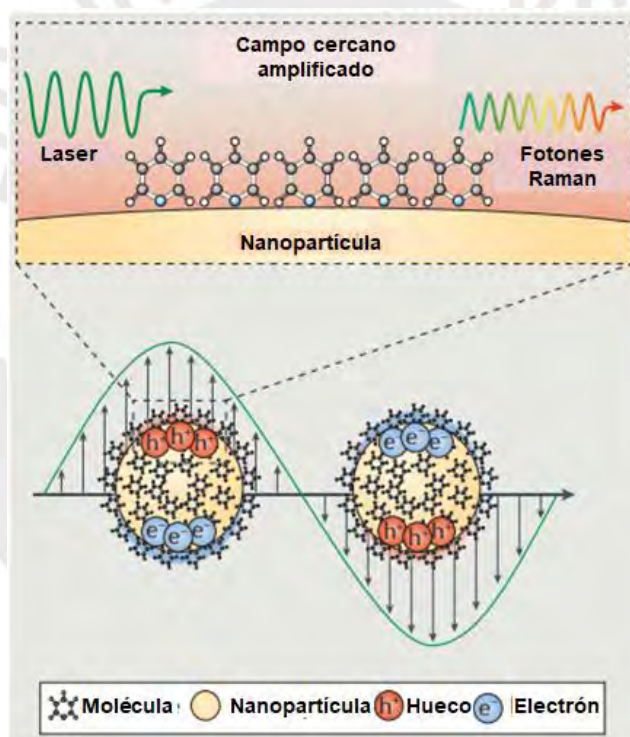


**Figura 11.** Ilustración esquemática de la resonancia de plasmón de superficie localizado. Adaptada de Peiris y colaboradores.<sup>42</sup>

En el caso particular de las nanopartículas de oro (como ocurre también para las de plata), debido a la LSPR estos nanomateriales presentan elevados coeficientes de extinción y propiedades de dispersión excepcionales en el rango del ultravioleta/visible/infrarrojo cercano.<sup>43</sup> Esto último permite que las NP den una alta sensibilidad cuando se utilizan en métodos de detección óptica. Por esta razón, las NP de oro y plata son buenas candidatas en el desarrollo de biosensores colorimétricos, pero se suelen utilizar más las de oro, debido a su menor susceptibilidad a oxidación, como se indicó anteriormente. Adicionalmente, las propiedades del LSPR se pueden modular de acuerdo al tamaño, forma y composición de la NP.<sup>44</sup>

Este fenómeno también puede mejorar técnicas tradicionales como la espectroscopía Raman. Esta técnica se basa en la dispersión Raman que ocurre debido a la dispersión inelástica de los fotones incidentes que impactan en una molécula y pierden o ganan energía de las transiciones roto-vibracionales de la molécula. Esta dispersión puede ser amplificada significativamente (en un factor de  $10^4$ - $10^8$ ) cuando el analito se encuentra adsorbido o cerca de la superficie de la nanopartícula.<sup>45</sup> La espectroscopía que aprovecha esta mejora en las señales en Raman se denomina espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS) (Figura 12).

Esta mejora se debe principalmente a la LSPR de las nanoestructuras metálicas. La amplificación puede ser aún mayor cuando el analito se encuentra en los *hot spots*, es decir, zonas de la NP donde el campo electromagnético es mayor, como en los espacios intersticiales formados en los agregados de NP o en determinadas zonas de las NP anisotrópicas.<sup>46</sup>



**Figura 12.** Principio de SERS. Adaptada de Ding y colaboradores.<sup>47</sup>

### Aplicación en el diseño de biosensores

Una de las propiedades de las NP mencionadas que se puede aprovechar en el desarrollo de biosensores es la facilidad que tienen estas de desactivar la fluorescencia (*quenching*). La desactivación de la fluorescencia ocurre principalmente por el mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) donde la molécula fluorescente es el donador mientras que la nanopartícula es el aceptor. En este

caso, en un biosensor la interacción del analito con el receptor puede generar un cambio en la distancia entre la NP y el donador, de manera que el efecto FRET se anule o se dé, generando variaciones en la fluorescencia del donador.<sup>48</sup>

Como se mencionó anteriormente, los altos coeficientes de extinción de las NP permiten que estas también puedan ser utilizadas en el desarrollo de biosensores colorimétricos. Esto se logra, pues las bandas de LSPR dependen ligeramente del tamaño de la NP y del índice de refracción de los alrededores, pero varían en gran medida con la distancia entre las NP. Por ejemplo, la agregación de las NP produce un cambio pronunciado en el color, debido al acoplamiento entre los plasmones de las NP adyacentes.<sup>49</sup> Algunos biosensores colorimétricos basados en NP de oro o plata utilizan este cambio debido a la agregación como señal de presencia o ausencia del analito. Mientras, otros sensores aprovechan los cambios en la posición de la banda de LSPR ocasionado por la presencia del analito para su detección.



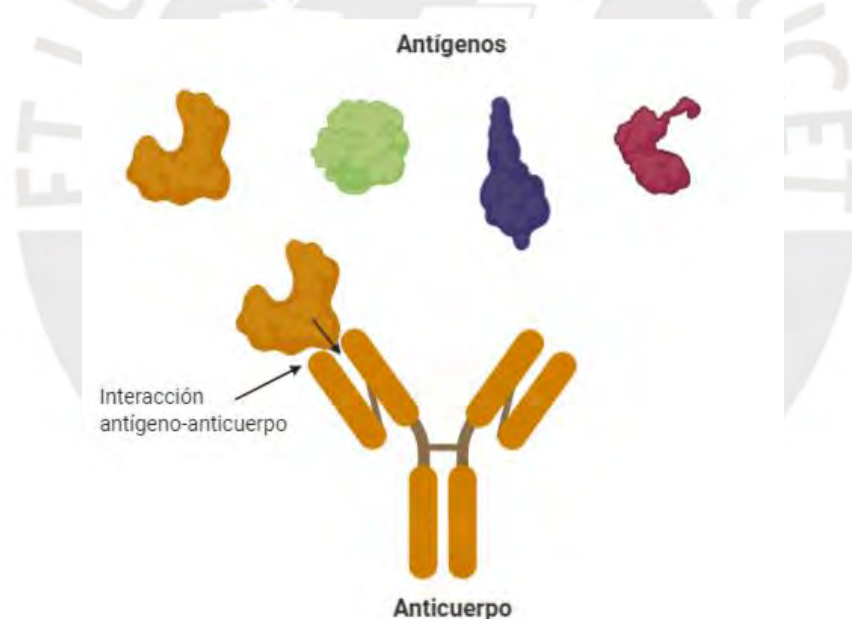


### 3 Moléculas dirigidas para la identificación de biomarcadores tumorales

El primer paso del proceso de detección de un analito con un biosensor es el reconocimiento de éste por medio de un bioreceptor. Para llevar a cabo este proceso se han utilizado principalmente dos tipos de biomoléculas: anticuerpos y aptámeros.

#### 3.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (Ab) o inmunoglobulinas (Ig) son proteínas grandes con forma de “Y” producidas por células plasmáticas del sistema inmune adaptativo. Esta producción de Ab es utilizada por el sistema inmune para neutralizar patógenos como virus o bacterias. Una parte fundamental de este proceso de neutralización es el reconocimiento de una molécula del patógeno llamada antígeno por medio del anticuerpo. Esto se logra, porque cada punta superior de la “Y” en el anticuerpo contiene una sección llamada parátipo que reconoce específicamente a una zona del antígeno, el epítipo. Cuando el anticuerpo y el antígeno se juntan, forman un complejo por medio de interacciones no covalentes con una elevada precisión y afinidad (Figura 13). De esta manera, se logra marcar a un patógeno o célula infectada para que sean atacadas o inhibidas por el sistema inmune.

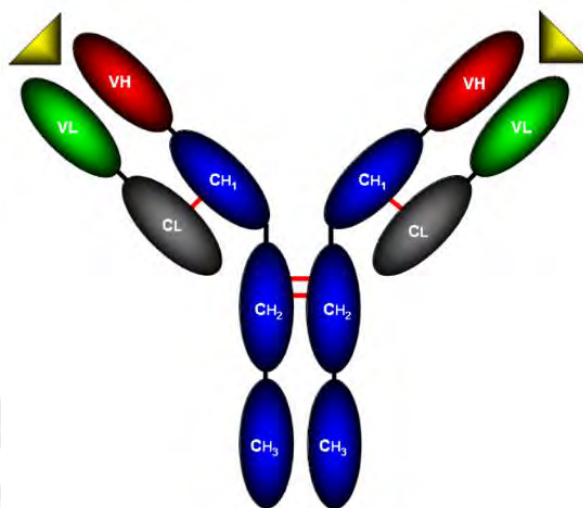


**Figura 13.** Estructura básica del Ab y representación de la interacción antígeno – anticuerpo.

#### Estructura

En la estructura básica de un Ab (Figura 14) se pueden distinguir cuatro cadenas polipeptídicas, esto es, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están unidas por puentes disulfuro. Cada una de estas cuatro cadenas presenta a su vez una sección constante (C) y una variable (V).

En el Ab también se pueden distinguir dos bloques de construcción: el fragmento de unión del antígeno (Fab) y el fragmento constante (Fc). El fragmento Fab contiene la región del fragmento variable (V), donde se forman los sitios de enlace del Ab y que le confiere especificidad hacia el antígeno.<sup>50</sup> En la Figura 14, se puede notar que el fragmento Fab está compuesto por la región variable de la cadena pesada (VH) y la ligera (VL).



**Figura 14.** Estructura de un anticuerpo (Ab) de 150 kDa unido a su antígeno (amarillo). Las líneas rojas son los puentes disulfuro. VL: Región variable de la cadena ligera, VH: Región variable de la cadena pesada, CL: Región constante de la cadena ligera, CH<sub>1,2,3</sub>: Región constante de la cadena pesada. Tomada de Conroy y colaboradores.<sup>51</sup>

Es importante conocer la estructura del Ab, pues la funcionalización del nanomaterial con éste sin alterar su especificidad y eficiencia es un paso crucial para la obtención de un sensor sensible. Debido a que el Ab es una macromolécula asimétrica, si su funcionalización no se controla, puede ocurrir en diferentes orientaciones. Por ejemplo, si la funcionalización ocurre a través de la región constante (Fc) y el sitio de enlace del antígeno (Fab) se encuentra libre, entonces el sensor será efectivo. En cambio si, por otro lado, la funcionalización ocurre a través de Fab, entonces el sensor no mostrará su mejor desempeño. En el siguiente capítulo, se discutirá cómo se puede llevar a cabo esta funcionalización de manera adecuada.

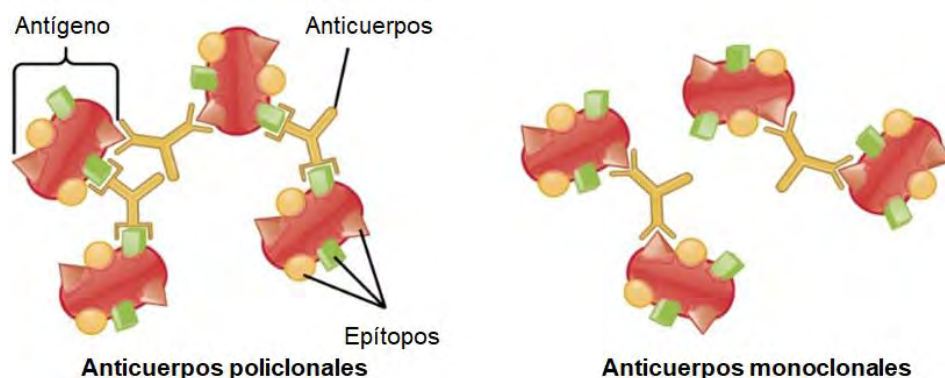
### **Tipos de Ab según su obtención**

Dependiendo del tipo de aplicación o la función que vayan a desempeñar los Ab, se pueden preparar anticuerpos monoclonales (mAb) o policlonales (pAb). Los anticuerpos policlonales pueden reconocer diferentes epítopos, mientras que los anticuerpos monoclonales, solo uno (Figura 15).

En algunos casos, es conveniente utilizar solo un tipo de Ab, pero en otros se pueden utilizar ambos tipos de Ab, dependiendo de la función que éstos cumplan en un sensor.

Por ejemplo, se suele recomendar el uso de pAb para la captura del analito objetivo, y mAb para la detección en ELISA de tipo sándwich.

Para el antígeno CEA existen ambos tipos de anticuerpos y han sido utilizados en el desarrollo de nanosensores. Por ejemplo, Chon y colaboradores<sup>52</sup> diseñaron un nanosensor SERS de CEA utilizando ambos tipos de Ab para formar un inmunocomplejo del tipo sándwich. De esta manera, se logra unir nanosferas huecas de oro funcionalizadas con pAb que amplifican la señal en Raman, y nanopartículas magnéticas funcionalizadas con mAb para la separación del analito de la matriz.



**Figura 15.** Especificidad de los anticuerpos policlonales y monoclonales.<sup>53</sup>

### Ventajas y desventajas

Debido a la especificidad y afinidad de los Ab por sus antígenos, los anticuerpos (mAb y pAb) tienen numerosas aplicaciones en el área de diagnóstico siendo el desarrollo de biosensores una de las áreas más explotadas.<sup>50</sup> Para poder aplicar los anticuerpos en el diseño de biosensores, se tienen que considerar ciertas características como la sensibilidad, la selectividad, la estabilidad y la facilidad de inmovilización. Estas características de los mAb y pAb se muestran en la Tabla 2 a modo de comparación.

**Tabla 2.** Características de los anticuerpos monoclonales y policlonales.<sup>51</sup>

Características	Policlonal	Monoclonal
Facilidad de producción	++++	+++
Costo	+++	++++
Estabilidad	+++	++
Disponibilidad comercial	++++	++++
Facilidad de inmovilización	++++	++++
Sensibilidad-afinidad	+++	++++

A pesar de que los anticuerpos ofrecen capacidades de detección excelentes, estos presentan ciertas limitaciones:<sup>54</sup>

- Estabilidad limitada frente a pH y temperatura.
- Pérdida de funcionalidad en medios no acuosos.
- Altos costos de producción.

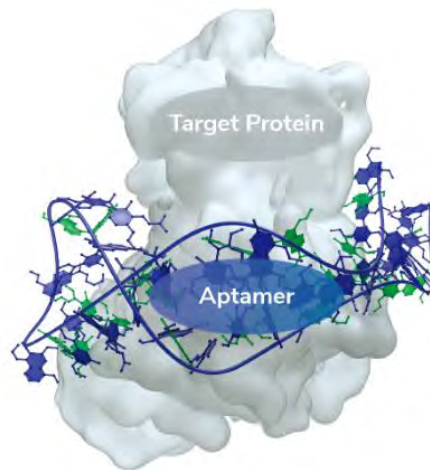
En los ensayos que utilizan nanomateriales para detección de biomarcadores, los anticuerpos están involucrados en la captura específica del analito por medio de interacciones antígeno-anticuerpo. Debido a la selectividad y sensibilidad de los anticuerpos, la mayoría de biosensores plasmónicos han utilizado estas moléculas como elemento de reconocimiento.<sup>55</sup>

### 3.2 Aptámeros

Los aptámeros (Apt) son oligonucleótidos, como el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxiribonucleico monocatenario (ssADN), o moléculas peptídicas, que pueden reconocer una molécula con una alta afinidad y especificidad, debido a que los Apt pueden adoptar una estructura tridimensional que les permite interactuar con el objetivo.<sup>56</sup> Dependiendo de su secuencia y estructura 3D, los aptámeros pueden diseñarse para enlazarse a una gran variedad de analitos, desde moléculas simples hasta proteínas, receptores de membrana u organismos enteros.<sup>57</sup>

La afinidad del aptámero por su objetivo tiende a ser alta con una constante de disociación del complejo aptámero-objetivo que se encuentra en el rango de pico- a milimolar. Estas afinidades son similares a las medidas para las interacciones entre mAb y antígenos, por lo cual los aptámeros también se pueden utilizar como bioreceptores.<sup>58</sup> Además, estas elevadas afinidades van acompañadas de una gran selectividad, de manera que los Apt pueden llegar a distinguir enantiómeros de moléculas pequeñas o variaciones pequeñas en la secuencia de una macromolécula.<sup>59</sup>

La elevada afinidad y especificidad del aptámero se debe al cambio conformacional adaptativo, es decir, los Apt pueden adaptar su conformación e interactuar con el objetivo formando lo que se conoce como el complejo aptámero-objetivo (Figura 16). En el proceso de formación de este complejo, el aptámero modifica su superficie de reconocimiento con el objetivo y maximiza la complementariedad a través de puntos de contacto cercanos.<sup>58</sup> Dependiendo de los grupos funcionales del objetivo, las fuerzas intermoleculares involucradas en la interacción con el aptámero pueden ser los enlaces puente de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, de apilamiento e hidrofóbicas.<sup>14</sup>



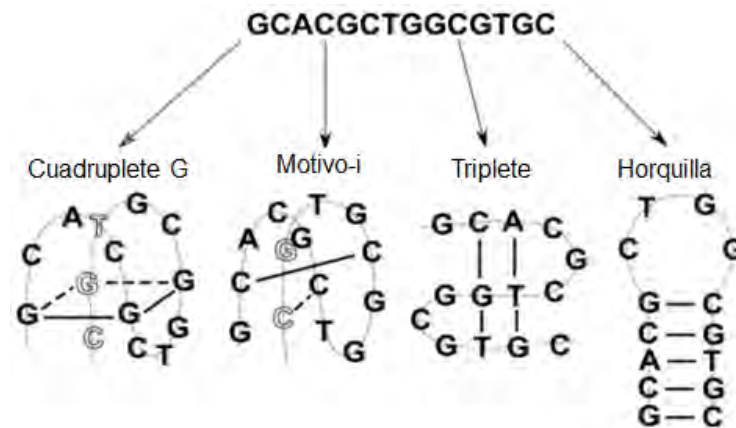
**Figura 16.** Estructura de un complejo aptámero-objetivo.<sup>60</sup>

### Estructura

Como se mencionó anteriormente, el aptámero adopta una estructura 3D que le permite reconocer a un analito selectivamente. Esta estructura tridimensional compleja está caracterizada por elementos como bucles, protuberancias, horquillas, pseudonudos, tripletes o cuádrupletes (algunos de estos motivos estructurales se muestran en la Figura 17), y está definida tanto por la secuencia del aptámero como por otros aditivos (p.ej. la presencia de cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ).<sup>58,61</sup>

Al igual que en el caso de los anticuerpos, es muy importante conocer la estructura que el aptámero debe adoptar, porque permite entender la necesidad de algunos aditivos. Por ejemplo, Szostak y colaboradores<sup>62</sup> describieron un aptámero de ARN capaz de interactuar de manera específica y selectiva con el grupo trifosfato del ATP, pero únicamente en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Por otro lado, la interacción del aptámero con el analito induce un cambio en la estructura del aptámero, lo cual puede ser útil pues este cambio puede ser aprovechado y monitoreado para el desarrollo de un sensor. Por ejemplo, Wen y colaboradores<sup>63</sup> desarrollaron un biosensor de CEA con un aptámero horquilla biotinilado que se abre en presencia de este analito exponiendo a la molécula de biotina. Este proceso permite su captura en un electrodo modificado con grafeno y estreptavidina, permitiendo la detección de CEA por cambios en la corriente de reducción.



**Figura 17.** Motivos estructurales de una secuencia de ADN. Adaptada de Yurushkin y colaboradores.<sup>64</sup>

### Obtención

Los aptámeros son elegidos mediante un proceso de selección combinatoria *in vitro* altamente eficiente llamado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial por sus siglas en inglés) mostrado en la Figura 18.

En este proceso, se parte de una amplia librería de  $10^{13}$ - $10^{15}$  secuencias diferentes de oligonucleótidos. En primer lugar, el analito de interés es incubado junto con la librería de oligonucleótidos y, en este proceso, algunas secuencias interaccionan en mayor o menor medida con el analito formando un complejo aptámero-analito. En el siguiente paso, el lavado, se separan las secuencias más afines hacia el analito del resto de secuencias de la librería mediante técnicas como cromatografía de afinidad. Estos oligonucleótidos luego son eluidos para separarlos del analito. Posteriormente, estas secuencias son amplificadas mediante PCR (reacción de polimerasa en cadena) para generar ADN de cadena doble (dsADN). Como de estas dos cadenas solo una es afín al analito, después se debe realizar un paso de separación de estas hebras para obtener el ssADN deseado. Finalmente, las hebras amplificadas forman parte de la nueva librería para una siguiente ronda de selección. Después de alrededor de entre 10-15 ciclos, la librería enriquecida se clona y se secuencía. Cada uno de los oligonucleótidos es evaluado con el fin de determinar la mínima secuencia requerida para el enlace específico con el analito.<sup>14,59</sup>

Para seleccionar aptámeros de ARN, se necesitan realizar pasos adicionales de transcripción y transcripción reversa *in vitro* para interconvertir entre ADN y ARN, dado que la PCR solo es posible para ADN.<sup>59</sup>

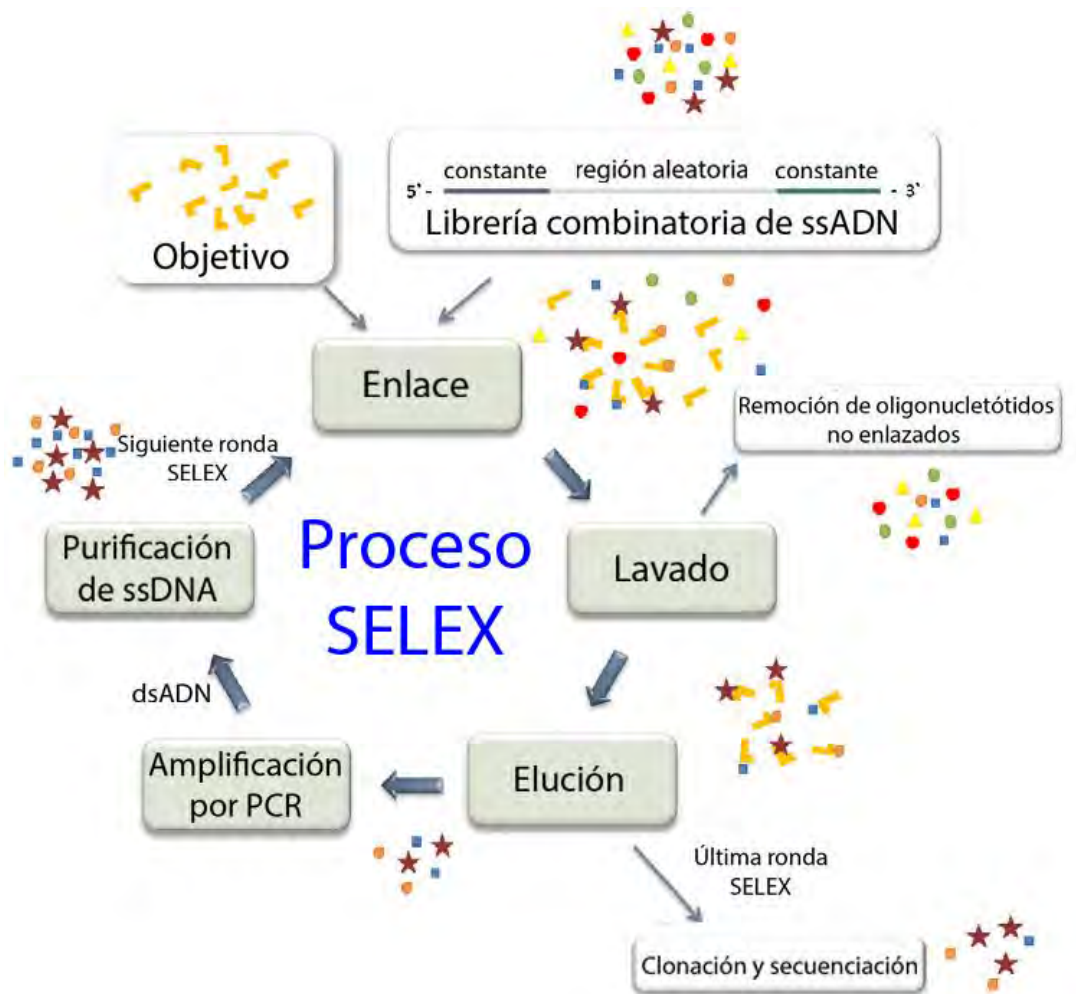


Figura 18. Proceso SELEX. Adaptada de Šmuc y colaboradores.<sup>14</sup>

### Ventajas y desventajas

Los aptámeros se han convertido en una herramienta importante para el desarrollo de biosensores. De hecho, los biosensores basados en aptámeros presentan algunas ventajas sobre los basados en anticuerpos como:<sup>59,65</sup>

- Una mayor facilidad de obtención, pues los aptámeros se pueden sintetizar de manera artificial, mientras que los anticuerpos no.
- En principio, se podrían seleccionar aptámeros para enlazar cualquier analito, mientras que los anticuerpos presentan problemas para detectar moléculas muy pequeñas, lo cual reduce su aplicabilidad.
- Los aptámeros son químicamente más estables que los anticuerpos.
- Algunos aptámeros sufren cambios conformacionales en presencia del analito. Esto permite tener mayor flexibilidad en el diseño de biosensores más novedosos, pues los aptámeros no solo se podrían utilizar como sistema de captura (reconocimiento) sino también en la transducción de la señal.
- Los aptámeros son potencialmente reutilizables.

Pese a que en algunos aspectos los aptámeros son mejores que los anticuerpos, aun presentan algunos problemas que limitan sus aplicaciones en el diseño de biosensores. Una de las principales desventajas es su rápida degradación (especialmente los de ARN) por nucleasas en medio biológico, lo cual puede limitar su aplicación práctica.<sup>66</sup>





## 4 Estrategias de conjugación para funcionalización de nanopartículas

En la mayoría de sensores, la superficie del nanomaterial se debe funcionalizar con el bioreceptor que interacciona directa o indirectamente con el analito. Con este fin, se han estado utilizando diferentes técnicas de conjugación para asociar moléculas funcionales a la superficie del nanomaterial, las cuales se pueden clasificar en dos grupos: el entrecruzamiento químico y las interacciones físicas. Idealmente, la molécula que se une a la nanopartícula debe mantener su funcionalidad después de conjugarse con el nanomaterial y no debería alterar las propiedades de este último a menos que este proceso sea parte de la detección.

En este capítulo, se mostrarán las principales técnicas de conjugación utilizadas en la fabricación de un nanosensor. Se discutirán las reacciones involucradas en cada una de estas técnicas, las moléculas que se pueden conjugar, y cómo se pueden aprovechar en la fabricación de nanosensores.

### 4.1 Entrecruzamiento químico

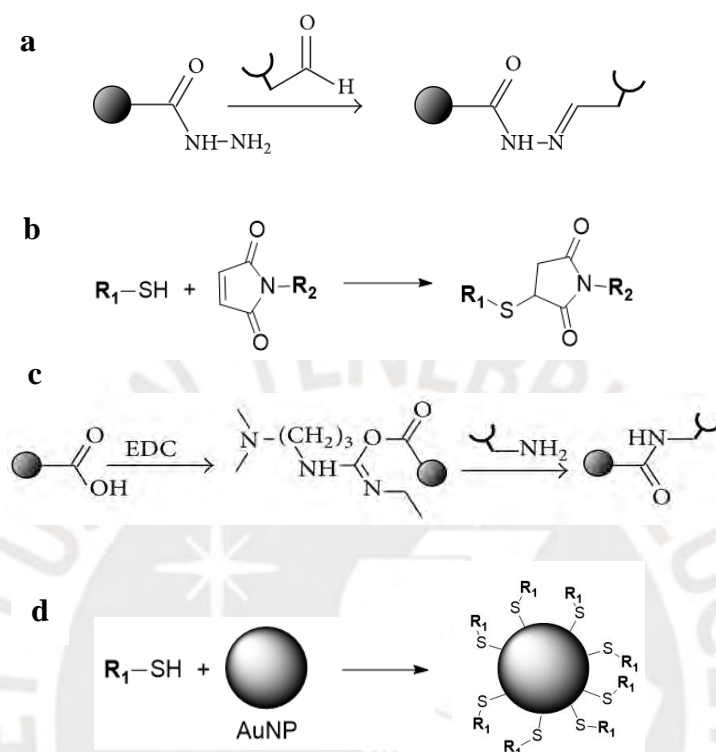
El entrecruzamiento químico es el proceso en el cual dos o más moléculas se juntan por medio de un enlace covalente. Este método se utiliza muchas veces con proteínas u otras biomoléculas, y es un componente crítico en muchas técnicas como *Western Blotting* y ELISA. Sin embargo, también se utiliza ampliamente para acoplar determinados ligandos con nanomateriales para aplicaciones como imagen, el transporte de un fármaco, y el desarrollo de sensores, entre otros.

La propiedad más importante de un reactivo entrecruzador es su grupo químico reactivo, lo que establece el método y el mecanismo para la modificación química. Las moléculas entrecruzadoras contienen por lo menos dos grupos reactivos que son capaces de unirse químicamente a grupos funcionales comunes y específicos. En ese sentido, la mayoría de técnicas de entrecruzamiento involucran solo cuatro grupos funcionales: aminas primarias, carboxilos, sulfhidrilos o tioles, y carbonilos.

Cuando se escoge un entrecruzador para la fabricación de un biosensor de interés, es necesario tener en cuenta algunos factores como:

- la reactividad química del entrecruzador y su especificidad por un grupo funcional particular;
- la longitud del espaciador, la cual se refiere a la distancia entre las moléculas conjugadas;
- la solubilidad en agua, pues los grupos funcionales del entrecruzador pueden afectar esta propiedad del nanomaterial utilizado;
- la velocidad de la reacción, dado que en la conjugación de un nanomaterial puede afectar si el entrecruzador reacciona tan pronto es añadido en la solución.

Existen diversos métodos para enlazar ligandos con grupos reactivos a la superficie de un nanomaterial mediante enlaces covalentes. Las conjugaciones covalentes más comunes que se llevan a cabo en la fabricación de nanosensores son entre los grupos hidrazida y aldehído, maleimida y tiol, ácido carboxílico y amina primaria, y superficie de oro y moléculas tioladas (Figura 19).



**Figura 19.** Estrategias de conjugación más comunes en síntesis de nanosensores. (a) Hidrazida-aldehído, (b) maleimida-tiol, (c) ácido carboxílico-amina primaria con carbodiimida (EDC) y (d) superficie de oro y moléculas tioladas. Adaptada de Werengowska-Ciecwierz y colaboradores.<sup>67</sup>

En esta sección, se mostrarán dos de las técnicas más comunes de entrecruzamiento utilizadas para la fabricación de nanosensores: acoplamiento a través del enlace Au-S, y conjugación a través de la reacción con carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC-NHS).

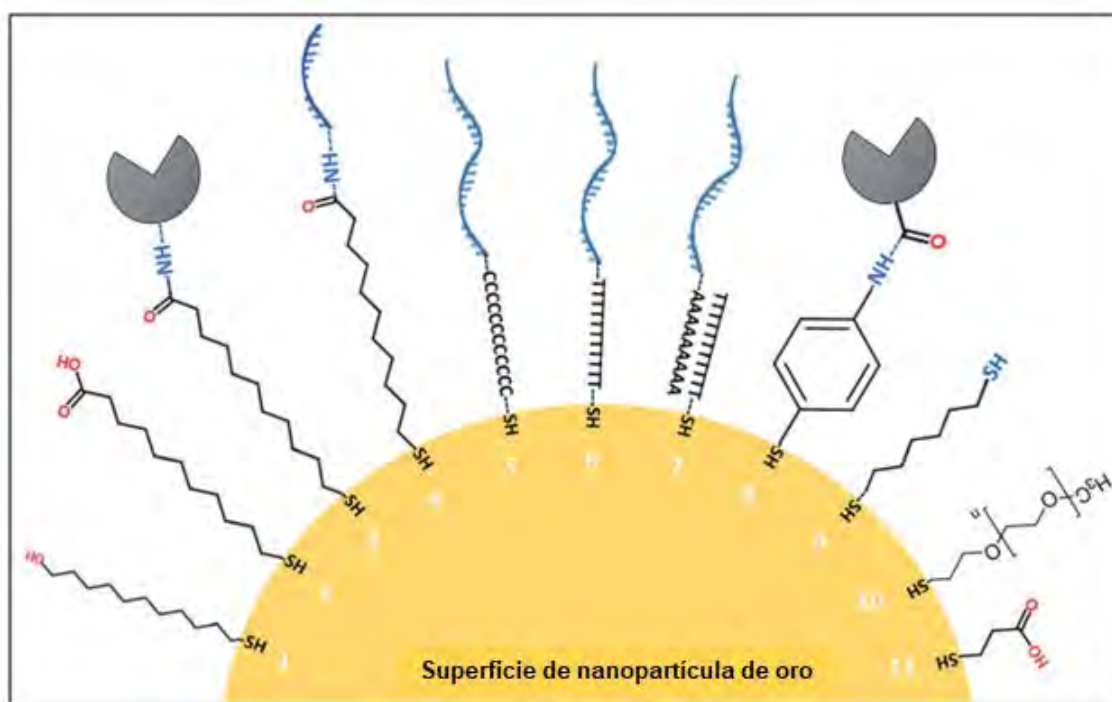
### Enlace Au-S

La interacción fuerte entre los compuestos tiolados (mercaptanos o grupos sulfhidrilos) y la superficie de metales nobles, sobre todo el oro, ha permitido el diseño y la preparación de monocapas de estas moléculas en la superficie de nanopartículas de oro para aplicaciones relacionadas con el desarrollo de biosensores.

La naturaleza inerte de las AuNP ha permitido el uso de cadenas de alcanos, así como otras moléculas tioladas, con una variedad de grupos funcionales terminales para así darle funcionalidad a la superficie de las AuNP. Por ejemplo, el ácido 11-mercaptopundecanoico cuenta con un grupo -SH y un -COOH que, tras la unión a las

AuNP, luego se puede utilizar para unir covalentemente biomoléculas como se mostrará más adelante (Figura 20-3). Otro ejemplo es el ácido 4-mercaptobenzoico, que posee un grupo  $-SH$ , para la unión a las AuNP, y un  $-COOH$  unidos por un anillo de benceno, que Wang y colaboradores<sup>68</sup> utilizaron tanto como un reportador de señal Raman como para unir al Ab de CEA a través del grupo  $-COOH$  de esta molécula tiolada.

Por otro lado, los aptámeros se pueden modificar químicamente con determinados grupos tiolados para que estos puedan conjugarse a la superficie de las AuNP directamente.<sup>69</sup> En estos casos, es necesario añadir al aptámero (normalmente antes del residuo  $-SH$ ) un espaciador compuesto por una cadena de carbonos (Figura 20-4) o una cadena de timinas/adeninas (Figura 20-6,7) con el fin de prevenir efectos de impedimento estérico a nanoescala.<sup>70</sup> Un ejemplo de esto último aplicado a la detección de CEA, se encuentra en el uso de un espaciador de seis carbonos en el aptámero horquilla de CEA ( $HS-(CH_2)_6$ -Aptámero-biotina) utilizado en el sensor de Wen y colaboradores.<sup>63</sup>



**Figura 20.** Funcionalización de las AuNP con derivados tiolados. Las estructuras químicas no están dibujadas a escala. (1) 11-Mercapto-1-undecanol, (2) ácido 11-mercaptoundecanoico, (3) proteína enlazada al ácido 11-mercaptoundecanoico por medio de un enlace amida, (4) ADN enlazado al ácido 11-mercaptoundecanoico por medio de un enlace amida, (5) ADN directamente enlazado a la superficie de oro a través de un espaciador de citosinas o de (6) timinas, (7) ADN enlazado a la superficie de oro a través de una cadena complementaria parcial modificada con tiol, (8) proteína enlazada a la superficie de oro a través de un enlace amida con 4-aminotiofenol, (9) ditiol, (10) PEG tiolado, (11) ácido mercaptopropiónico. Adaptada de Yüce y colaboradores.<sup>70</sup>

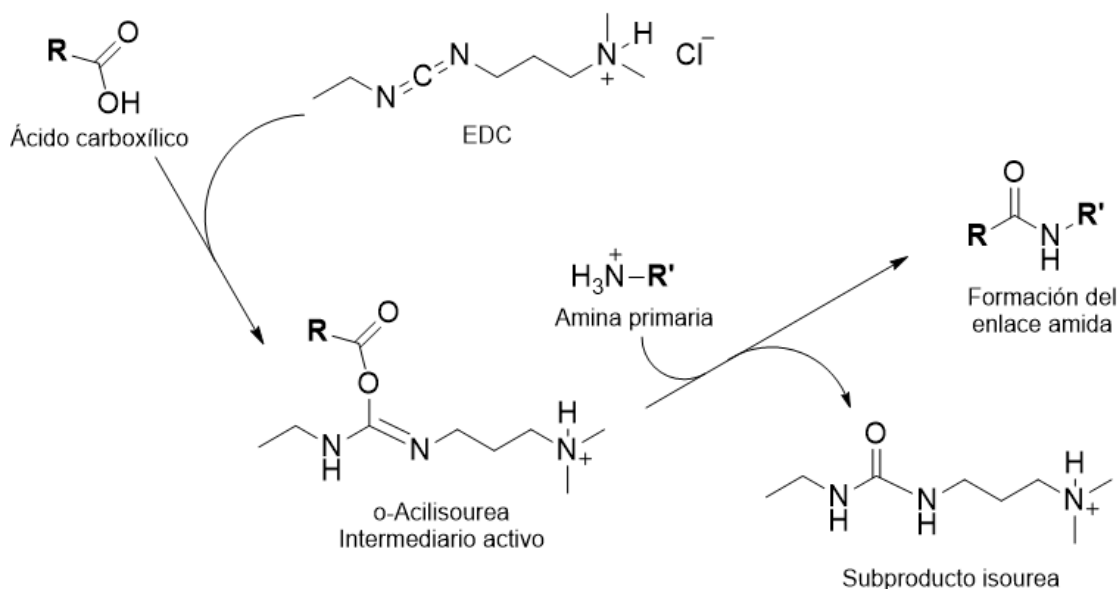
La formación del enlace Au-S no requiere de condiciones drásticas, incluso, en algunos casos, solo basta con mezclar las AuNP y el tiol por un tiempo determinado de incubación. Sin embargo, la fuerza de este enlace y la estabilidad de la AuNP

funcionalizada con la molécula tiolada depende de diversos factores como el pH de la solución, la concentración salina, el tiempo de incubación y el tipo de compuesto tiolado utilizado.<sup>71</sup>

### Modificación a través de la reacción con EDC-NHS

El acoplamiento con carbodiimida es uno de los métodos más comunes utilizados para modificar covalentemente grupos ácidos carboxílicos libres con aminas primarias, con el fin de funcionalizar una superficie. Las carbodiimidas son probablemente los entrecruzadores de longitud cero más utilizados, es decir, que una vez formado el enlace amida, la carbodiimida deja de formar parte de la molécula.<sup>72</sup> Estas moléculas básicamente se pueden clasificar en dos tipos: las solubles y las insolubles en agua. De estos dos, las solubles en agua son las más utilizadas para conjugaciones de biomoléculas, pues la mayoría de estas son solubles en agua, y dentro de este grupo, la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) es la más recurrente para este propósito.

La EDC puede reaccionar con el ácido carboxílico formando un intermediario muy reactivo, llamado *o*-acilisourea. Luego, este intermediario puede reaccionar con un nucleófilo, como una amina primaria ( $-\text{NH}_2$ ), para formar el enlace amida (Figura 21). Esta reacción es más efectiva en condiciones ácidas (pH 4.5-5.5) y, para que la conjugación sea selectiva, se deben utilizar buffers libres de amina como, por ejemplo, el buffer MES (ácido 4-morfolino-etano-sulfónico) o TBS (buffer Tris salino).

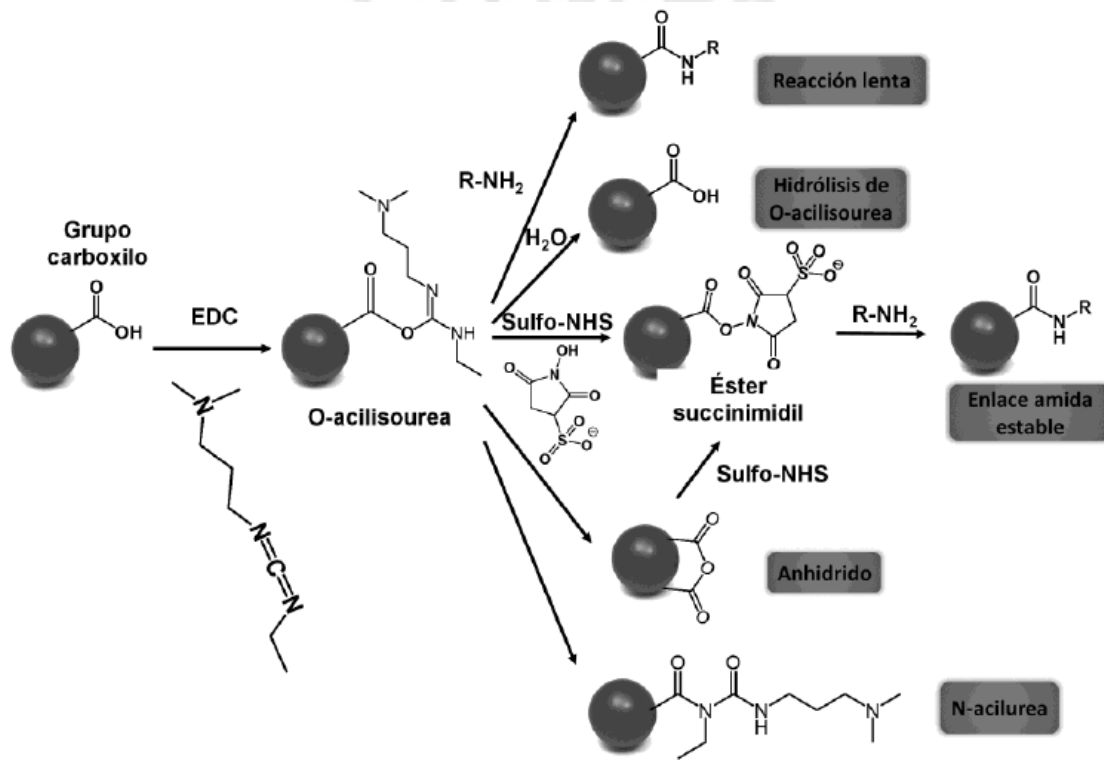


**Figura 21.** Mecanismo de reacción del EDC con un ácido carboxílico para la formación de la amida. Adaptada de Hermanson y colaboradores.<sup>72</sup>

El problema de esta reacción es que, durante la activación del ácido carboxílico, el intermediario *o*-acilisourea es susceptible a una hidrólisis rápida regenerando al grupo

carboxilo.<sup>73</sup> Este inconveniente se puede solucionar introduciendo *N*-hidroxisuccinimida (NHS) o su análogo más soluble en agua *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) junto con el EDC. Al introducir cualquiera de estos compuestos, luego de la formación del intermediario *o*-acilisourea, se produce la reacción de esta molécula con el NHS formando otro intermediario, éster succinimidil, más estable (hidrólisis más lenta) y con una mayor afinidad por las aminas primarias (Figura 22). De esta manera, se logra mejorar notablemente el rendimiento del acoplamiento.

A diferencia del acoplamiento con EDC, el éster succinimidil reacciona con aminas primarias bajo condiciones ligeramente alcalinas (pH 7.2-8.5). Como se mencionó anteriormente, esta conjugación se debe llevar a cabo en condiciones libre de aminas, sin embargo, el buffer TBS, así como otras aminas primarias, se pueden utilizar para el bloqueo de la reacción, es decir, el paso posterior al acoplamiento para desactivar los grupos carboxilos activados que no hayan reaccionado.



**Figura 22.** Esquema de reacción del acoplamiento de grupos  $-\text{COOH}$  y  $-\text{NH}_2$  con EDC y sulfo-NHS. Tomada de Hernández y colaboradores.<sup>74</sup>

Los ésteres succinimidil derivados del sulfo-NHS son similares a los de NHS a excepción del grupo sulfonato en el anillo *N*-hidroxisuccinimida. La carga que le otorga este grupo a la molécula no afecta a la química de la reacción de acoplamiento, pero sí incrementa la solubilidad del intermediario en medio acuoso. Adicionalmente, esta carga evita que las nanopartículas que se están funcionalizando agreguen, debido a que se mantiene la carga negativa que antes estaba dada por el grupo  $-\text{COO}^-$ .

Esta técnica es ampliamente utilizada para la funcionalización de nanopartículas, dado que muchas veces el surfactante presenta un grupo carboxilo y todas las proteínas (por ejemplo, los anticuerpos) contienen grupos aminos primarios en su estructura.<sup>68</sup>

## 4.2 Interacciones físicas

Otro método de conjugación importante es a través de las interacciones físicas o no covalentes. Estas principalmente están basadas en fuerzas intermoleculares como los enlaces puente de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, de apilamiento e hidrofóbicas. En base al grado de especificidad entre estas interacciones, se pueden clasificar en interacciones específicas y no específicas.

Dentro del grupo de las interacciones no específicas, se encuentran los métodos de adsorción de las biomoléculas sobre la superficie del nanomaterial. Este es uno de los métodos utilizados para inmovilizar anticuerpos sobre la superficie de las nanopartículas de oro. En este proceso de interacción entre AuNP y el Ab, participan principalmente las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.<sup>75</sup> La adsorción de anticuerpos sobre AuNP ya ha sido utilizada en la preparación de biosensores de CEA, por ejemplo, Liu y colaboradores<sup>76</sup> lo usaron para inmovilizar el Ab de CEA sobre AuNP en el sensor de detección por espectrometría de masas (MS) que desarrollaron. La principal desventaja de la conjugación por adsorción es el bajo control de la orientación de los anticuerpos adheridos a la superficie del nanomaterial, lo cual puede disminuir la sensibilidad del sensor.

Sin embargo, la técnica de adsorción no solo se utiliza para inmovilizar anticuerpos, sino que también para conjugar otras moléculas de interés como, por ejemplo, Chon y colaboradores<sup>52</sup> que funcionalizaron las nanoesferas huecas de oro con el reportador Raman 4,4'-dipiridil mediante adsorción.

Por otro lado, las interacciones físicas pueden también ser específicas como la hibridación de oligonucleótidos (combinación de dos cadenas de oligonucleótidos de secuencias complementarias para formar una doble cadena) o la interacción estreptavidina-biotina. Esta última técnica se discutirá con más detalle a lo largo de esta sección.

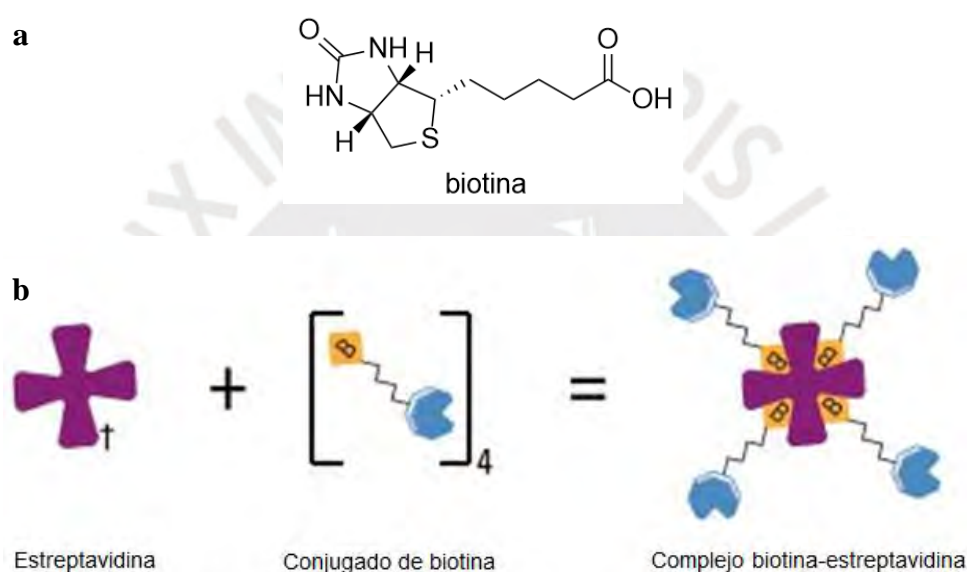
### Estreptavidina-biotina

La interacción no covalente entre (estrept)avidina y biotina es conocida como una de las interacciones no covalentes más fuertes en la naturaleza con una constante de disociación alrededor de  $10^{-14}$  mol.L<sup>-1</sup>.<sup>72</sup> La avidina es una glicoproteína que contiene cuatro subunidades idénticas de 16 400 Da cada una, y cada subunidad contiene un sitio de enlace para la biotina o vitamina H (Figura 23a) y una modificación de oligosacárido. La ventaja de esta proteína es su resistencia a la degradación incluso bajo condiciones extremas.

Tanto la fuerza del enlace no covalente entre avidina y biotina como su resistencia a desnaturalizarse, hacen de esta proteína una herramienta útil para la conjugación

química. Sin embargo, la única desventaja es su elevado punto isoeléctrico ( $pI = 10$ ), pues su carga positiva puede ocasionar interacciones no específicas del tipo iónicas con moléculas cargadas negativamente.

La estreptavidina, por otro lado, es similar a la avidina en cuanto al enlace con la biotina, es decir, contiene cuatro subunidades, cada una de ellas con un sitio de enlace de biotina (Figura 23b). Sin embargo, debido a las diferencias estructurales con la avidina, la estreptavidina puede superar la limitación de la avidina relacionada a las interacciones no específicas, pues presenta un punto isoeléctrico menor ( $pI$  5-6). Por otro lado, la estreptavidina, al igual que la avidina, también es robusta, es decir, puede tolerar un amplio rango de condiciones de buffer, pH y procesos de modificación química.



**Figura 23.** (a) Estructura de la biotina. (b) Esquema de la interacción biotina-estreptavidina. La estreptavidina puede enlazarse a cuatro moléculas de biotina las cuales pueden estar conjugadas con otras.<sup>77</sup>

La biotina, también conocida como vitamina H o vitamina B7, es una vitamina compuesta por un anillo ureido fusionado con un anillo tetrahidrotiofeno y un ácido valérico unido a uno de los carbonos de este último anillo (Figura 23a). El grupo carboxilo del ácido valérico de la biotina se puede conjugar con otras moléculas, como proteínas y aptámeros, con el fin de etiquetarlas para un posterior enlace con estreptavidina, tal como se muestra en la Figura 23b.

Para la construcción de nanobiosensores basados en la interacción biotina-estreptavidina, normalmente se comienza con la modificación de la superficie del nanomaterial con estreptavidina seguido de la incubación con la molécula que lleva la biotina para enlazarse al nanomaterial con estreptavidina.

Para el primer paso, la modificación del nanomaterial con estreptavidina, se pueden utilizar diferentes métodos. Por un lado, dependiendo de la superficie del nanomaterial, estas se pueden, simplemente, incubar junto con la estreptavidina en una solución buffer seguido de la eliminación de la proteína no enlazada del medio de reacción por centrifugación o filtración.<sup>78</sup> En este caso, la adsorción de la estreptavidina se puede explicar por interacciones electrostáticas, van der Waals, o puentes de hidrógeno.<sup>70</sup> Por otro lado, también se puede utilizar la química EDC/Sulfo-NHS para acoplar los grupos carboxilo del nanomaterial con las aminas de la estreptavidina.<sup>79</sup>

La interacción estreptavidina-biotina ha sido utilizada en el desarrollo de biosensores de CEA. Por ejemplo, Rong y colaboradores<sup>78</sup> utilizaron nanopartículas de oro modificadas con estreptavidina para incrementar la señal obtenida por SPR por medio de la interacción estreptavidina-biotina que solo ocurre en presencia del analito.

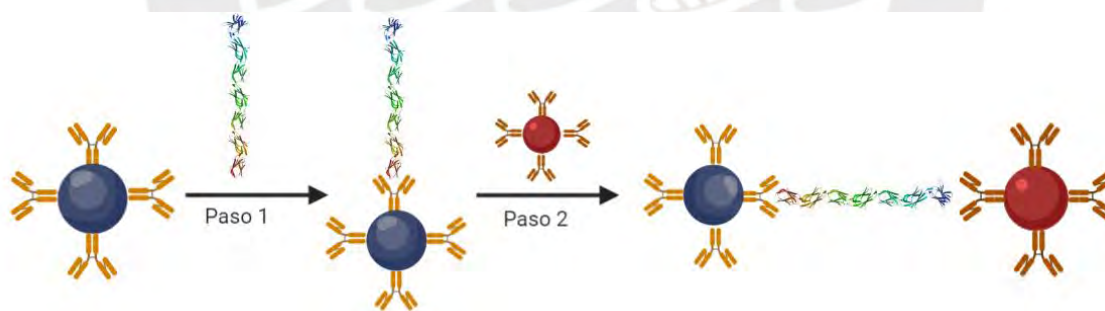




## 5 Estrategias de detección de CEA basados en nanopartículas

Las técnicas de detección juegan un papel importante en el descubrimiento y detección de biomarcadores para aplicaciones clínicas o relacionadas a investigación. Dentro de este aspecto, existen diferentes factores a tener en cuenta en el desarrollo de nanosensores de un biomarcador. Uno de ellos involucra la posibilidad de realizar el ensayo propuesto en fluidos corporales, como el suero, pues es la forma más directa de analizar el contenido de un biomarcador y el tipo de pruebas más utilizado clínicamente. La principal desventaja del uso de suero, como muestra de análisis, es la variedad y cantidad de componentes que contiene, además de los biomarcadores de interés. Por esta razón, se desea que el método de detección sea muy específico, sin perder sensibilidad.

La formación del complejo sándwich es la estrategia más empleada para la detección de biomoléculas grandes, como el CEA, que son capaces de unirse a, por lo menos, dos elementos de detección. Un ensayo que involucra la formación de este complejo precisa, principalmente, de dos elementos: (1) una superficie o nanomaterial (p.ej. MNP) modificado con un elemento de reconocimiento (anticuerpos o aptámeros) que captura y concentra al biomarcador en una muestra, y (2) un elemento de reconocimiento secundario que se une al biomarcador capturado en el paso anterior. Este elemento de reconocimiento secundario, en el caso de nanosensores, se encuentra en la superficie de un nanomaterial, el cual permite la obtención de una señal medible. En la Figura 24, se representa esquemáticamente el ensayo del tipo sándwich.



**Figura 24.** Representación esquemática del ensayo tipo sándwich.

En ese sentido, tanto para los ensayos del tipo sándwich como para otro tipo de ensayos, los nanomateriales han demostrado grandes ventajas en la detección de biomarcadores mejorando la sensibilidad o selectividad de los ensayos clínicos actuales.

En este capítulo, se mostrarán los avances en el desarrollo de nanosensores del antígeno carcinoembionario (CEA) que utilizan técnicas convencionales como la espectrometría de masas (MS), la detección eléctrica o electroquímica, y la detección óptica.

## 5.1 Espectrometría de masas

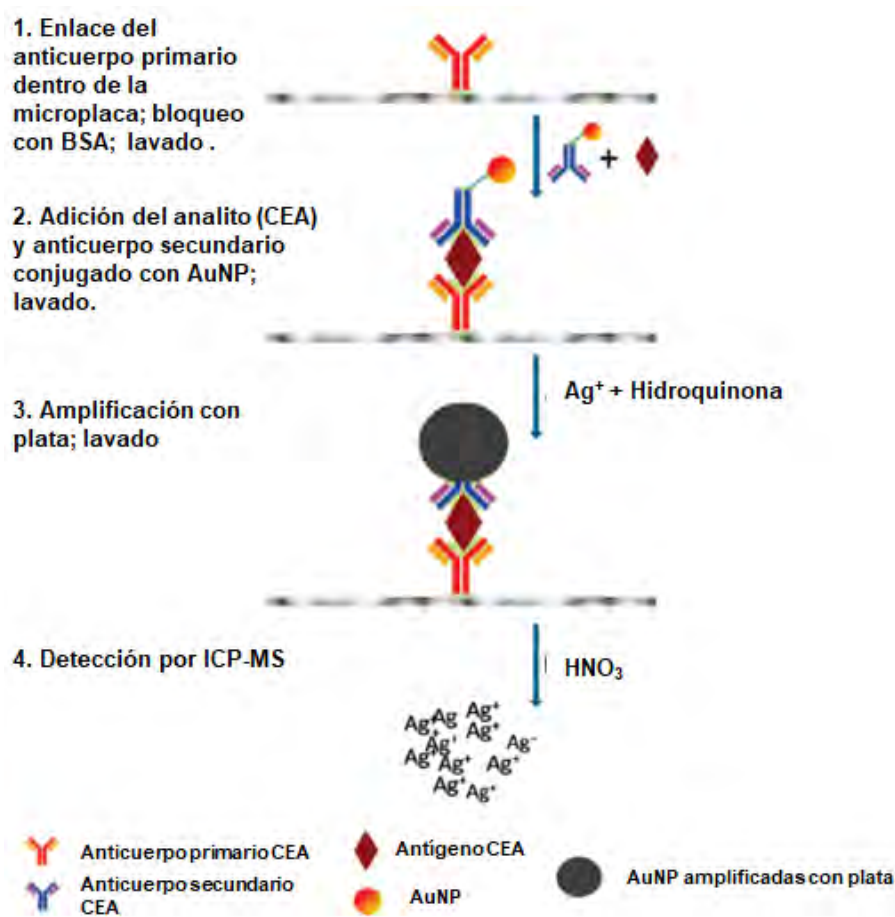
La detección directa de biomarcadores tumorales en muestras reales utilizando espectrometría de masas (MS) es dificultosa debido a su baja concentración y a la presencia de otras moléculas en el suero que pueden interferir en el análisis. Es por esto que en las investigaciones de los últimos veinte años se ha desarrollado técnicas de detección utilizando nanomateriales para asistir a las técnicas basadas en MS. En el caso de la detección de CEA, los nanomateriales han sido utilizados para amplificar la señal en la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico, elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar un amplio rango de metales y no metales. Las ventajas de esta técnica incluyen bajos límites de detección, bajo efecto de la matriz, amplios rangos dinámicos, y elevada resolución espectral para elementos e isótopos.<sup>80</sup>

Debido a estas ventajas, ICP-MS acompañado del etiquetado elemental del biomarcador por medio de un nanomaterial se puede utilizar como una técnica para el desarrollo de novedosos ensayos. ICP-MS, como método de detección, no requiere que las nanopartículas presenten características ópticas, magnéticas, electroquímicas u otra propiedad especial, dado que los iones metálicos resultantes de estas son detectados directamente. Una ventaja adicional de este tipo de método es la obtención de una elevada sensibilidad por el uso nanopartículas como etiqueta en lugar de iones metálicos debido a las grandes cantidades de átomos en cada nanopartícula.<sup>81</sup>

Rui Lui y colaboradores<sup>76</sup> diseñaron un sensor de CEA basándose en el principio mencionado anteriormente. Este es un inmunoensayo del tipo sándwich en el cual se utilizaron dos anticuerpos para capturar y detectar el analito, y cuyo procedimiento a modo de esquema se muestra en la Figura 25. El anticuerpo primario se adsorbe en la superficie de la microplaca; mientras que el secundario se encuentra adsorbido en las nanopartículas de oro (AuNP). El anticuerpo secundario se añade junto con el analito a la microplaca y luego de los lavados correspondientes, se realiza la amplificación de la señal utilizando la superficie de las AuNP como catalizador de la reducción de  $\text{Ag}^+$ . De esta forma, la amplificación solo ocurre en los anticuerpos secundarios que formaron el complejo sándwich con el CEA. Después, la capa de plata se disuelve en  $\text{HNO}_3$  para liberar los iones  $\text{Ag}^+$  depositados, los cuales posteriormente se detectaron por ICP-MS.

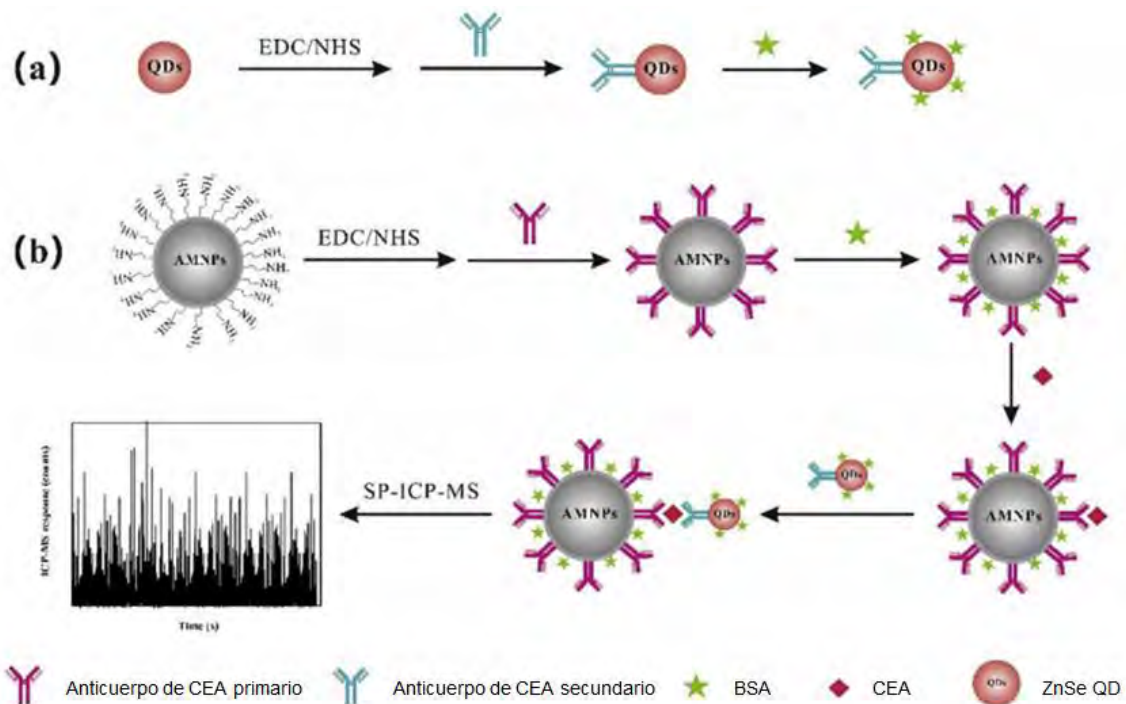
Este método permite la cuantificación de CEA en un rango de 0.07 – 1000 ng/mL con un límite de detección de 0.03 ng/mL. La relevancia de este estudio radica en que es el primero que utiliza nanosensores e ICP-MS para la detección de CEA basándose en la estrategia sándwich de ELISA consiguiendo límites de detección 60 veces más bajos que la técnica convencional.



**Figura 25.** Diagrama esquemático del inmunoensayo sándwich y amplificación con plata para la detección de CEA con AuNP funcionalizadas con Ab. Adaptada de Liu y colaboradores.<sup>82</sup>

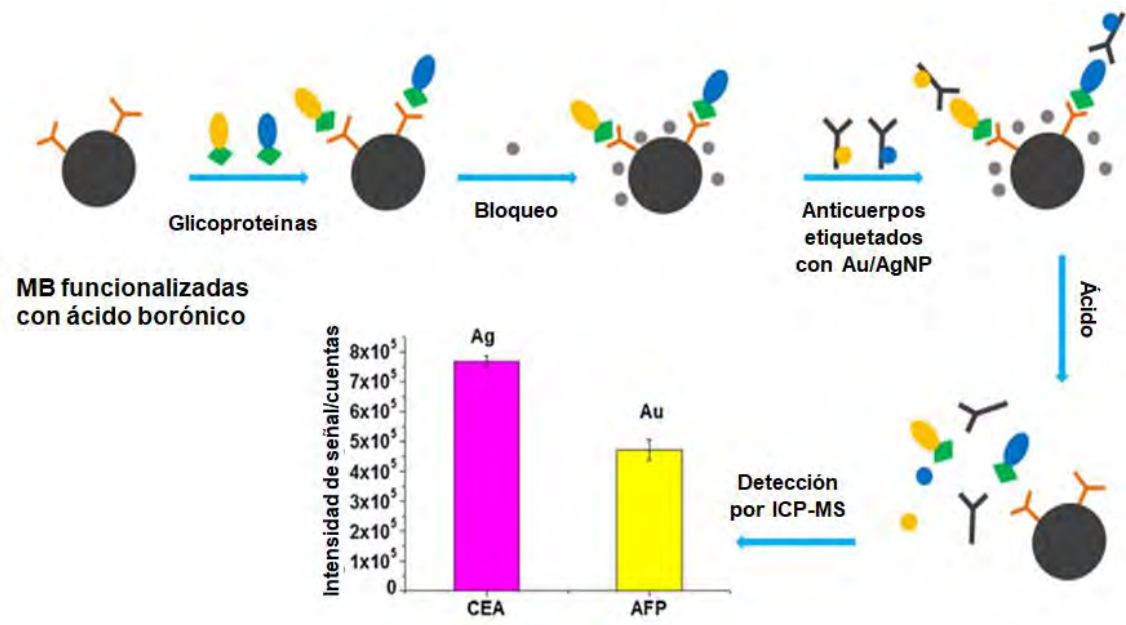
ICP-MS no solo se ha utilizado en conjunto con nanopartículas de metales nobles para la detección de CEA, sino que además se han fabricado sensores utilizando otro tipo de nanomateriales como puntos cuánticos (QD) o nanopartículas magnéticas (MNP).

En el nanosensor diseñado por Cao y colaboradores,<sup>83</sup> se combinan estos dos últimos nanomateriales. Las MNP funcionalizadas con el anticuerpo primario de CEA permiten extraer el CEA de la matriz. Mientras que los QD de ZnSe funcionalizados con el anticuerpo secundario se utilizaron como etiqueta para determinar la concentración de CEA indirectamente por ICP-MS (Figura 26). La técnica para la detección de los QD es ICP-MS en el modo *single particle* (SP-ICP-MS) en la cual se pueden introducir directamente los QD sin necesidad de disolverlos, pues lo que se detecta no son los iones resultantes, sino los QD. Las ventajas de esta variante sobre ICP-MS convencional son su elevada exactitud y precisión en la detección de nanopartículas en soluciones heterogéneas. El uso de esta nueva técnica (SP-ICP-MS) y la captura selectiva de CEA por medio de las MNP contribuyeron a la obtención de un límite de detección más bajo que el sensor anterior (LOD = 0.006 ng/mL) y un amplio rango lineal de 0.02 – 100 ng/mL.



**Figura 26.** (a) Síntesis del ZnSe funcionalizado con el anticuerpo secundario de CEA; (b) Inmunoensayo magnético del tipo sándwich utilizando nanopartículas magnéticas y QD de ZnSe. Adaptada de Cao y colaboradores.<sup>83</sup>

Otra de las ventajas de ICP-MS que puede aprovecharse en el desarrollo de sensores es su capacidad de llevar a cabo detecciones multielementales marcando cada biomarcador con nanopartículas de metales diferentes, por ejemplo. Teniendo esto en cuenta, Zhang y colaboradores<sup>84</sup> desarrollaron un nanosensor para la cuantificación simultánea de glicoproteínas, dos biomarcadores glicoproteicos de prueba: el CEA y la alfa-fetoproteína (AFP). Para conseguirlo, utilizaron perlas magnéticas (MB) funcionalizadas con ácido borónico para la captura de las dos glicoproteínas, y AuNP y AgNP funcionalizadas con anticuerpos selectivos para el etiquetado elemental. De esta forma, la cantidad de iones plata u oro detectados por ICP-MS se pueden correlacionar con la concentración de cada una de las glicoproteínas analizadas (Figura 27). Los límites de detección obtenidos fueron de 0.086 ng/mL para AFP y 0.054 ng/mL para CEA y un rango lineal para ambos de 0.2 - 50 ng/mL.



**Figura 27.** Esquema del inmunoensayo desarrollado por Zhang y colaboradores. Adaptada de Zhang y colaboradores.<sup>84</sup>

Las ventajas que MS ofrece han permitido la fabricación de nanosensores de CEA bastante sensibles, de amplio rango dinámico y bastante precisos. Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones como un elevado costo de instrumentación o falta de portabilidad. Por estas razones, se suele optar por la fabricación de nanosensores que utilicen técnicas alternativas como detecciones eléctricas u ópticas.

## 5.2 Detección eléctrica y electroquímica

Otra estrategia importante para la detección de biomarcadores tumorales es la basada en la detección eléctrica o electroquímica. La detección electroquímica es muy popular debido a sus características extraordinarias que incluyen alta sensibilidad, un bajo costo, compatibilidad con estrategias modernas del tipo laboratorio en un chip, y un pretratamiento de muestra poco exhaustivo (la medición no está afectada por el color o la turbidez de la muestra).<sup>85</sup> Por estas razones, la detección electroquímica resulta bastante atractiva para el desarrollo de novedosos nanosensores.

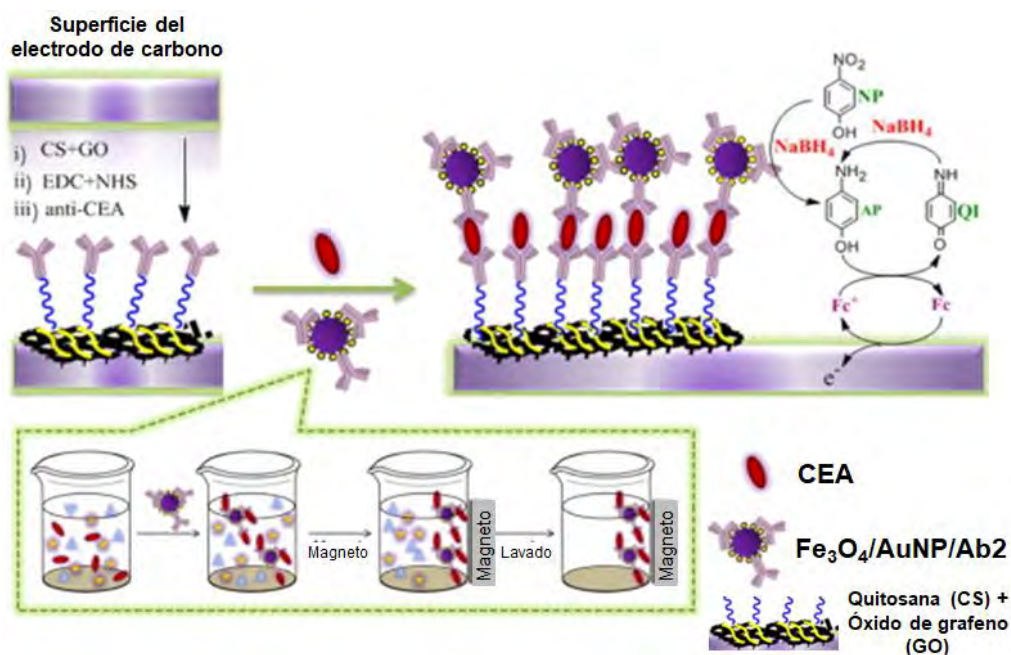
El principio básico de los nanosensores electroquímicos es una reacción química en la cual se liberan electrones, o se aceptan o consumen iones.<sup>86</sup> Esta reacción se lleva a cabo entre un ligando restringido y un analito de interés que afecta de forma medible la señal transducida, como la corriente eléctrica o el potencial. Esta señal se cuantifica directamente y se relaciona con la presencia del analito de interés en la solución. Las detecciones electroquímicas presentan diferentes subtipos dependiendo del tipo de señal analizada como potenciometría, voltametría, amperometría, y espectroscopía de impedancia electroquímica, de las cuales la más común es la voltametría.

Los métodos voltamétricos requieren sistemas electroquímicos de dos o tres electrodos junto con un potenciostato, los cuales permiten la aplicación del potencial y la medida de la corriente obtenida. Para esta técnica, la estructura de la superficie del biosensor debe estar diseñada cuidadosamente para que el reconocimiento del analito sea específico y suprima cualquier tipo de interacción no específica.<sup>87</sup>

Dentro de las técnicas voltamétricas, se encuentran la voltametría cíclica (CV), la voltametría de barrido lineal, la voltametría de pulso diferencial (DPV), y la voltametría de onda cuadrada.<sup>87</sup>

En la mayoría de nanosensores electroquímicos, se busca la unión del transductor, un nanomaterial en este caso, con el electrodo en presencia del analito, lo que finalmente genera la señal electroquímica que se mide y relaciona directamente con la concentración del analito. Con este fin, la estrategia más utilizada es la formación del complejo sándwich entre el electrodo y el nanomaterial. Sin embargo, como se discutirá en uno de los estudios presentados en esta sección, esta estrategia no es la única.

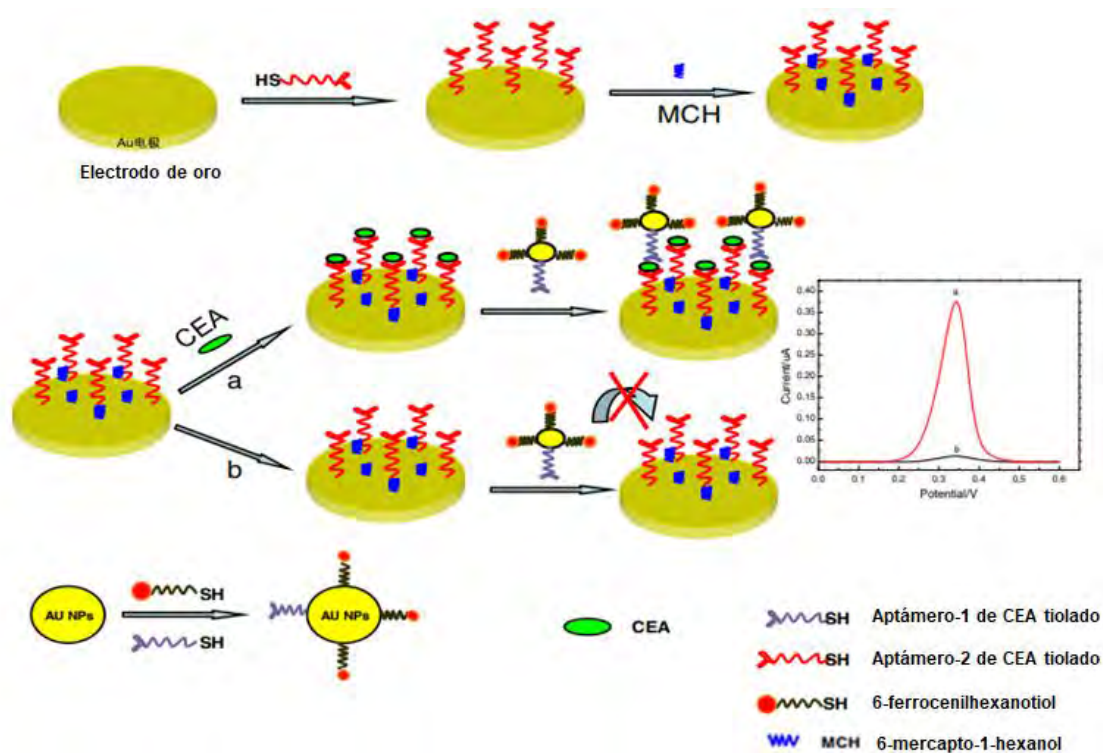
En un estudio, Peng y colaboradores<sup>88</sup> desarrollaron un sensor voltamétrico para CEA que utiliza como técnica de detección CV. Este sensor se basa en un mecanismo de amplificación de señal que resulta de la participación de nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas con AuNP y una plataforma de detección de grafeno/quitosana-ferroceno (Figura 28). En esta plataforma, se inmovilizan los anticuerpos primarios, mientras que  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AuNP}$  se funcionaliza con los anticuerpos secundarios. De esta manera, solo en presencia del analito, se logra formar el complejo sándwich y la cantidad de nanopartículas de oro presentes en la plataforma de detección es proporcional a la concentración de CEA. La determinación sensible de CEA en este sensor se consigue por la reducción catalítica de *p*-nitrofenol (NP) a *p*-aminofenol (AP) utilizando las AuNP como etiquetas y catalizadores. Luego, el AP se oxida a *p*-quinona imina (QI) por el ion ferroceno generado electroquímicamente. Finalmente, se utiliza  $\text{NaBH}_4$  para reducir QI a AP, el cual se puede oxidar de nuevo. Mediante la amplificación basada en esta reacción cíclica redox del AP, se logra incrementar la señal en un factor de 10 a comparación del sensor sin el etiquetado con  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AuNP}$ . Con este método, se consiguió un amplio rango lineal de 0.001 – 30 ng/mL y un bajo límite de detección de 0.39 pg/mL.



**Figura 28.** Esquema de la preparación del inmunosensor y principio de la detección electroquímica. Adaptada de Peng y colaboradores.<sup>88</sup>

Por otro lado, Shu y colaboradores<sup>89</sup> desarrollaron un sensor electroquímico del tipo sándwich que también utiliza AuNP para amplificar la señal electroquímica. Lo novedoso de este sensor es el uso de dos aptámeros para la formación del sándwich de CEA entre un electrodo de oro modificado con el primer aptámero tiolado de CEA (Apt 1) y las AuNP con el segundo aptámero tiolado de CEA (Apt 2) y 6-ferrocenil hexanotiol (Fc), tal como se muestra en la Figura 29. La detección amperométrica de Fc se lleva a cabo mediante voltametría de pulso diferencial (DPV) la cual permite cuantificar la concentración de CEA. Este nanoaptasensor del tipo sándwich posee un rango lineal desde 1 a 200 ng/mL con un límite de detección de 0.5 ng/mL. Además, el uso de aptámeros para formar el sándwich, ofrece las ventajas de estas biomoléculas sobre los anticuerpos mencionadas en la sección 3.2.

Recientemente, la idea del sándwich de aptámeros fue retomada por Shekari y colaboradores<sup>90</sup> para desarrollar un aptasensor electroquímico del tipo sándwich de CEA utilizando AuNP y puntos cuánticos de grafeno con el fin de mejorar la sensibilidad y la biocompatibilidad. De esta forma, lograron obtener incluso mejores rangos lineales (10.0 fg/mL – 200.0 ng/mL) y límites de detección (3.2 fg/mL) que demuestra que mediante la estrategia del sándwich de aptámeros se pueden diseñar sensores que sean tan o más sensibles que los sensores a base de anticuerpos. Por esta razón, se espera un mayor empleo de este tipo de aptámeros en investigaciones futuras.



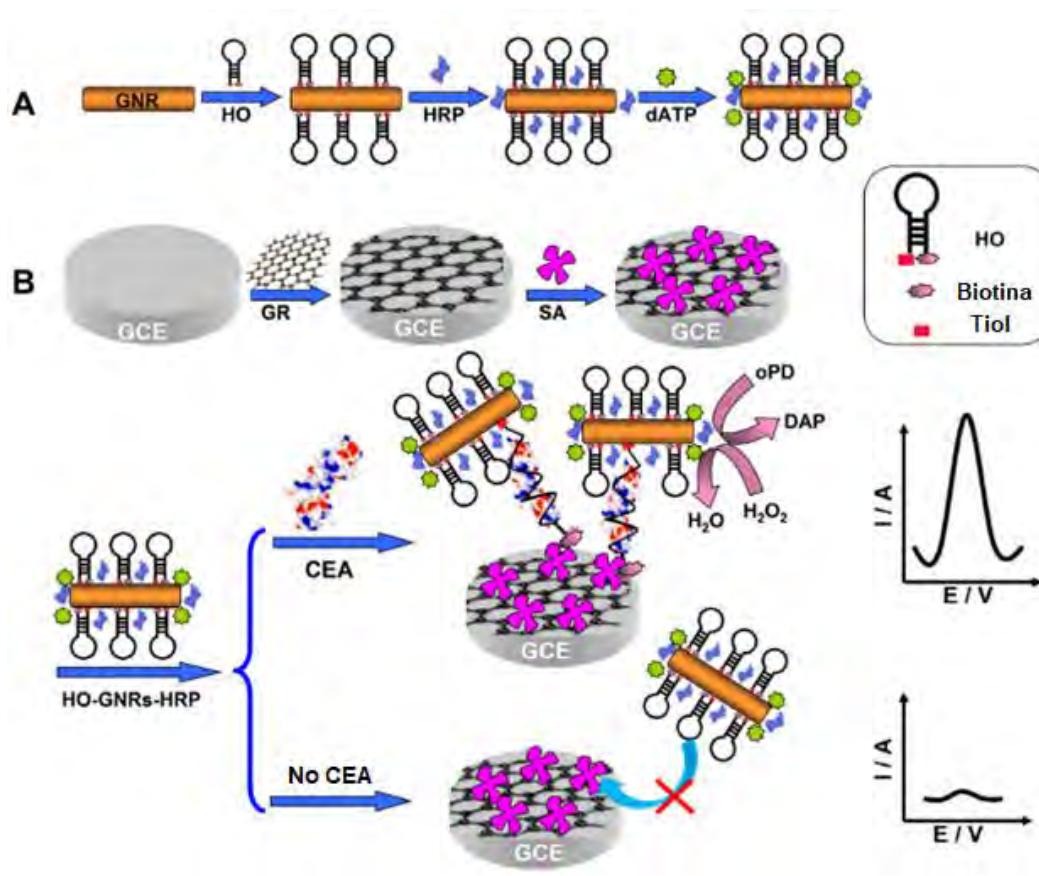
**Figura 29.** Diagrama sobre la detección electroquímica del nanoaptasensor basado en la amplificación de señal por medio de AuNP para la detección de CEA. Adaptada de Shu y colaboradores.<sup>89</sup>

Si bien es cierto que la mayoría de técnicas electroquímicas son del tipo sándwich, se pueden diseñar otras estrategias de detección que se basen en el uso de otra de las características de los bioreceptores. Una de estas opciones es aprovechar los cambios conformacionales inducidos en los aptámeros (p.ej. aptámeros horquilla) por la interacción con el analito para generar una respuesta medible.

En ese sentido, el nanosensor de Wen y colaboradores<sup>63</sup> aprovecha las características de los aptámeros horquilla. Para construir este nanosensor, se utilizaron nanovarillas de oro (GNR) funcionalizadas con el aptámero horquilla de CEA biotinilado en el extremo 3' y tiolado en el extremo 5' (HO), como transportadoras de la peroxidasa de rábano (HRP). Cuando el conjugado (HO-GNR-HRP) se encuentra en presencia del analito, la interacción del CEA con el aptámero ocasiona la apertura de la estructura horquilla del aptámero exponiendo a las biotinas. De esta manera, este conjugado es capturado en el electrodo de grafeno modificado con estreptavidina, debido a la interacción biotina-estreptavidina. Finalmente, la acumulación de HRP cerca al electrodo cataliza la oxidación mediada por peróxido de hidrógeno de la *o*-fenildiamina, de forma que se genera una corriente de reducción electroquímica (medida por DPV) que se puede correlacionar con la concentración de CEA (Figura 30). Se determinó que este sensor presenta un rango lineal de 5 pg/mL hasta 50 ng/mL y un límite de detección de CEA de 1.5 pg/mL, y además muestra una buena correlación con técnicas clínicas estándar al realizar los ensayos con muestras reales.



Es importante resaltar que en este estudio los aptámeros horquilla cumplen, potencialmente, el rol de los dos tipos de anticuerpos utilizados en los sensores basados en la formación del inmunocomplejo sándwich. Esto sumado a las ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos vuelve atractivo el uso de estas moléculas. Por estas razones, se espera el diseño de nanosensores que aprovechen las ventajas que ofrecen los aptámeros horquilla en investigaciones futuras.



**Figura 30.** (A) Fabricación del conjugado HO-GNR-HRP. (B) Esquema del ensamblaje del electrodo y estrategia de detección de CEA. Adaptada de Wen y colaboradores.<sup>63</sup>

El uso de los nanomateriales, especialmente de metales nobles, como amplificadores de señal o transportadores de otras moléculas ofrece ventajas en la detección electroquímica. Sin embargo, la principal limitación de los nanosensores electroquímicos es que presentan dificultades al llevar a cabo la detección en soluciones fisiológicas, en concreto, en presencia de concentraciones elevadas de sales. Dado que es un sistema de detección electrónica, depende de la presencia y diferencia de cargas, entonces las soluciones tampón de diferentes sales pueden interferir con la interacción de la carga y esto puede afectar la sensibilidad del nanosensor.<sup>91</sup> Pese a ello, estas limitaciones se superaron con éxito en los estudios descritos en esta sección, mediante procedimientos previos de separación y aislamiento del analito.

Adicionalmente, debido a las tendencias en la miniaturización de los electrodos, se espera que, en investigaciones futuras, se adapten este tipo de sensores a la modalidad laboratorio en un chip.

### **5.3 Detección óptica**

La detección óptica utilizando nanosensores presenta como una de sus principales ventajas una elevada sensibilidad debido a las interacciones únicas entre la luz y los nanomateriales. Los nanosensores ópticos, dependiendo del diseño y del nanomaterial, pueden llevar a cabo el proceso de detección mediante diferentes métodos como fluorescencia, quimioluminiscencia, espectroscopía de absorción, resonancia del plasmón superficial (SPR), resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR) y espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS). La sensibilidad de estos sensores está fuertemente relacionada con el modo de detección de los fenómenos ópticos.

En esta sección, se mostrarán los nanosensores ópticos de CEA que utilizan alguno de los métodos de detección mencionados anteriormente. Además, se discutirán el diseño del nanosensor, las ventajas y las desventajas de cada una de las técnicas.

#### **5.3.1 Fluorescencia y quimioluminiscencia**

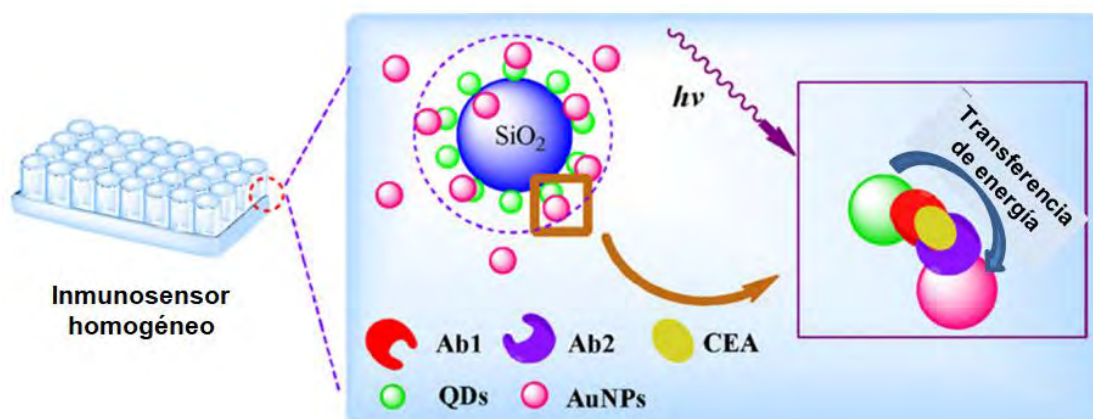
##### **Fluorescencia**

Generalmente, en los métodos de detección basados en fluorescencia se utilizan fluoróforos orgánicos. Sin embargo, la obtención de bajos límites de detección utilizando estas moléculas puede ser difícil debido a su bajo rendimiento cuántico, su rápida fotodesactivación y su fácil agregación. Para superar estas limitaciones, se utilizan diferentes tipos de nanomateriales, siendo los más comunes los QD que permiten detecciones más estables, sensibles y precisas debido a sus propiedades, descritas en la Sección 2.2.

Una de las estrategias de detección por fluorescencia asocia la interacción entre el analito y el bioreceptor con un fenómeno de transferencia de energía a nanoescala. A esta transferencia no radiativa de energía, desde un donador excitado a un aceptor, se la conoce como transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). En ese sentido, se puede utilizar el par QD-AuNP como donador-aceptor para aprovechar el fenómeno FRET en el diseño de nanosensores.

En un estudio, Qian y colaboradores<sup>48</sup> desarrollaron un inmunoensayo basado en FRET entre el par AuNP-QD para la detección fluorimétrica de CEA. El ensayo consiste en utilizar nanoesferas de SiO<sub>2</sub> recubiertas con QD de CdTe funcionalizados con el anticuerpo policlonal de CEA como donadores, y AuNP funcionalizadas con el anticuerpo monoclonal de CEA como aceptores. En presencia del analito CEA, se forma el inmunocomplejo del tipo sándwich entre los QD y las AuNP acercándolos lo suficiente como para desactivar la fotoluminiscencia de los QD (Figura 31). Posteriormente, las variaciones fluorimétricas observadas se pueden relacionar con la

concentración de CEA presente en la muestra, llegando a un rango lineal de 1 ng/mL hasta 110 ng/mL y un límite de detección de CEA de 0.3 ng/mL.

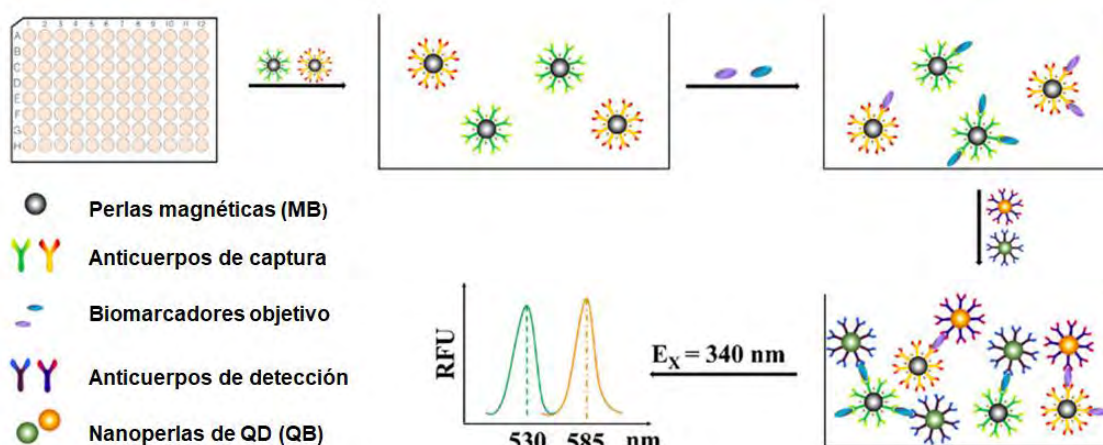


**Figura 31.** Representación esquemática de la estrategia de detección fluorimétrica basada en FRET. Adaptada de Qian y colaboradores.<sup>48</sup>

Por otro lado, los QD se pueden utilizar para detección fluorimétrica de forma más directa, separando el inmunocomplejo de QD con el analito, de manera que la fluorescencia del QD medida es directamente proporcional a la concentración del analito. Además, se puede aprovechar la facilidad de modular el espectro de emisión de los QD con el tamaño, para la detección simultánea de más de un biomarcador etiquetándolos con diferentes QD.

Este tipo de detección se llevó a cabo, recientemente, en el estudio realizado por Ding y colaboradores<sup>92</sup> en el cual desarrollaron un método de detección simultánea de CEA y del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA21-1), otro biomarcador de cáncer pulmonar de células no pequeñas. Este inmunoensayo fluorimétrico está basado en perlas magnéticas (MB) para la separación de los analitos; y dos tipos de nanopérlas de puntos cuánticos de CdSe/ZnS (QB, *i.e.* QD encapsulados en un polímero) con emisión máxima a 530 nm y 585 nm como etiquetas del analito respectivo. Las QB presentan algunas propiedades iguales que los QD, tales como un amplio espectro excitación, estrechos espectros emisión y longitudes de onda de emisión sintonizables cambiando el tamaño de los QD envueltos en las QB. Sin embargo, a comparación de los QD, las QB son más estables en una matriz compleja y presentan una fluorescencia más intensa<sup>93</sup>, lo que las convierte en elementos ideales para este tipo de ensayos. Cada uno de los tipos de QB se funcionaliza con el anticuerpo correspondiente: el de CEA o el de CYFRA21-1. Las perlas magnéticas funcionalizadas con los anticuerpos de CYFRA21-1 y CEA se utilizan para aislar los correspondientes analitos. Luego de la formación y separación de los inmunocomplejos sándwich, se miden las intensidades de emisión de los diferentes QB bajo una misma longitud de onda de excitación de 340 nm (Figura 32). Los límites de detección obtenidos fueron de 0.1 ng/mL para CEA y 0.2 ng/mL para CYFRA21-1, y un rango lineal para ambos biomarcadores de 0.2 - 128 ng/mL. Además, este método

permitió la detección exitosa de estos dos biomarcadores en simultáneo en muestras reales de suero humano.

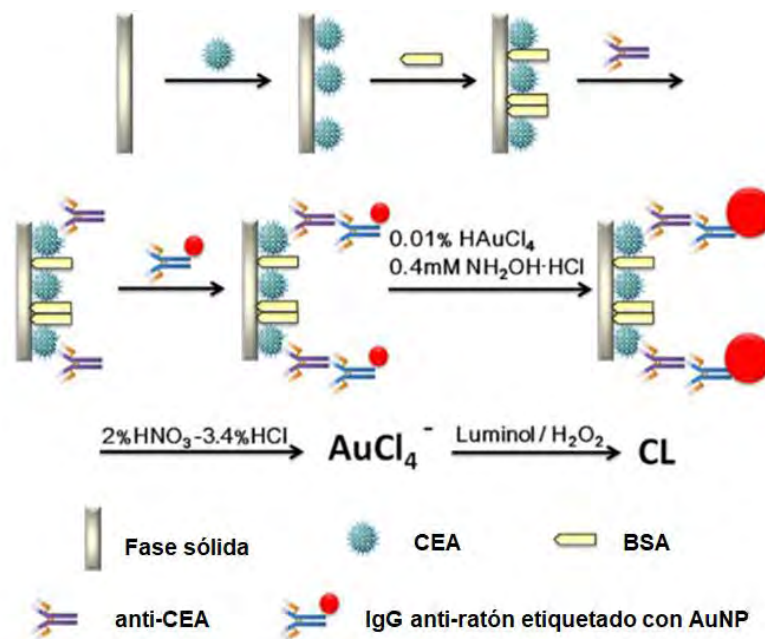


**Figura 32.** Representación esquemática de la determinación simultánea de CEA y CYFRA21-1 basado en el uso de QB y MB. Adaptada de Ding y colaboradores.<sup>92</sup>

### Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia (CL) es una técnica óptica que consiste en la emisión de fotones como resultado de una reacción química. La principal ventaja de esta técnica, a comparación de la fluorescencia y otras técnicas ópticas, es que no requiere una fuente externa de luz. Para el desarrollo de técnicas de este tipo, se han explorado otras propiedades de las nanopartículas como, por ejemplo, las AuNP como portadoras de  $\text{AuCl}_4^-$  que catalizan la reacción quimioluminiscente de luminol con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En ese sentido, Hao y colaboradores<sup>94</sup> aprovecharon esta característica de las AuNP para amplificar las señales quimioluminiscentes en un inmunoensayo desarrollado en el cual, el CEA de la muestra se inmoviliza en la superficie de una microplaca y luego se marca con el anticuerpo primario de CEA. Posteriormente, el anticuerpo unido al CEA se etiqueta con AuNP funcionalizadas con un anticuerpo secundario que reconoce la región constante del anticuerpo primario. Después, la amplificación por crecimiento de las AuNP se realiza utilizando la superficie de la AuNP como catalizador de la reducción del  $\text{Au}^{3+}$  añadido. La posterior adición de ácido disuelve las AuNP, y el  $\text{AuCl}_4^-$  formado se separa de la mezcla de reacción y se utiliza para medir la concentración de CEA indirectamente, dado que el  $\text{AuCl}_4^-$  cataliza la reacción entre el luminol y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dando lugar a un producto luminiscente (Figura 33). Así, la intensidad quimioluminiscente obtenida mediante este ensayo está correlacionada directamente con la concentración de CEA y permite determinar concentraciones de CEA en el rango de 100 pg/mL a 1000 ng/mL con un límite de detección de 20 pg/mL.

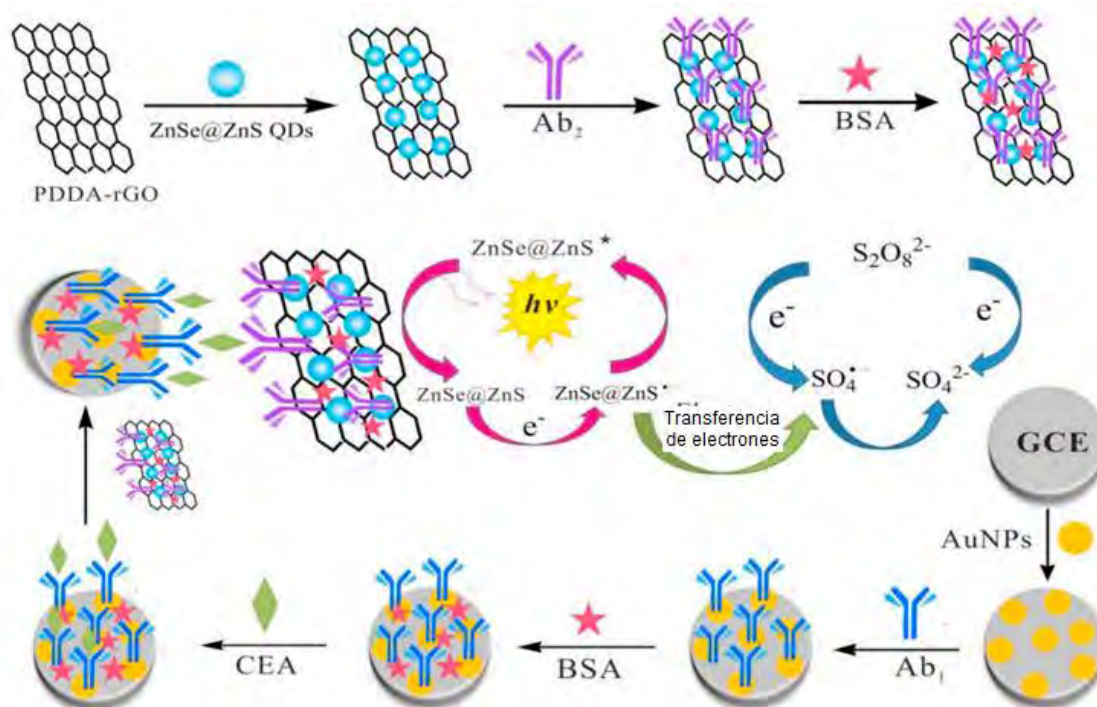


**Figura 33.** Representación del inmunoensayo basado en quimioluminiscencia para la detección de CEA. Adaptada de Hao y colaboradores.<sup>94</sup>

Una técnica derivada de CL es la electroquimioluminiscencia (ECL) que se basa en la emisión de luz generada por una reacción de transferencia de electrones entre moléculas generadas electroquímicamente. Esta técnica presenta algunas ventajas sobre CL. En primer lugar, ECL permite controlar el tiempo de la reacción de emisión de luz, es decir, permite retardar esta reacción hasta que ocurran ciertos eventos como la formación del complejo sándwich. En segundo lugar, ECL puede ser una técnica más sensible que CL dado que en ECL se pueden realizar procesos cíclicos redox de amplificación; y, en tercer lugar, se pueden obtener dos tipos de señales: la intensidad de corriente y la luminosa, lo que permite estudiar los mecanismos de emisión de luz.<sup>95</sup>

Recientemente, Zheng y colaboradores<sup>96</sup> reportaron un nanosensor basado en un compuesto de QD de ZnSe/ZnS para la detección de CEA por ECL. En el diseño de este nanosensor, se utilizaron tres nanomateriales: QD, AuNP y óxido de grafeno reducido (rGO). El compuesto de QD está formado por rGO recubierto por cloruro de poli(dialildimetilamonio) (PDDA) sobre el cual se adsorben los QD por interacción electrostática, que, posteriormente, se funcionalizan con el anticuerpo secundario de CEA (Ab2) (Figura 34). En este material compuesto, los QD son los luminóforos mientras que el rGO-PDDA se utiliza como transportador de los QD y por su elevada conductividad eléctrica. Por otro lado, el electrodo se modifica con AuNP, y luego se funcionaliza con el anticuerpo primario de CEA (Ab1). Las AuNP se utilizan por su amplia área superficial y conductividad eléctrica que permite incrementar las señales electroquimioluminiscentes cuando se forma complejo sándwich. El proceso de detección se muestra de forma esquemática en la Figura 33. La muestra se añade al electrodo para la captura de CEA por medio del Ab1, y luego se agrega el compuesto para la formación del complejo sándwich. Posteriormente, se genera la emisión de

fotones de los QD por ECL utilizando persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) como correactante. En este proceso, el cátodo produce especies electroactivas del QD y el  $S_2O_8^{2-}$  que reaccionan entre sí generando  $ZnSe/ZnS^*$  en estado excitado el cual, al regresar al estado basal, emite fotones cuya intensidad está relacionada con la concentración de CEA. Mediante este ensayo, se determinó un límite de detección de 0.029 pg/mL y un amplio rango lineal de 0.0001 – 100 ng/mL.



**Figura 34.** Fabricación del inmunosensor del tipo sándwich y proceso de detección electroquimioluminiscente de CEA. Adaptada de Zheng y colaboradores.<sup>96</sup>

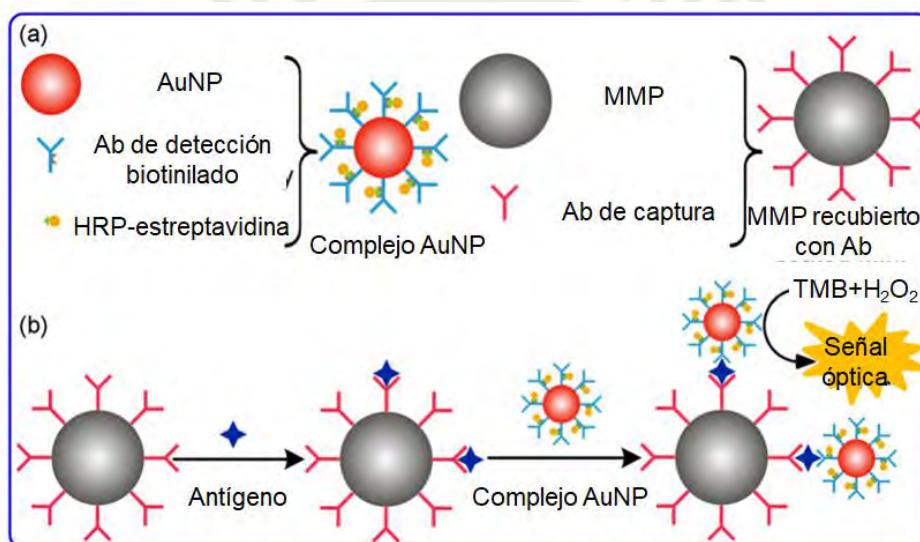
### 5.3.2 Detección colorimétrica

Las técnicas colorimétricas han captado mucho la atención en el desarrollo de nanosensores debido al bajo costo en los equipos de lectura y la capacidad de inspección visual. Esto último hace referencia a que los cambios de color, debido a la respuesta del nanosensor en presencia del analito, se pueden interpretar a simple vista. Debido a la simplicidad en la operación y portabilidad del sensor, este tipo de sensores presentan el potencial de poder utilizarse como métodos de detección comerciales.

Los nanosensores colorimétricos principalmente contienen nanopartículas de oro (AuNP) y/o enzimas que generan respuestas colorimétricas como la peroxidasa de rábano (HRP). Así, aprovechando la elevada relación área-volumen, las AuNP se pueden utilizar como portadoras de estas enzimas para amplificar la señal colorimétrica que estas generan.

Liu y colaboradores<sup>97</sup> aprovecharon esta estrategia en el desarrollo de un inmunoensayo colorimétrico enzimático. En este método, se emplean AuNP funcionalizadas con el

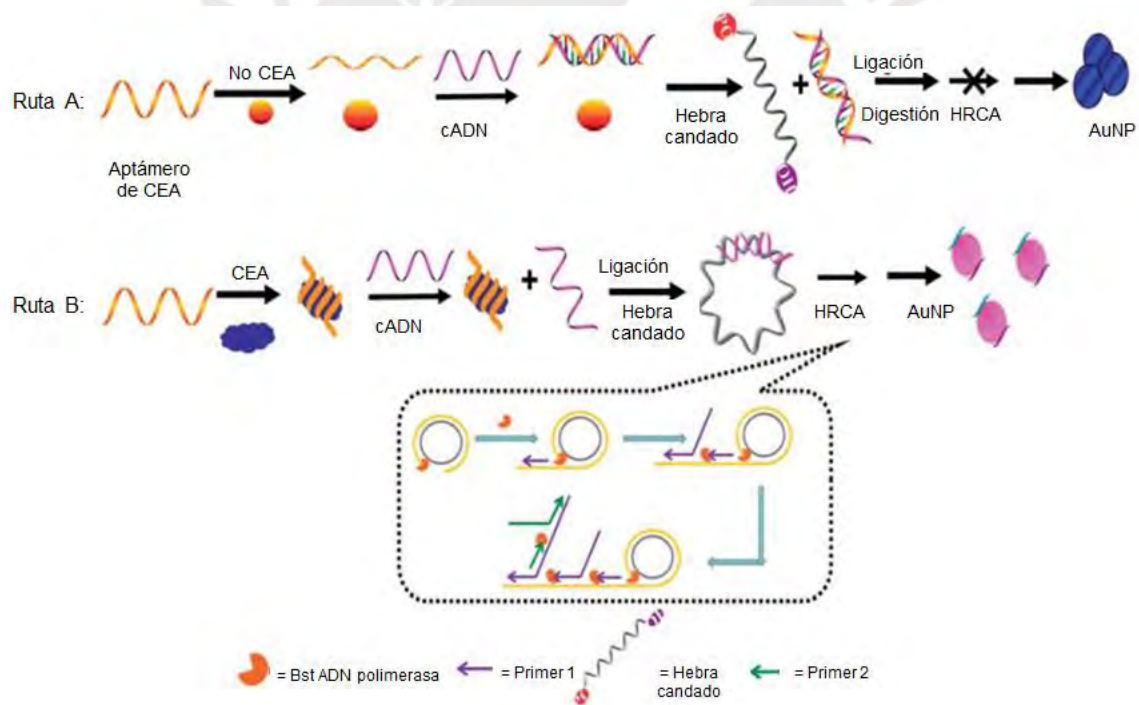
anticuerpo de CEA etiquetado con biotina, la cual sirve como un punto de anclaje para una posterior conjugación con la peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (esptreptavidina-HRP) (Figura 35a). En el primer paso, se utilizan micropartículas magnéticas (MMP) funcionalizadas con el anticuerpo de CEA que capturan el analito. Luego, la adición del complejo AuNP-antiCEA-HRP induce la formación del complejo sándwich que, posteriormente, se aísla mediante separación magnética (Figura 35b). Como resultado de este proceso, las HRP que quedan atrapadas en el complejo sándwich se utilizan para catalizar la reacción entre el sustrato 3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y el peróxido de hidrógeno, dando lugar a un compuesto coloreado cuya absorbancia a 450 nm se registra para la cuantificación. Mediante este ensayo, se consiguió una amplificación de señal colorimétrica efectiva obteniéndose un rango lineal de 0.05 – 50 ng/mL y un límite de detección 48 pg/mL que es 13 veces menor que el reportado para ensayos convencionales como ELISA. Esta amplificación de señal se debe principalmente a que las AuNP utilizadas en este ensayo pueden transportar alrededor de 12 moléculas de HRP por su elevada relación área-volumen.



**Figura 35.** Esquema de detección de CEA. (a) Preparación de AuNP funcionalizadas con el anticuerpo de CEA y HRP, y de MMP funcionalizadas con anticuerpo de CEA. (b) Inmunoensayo colorimétrico basado en la formación del complejo sándwich de CEA. Adaptada de Liu y colaboradores.<sup>97</sup>

Sin embargo, las AuNP no solo se pueden utilizar como transportadoras de otras moléculas, sino que también sirven como indicadores colorimétricos debido a la fuerte dependencia de las propiedades ópticas con la distancia entre las AuNP. En ese sentido, en un nanosensor colorimétrico basado en AuNP, la presencia o ausencia del analito debe promover un cambio en las distancias entre ellas. Con este propósito, es posible utilizar los aptámeros debido a que se pueden adsorber o funcionalizar en la superficie de las AuNP protegiéndolas de la agregación inducida por sal, dado que los aptámeros aumentan la repulsión electrostática entre ellas. En ese sentido, si se utilizan nanoesferas de oro, se espera observar una coloración de la solución resultante del ensayo que varíe de roja (por la ausencia de agregados) hasta azulada (por la formación de agregados).

En un estudio, Liang y colaboradores<sup>98</sup> desarrollaron un biosensor colorimétrico cuya respuesta en presencia del analito se basaba en el grado de agregación de las AuNP. Este sensor utiliza la amplificación por círculo rodante hiperramificado (HRCA), una técnica que tiene el mismo objetivo de amplificación que la PCR, pero es más simple. La estrategia consiste en mezclar soluciones de diferentes concentraciones de CEA con el correspondiente aptámero. En ausencia del analito, el aptámero hibrida con una hebra complementaria (cADN), lo cual evita que ésta se una a la hebra candado (oligonucleótido cuyas terminaciones son complementarias a una cadena específica, cADN para este caso) para iniciar la amplificación por HRCA. Dado que la concentración de la hebra candado y el *primer* no son los suficientemente altas para prevenir la agregación inducida por sal de las AuNP, este proceso ocurre, y el color de la solución adquiere una tonalidad azulada (Figura 36 – ruta A). Por otro lado, en presencia del analito, el aptámero forma el complejo aptámero-CEA en lugar de hibridar con cADN. De esta forma, cADN hibrida con la hebra candado, lo que permite iniciar la HRCA generando un gran número de cadenas simples de ADN. Dado que estas cadenas se adsorben fácilmente en las AuNP y previenen su agregación, la solución de AuNP permanece de color rojo (Figura 36 – ruta B). Mediante esta estrategia, se consiguió un rango lineal de 5 pM – 0.5 nM y un límite de detección de 2 pM.

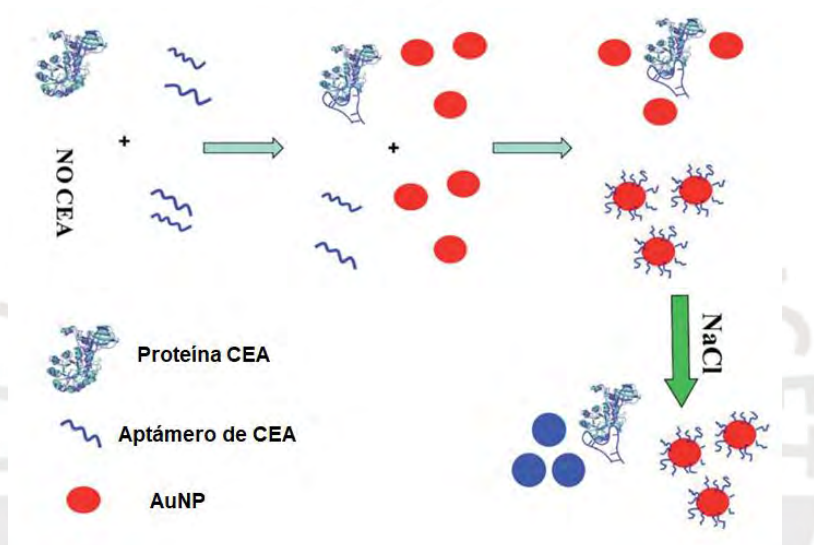


**Figura 36.** Principio del biosensor colorimétrico basado en HRCA. Adaptada por Liang y colaboradores.<sup>98</sup>

Si bien es cierto que el sensor mostrado anteriormente es bastante sensible y presenta un rango lineal aceptable, los métodos simples, rápidos y de bajo costo son los más atractivos comercialmente. Por ello, Luo y colaboradores<sup>99</sup> diseñaron un sensor colorimétrico que reúne estas características, basado en la agregación de las AuNP



inducida por sal y los cambios de conformación del aptámero con un grupo tiol en presencia del analito. En este método, en primer lugar, la adición de aptámeros a la muestra produce la formación del complejo aptámero-CEA. Luego de la adición de AuNP, ocurre la funcionalización de las AuNP con los aptámeros añadidos en exceso o libres. Finalmente, la adición de NaCl induce la agregación de las AuNP y se registra el espectro UV-vis para cuantificar la concentración de CEA utilizando la relación de la absorbancia de las AuNP y los agregados. A diferencia del estudio anterior, la presencia de CEA en la solución promueve indirectamente la agregación de las AuNP, dando lugar a una solución con tonalidad azulada (Figura 37). Mediante este método, se determinó un rango lineal de 0 – 120 ng/mL y un límite de detección de 3 ng/mL. Una ventaja adicional de esta estrategia es la posibilidad de modular el rango lineal y el límite de detección variando las cantidades de aptámero y NaCl añadidas.



**Figura 37.** Esquema de la detección colorimétrica de CEA utilizando aptámeros de CEA y AuNP sin funcionalizar. Adaptada de Luo y colaboradores.<sup>99</sup>

Pese a las ventajas que ofrecen los nanosensores colorimétricos, estos presentan ciertas limitaciones, específicamente, las basadas en la agregación de las AuNP. Por un lado, las AuNP pueden agregarse de forma no específica en fluidos biológicos complejos limitando su aplicación directa en muestras clínicas reales. Por otro lado, se requiere que estas nanopartículas sean muy monodispersas, pues la banda plasmónica sería más estrecha lo que facilitaría el monitoreo del grado de agregación de las AuNP. Por último, la adaptación de este tipo de metodologías a la detección de múltiples analitos es dificultosa, y, hasta el momento, no se han reportado sensores de este tipo que involucre CEA. Sin embargo, futuros avances en este tipo de sensores podrían superar alguna de estas limitaciones para su uso como prueba preliminar.

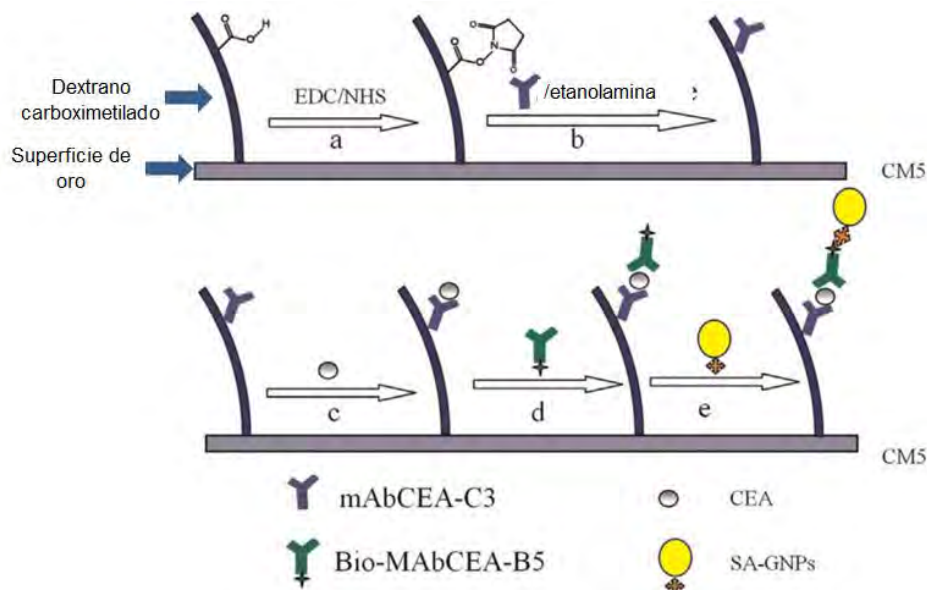
### 5.3.3 Resonancia del plasmón superficial (SPR)

SPR es una técnica óptica no destructiva que permite detectar pequeños cambios en el índice de refracción de la superficie del sensor que, normalmente, es un chip compuesto por películas de oro. Generalmente, esta técnica se utiliza para estudiar las interacciones basadas en enlaces por afinidad entre biomoléculas, por ejemplo, las interacciones antígeno-anticuerpo, la cinética de un par ligando-receptor y las reacciones enzima-sustrato.<sup>100</sup> Sin embargo, también es posible utilizar esta técnica para la detección de biomarcadores debido a su sensibilidad, robustez y versatilidad. Otra de las ventajas de los biosensores basados en SPR es que permiten llevar a cabo la detección en varios biofluidos como plasma, suero, orina y saliva.<sup>101</sup>

El principal propósito del desarrollo de biosensores basados en SPR es mostrar una técnica analítica en tiempo real, de bajo costo, miniaturizada, rápida y de fácil uso, así como sensible y selectiva, de la misma forma o incluso mejor que las técnicas actuales. Para optimizar esta técnica, se han estudiado diferentes estrategias para amplificar los cambios en el índice de refracción, y las más comunes son la conjugación con anticuerpos secundarios y la modificación con nanopartículas. La mejor amplificación se obtiene por conjugación con nanopartículas debido a tres razones:<sup>100</sup>

- un incremento en la masa absoluta luego de la conjugación,
- aumento en el índice de refracción del analito,
- y la interacción electromagnética entre la superficie de plasmón localizado de la nanopartícula metálica y el SPR de la película.

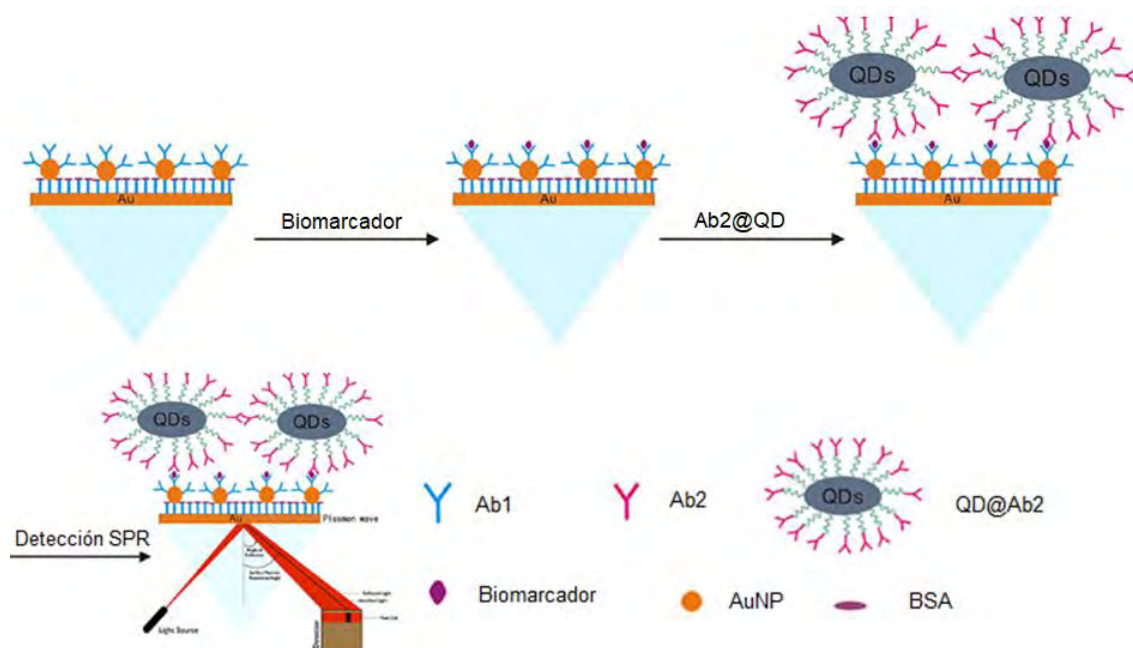
En un estudio realizado por Rong Li y colaboradores<sup>78</sup>, se puso a prueba por primera vez la detección por SPR de CEA mediante diferentes modalidades: detección directa, amplificación con anticuerpos secundarios, y amplificación con nanopartículas de oro. Para ello, se funcionaliza el chip (CM5) con el anticuerpo monoclonal de CEA (mAbCEA-C3) y, posteriormente, se inyecta la solución de CEA sobre el sensor para la detección directa (Figura 38c). Para el ensayo sándwich, se repite la inyección de CEA y luego se agrega la solución de otro anticuerpo monoclonal de CEA (mAbCEA-B5) obteniéndose mejores resultados (Figura 38d). Por último, para obtener límites de detección aún más bajos, se repiten los dos pasos anteriores, pero esta vez utilizando el anticuerpo monoclonal B5 biotinilado (bio-mAbCEA-B5), y, posteriormente, se agrega la solución de AuNP funcionalizadas con estreptavidina (SA-GNP) (Figura 38e). En este último ensayo, se obtuvo un rango lineal de 1-60 ng/mL y el límite de detección más bajo de las tres modalidades, 1.0 ng/mL. Además, se demostró su buena selectividad y su aplicabilidad en matrices reales complejas.



**Figura 38.** Metodología de detección de CEA por SPR mediante amplificación con nanopartículas de oro. Adaptada de Li y colaboradores.<sup>78</sup>

Las limitaciones con respecto a la detección de múltiples analitos en un solo canal, se pueden superar diseñando chips con múltiples canales donde en cada uno se detecte un biomarcador específico.

En ese sentido, Wang y colaboradores<sup>102</sup> desarrollaron un biosensor de detección simultánea de CEA, AFP y CYFRA 21-1. Con este fin, los autores utilizaron un chip multicanal, donde en cada canal se detecta uno de los biomarcadores mencionados, y una estrategia de doble amplificación del tipo sándwich. La superficie de oro del chip está funcionalizada con AuNP que luego se conjuga con el anticuerpo del biomarcador correspondiente. El uso de AuNP permite aumentar el área superficial del sensor mejorando el proceso de captura del analito (primera amplificación). Posteriormente a la captura, se agregan los QD funcionalizados con el anticuerpo secundario del analito para formar el inmunocomplejo sándwich consiguiendo la segunda amplificación de la señal en SPR (Figura 39). De esta forma, se logró la detección simultánea de los tres biomarcadores con un rango lineal de 0.1 – 1000 ng/mL y un LOD de 0.1 ng/mL para los tres. Además, mediante electroquimioluminiscencia, en el mismo biosensor se pudo corroborar la consistencia de los resultados obtenidos.



**Figura 39.** Diagrama esquemático de un canal del sensor de tres biomarcadores mediante SPR. Adaptada de Wang y colaboradores.<sup>102</sup>

Las técnicas basadas en SPR presentan ventajas como bajo volumen de muestra requerida, detección de múltiples analitos, portabilidad, especificidad y sensibilidad. Debido a ello, se esperan avances en la integración de la tecnología SPR en dispositivos de micro/nanofluidos para producir sensores que se puedan utilizar en hospitales o clínicas. Además, se esperan estudios en los que se reemplacen los anticuerpos por aptámeros para reducir el costo de producción del sensor y volverlo más accesible.

### 5.3.4 Espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS)

Como se explicó en la sección 2.3, la espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS) es una técnica analítica que permite la detección ultrasensible de una molécula que se encuentra adsorbida en la superficie de una nanopartícula de metal noble, generalmente AuNP. Como resultado de esta técnica, se obtiene un espectro Raman único de la molécula adsorbida.

En el desarrollo de nanosensores a base de SERS, las nanopartículas que marcan selectivamente el analito están funcionalizadas con moléculas muy activas en Raman que presentan señales conocidas e intensas, y a las cuales se denominan reportadores Raman. La estrategia más utilizada para este tipo de sensores consiste en la separación del analito, seguida del etiquetado con nanopartículas funcionalizadas con el reportador Raman y finalmente la medición del espectro SERS. En consecuencia, la intensidad de la señal más característica del reportador Raman se puede correlacionar con la concentración del biomarcador etiquetado.

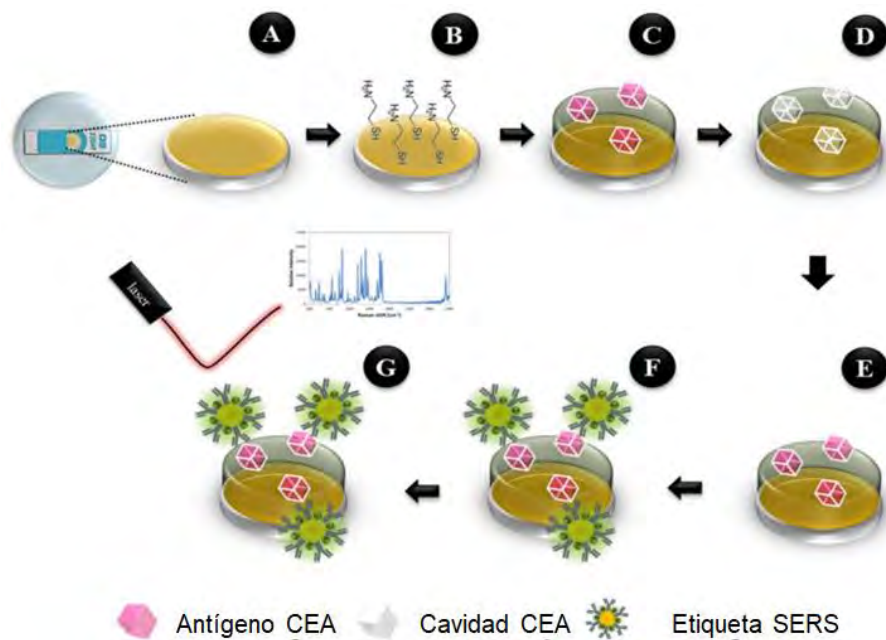
Tanto en las técnicas basadas en fluorescencia como en las basadas en SERS se utiliza una fuente de excitación. Sin embargo, las detecciones por SERS presentan ventajas

sobre fluorescencia, pues no se corre el riesgo de la fotodesactivación del fluoróforo, y las bandas más estrechas obtenidas en los espectros Raman permiten el desarrollo de sensores de analitos múltiples.

Uno de los aspectos importantes en el desarrollo de nanosensores SERS es la amplificación de las señales Raman del reportador. Para conseguir aumentar este factor, es necesario aumentar el número de *hot spots*, es decir, zonas donde se concentra el campo electromagnético, y, por tanto, la amplificación de las señales Raman es mayor. Esto se consigue modulando la distancia entre las nanopartículas o utilizando geometrías particulares de AuNP. De todas las formas de AuNP, las nanoestrellas de oro (AuNS) han mostrado poseer mayor amplificación en SERS que las nanovarillas o las nanoesferas de oro.<sup>103</sup> Esto se debe a que las puntas de las AuNS concentran el campo electromagnético generando una mayor amplificación de las señales en Raman, por lo que es frecuente su uso en este tipo de sensores con el fin de mejorar la sensibilidad.

Recientemente, Carneiro y colaboradores<sup>104</sup> desarrollaron un sensor que combina los polímeros molecularmente impresos (MIP) y SERS. En este sensor, a diferencia de los mostrados anteriormente, el elemento de captura no son ni anticuerpos ni aptámeros, sino los MIP. Estos materiales son polímeros hechos a medida preparados en presencia de una molécula plantilla. Como resultado de este proceso, luego de la remoción de la molécula plantilla, se obtiene un polímero con cavidades afines y selectivas hacia esta molécula (Figura 40A-D). En este trabajo, los MIP permiten la captura y concentración de CEA en la muestra analizada (Figura 40D-E). Posteriormente, se utilizan las AuNS funcionalizadas con el reportador Raman (4-aminotiofenol) y el anticuerpo de CEA para etiquetar este analito capturado en el MIP y se procede al registro del espectro Raman (Figura 40E-G). Mediante este método, se consiguió un amplio rango lineal de 1 a 1000 ng/mL y un límite de detección de 1 ng/mL.

Lo novedoso de este estudio es la combinación de dos elementos de reconocimiento diferentes: MIP y anticuerpos. De esta forma, se combinan las ventajas de cada uno de estos elementos: el bajo costo y el corto tiempo de producción de los MIP, y la elevada selectividad de los anticuerpos. Se espera que en investigaciones futuras se estudie la combinación de los MIP con otros elementos de captura, como los aptámeros, en el desarrollo de nanosensores.

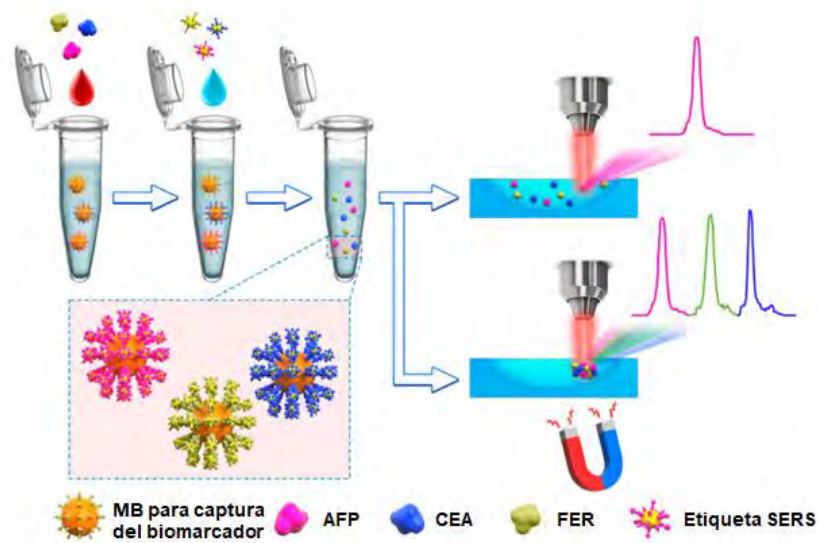


**Figura 40.** Metodología de detección de CEA por SERS utilizando MIP. Adaptada de Carneiro y colaboradores.<sup>104</sup>

Por otro lado, recientemente, Xiang-Ru y colaboradores<sup>105</sup> desarrollaron un nanosensor para la detección simultánea de tres biomarcadores de cáncer al hígado: la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la ferritina (FER). Este sensor se basa en la formación de un inmunocomplejo sándwich diferente por cada biomarcador, entre las perlas magnéticas funcionalizadas con los anticuerpos de los biomarcadores (MB), el biomarcador, y las nanoesferas de oro funcionalizadas con los anticuerpos secundarios, así como un reportador Raman diferente para cada biomarcador (etiqueta SERS) (Figura 41). La intensidad de la señal Raman característica de cada uno de los reportadores se puede correlacionar con la concentración del biomarcador respectivo. Uno de los aspectos más importantes de este sensor es el buen diseño y elección de los reportadores Raman, de forma que sus señales de interés no se sobrelapen entre sí, y que, sobre todo, no interfieran con la matriz (suero). De esta forma, consiguieron reducir el ruido de fondo mejorando la sensibilidad y la reproducibilidad. Esto último, sumado al enriquecimiento por separación magnética, permite obtener bajos límites de detección para cada biomarcador: 0.15 pg/mL para AFP, 20 pg/mL para CEA y 4 pg/mL para FER. Además, al realizar los ensayos en 39 muestras clínicas de suero notaron una mejora significativa en el diagnóstico de cáncer de hígado al considerar estos tres biomarcadores a comparación de solo AFP.

La importancia de este estudio es que se aprovecharon las bandas estrechas de los reportadores para poder diseñar un sensor de tres biomarcadores. Además, se resalta la importancia de la buena selección de los reportadores para reducir la interferencia de la matriz. Por otro lado, es uno de los pocos estudios que involucran CEA, en los cuales,

por medio de pruebas en muestras clínicas, se muestra la importancia de la detección de múltiples biomarcadores para brindar diagnósticos más precisos.



**Figura 41.** Representación esquemática de la detección de múltiples biomarcadores. Adaptada de Bai y colaboradores.<sup>105</sup>

SERS es una técnica analítica conocida desde hace décadas, pero cuya aplicación en el desarrollo de nanosensores de biomarcadores es bastante reciente. Pese a ello, los nanosensores diseñados hasta el momento, han demostrado poseer una elevada sensibilidad superando a otras técnicas empleadas comúnmente. Otra característica que vuelve atractiva a esta técnica es la posibilidad de la detección de múltiples biomarcadores que, como se mostró en el estudio anterior, resulta de vital importancia para dar un diagnóstico más preciso y hacer un mejor monitoreo de la enfermedad. Por otra parte, para volver esta técnica más accesible se esperan estudios futuros que evalúen el uso de aptámeros en el diseño del nanosensor.

## 6 Conclusiones

En este trabajo de investigación, se han discutido los tres tipos de nanomateriales (nanopartículas magnéticas, puntos cuánticos y nanopartículas de metales nobles), los elementos de reconocimiento y los principales métodos de detección del biomarcador tumoral CEA.

Atendiendo a los tipos de biorreceptores, se han estudiado dos: anticuerpos y aptámeros. En este aspecto, para la detección de CEA, se han diseñado más nanosensores utilizando anticuerpos que empleando aptámeros, probablemente por la facilidad que estos brindan para el armado del complejo sándwich, que es la estrategia habitualmente empleada para una mayor sensibilidad. Sin embargo, en algunos estudios discutidos, se han observado que los aptámeros también pueden cumplir este rol de la misma forma que los anticuerpos o de formas alternativas (véase aptámeros horquillas). En ese sentido, debido a la facilidad de obtención y bajo costo de los aptámeros, a comparación de los anticuerpos, se espera el incremento en su uso en el diseño de futuros nanosensores.

En cuanto a los principales métodos de detección, estos se pueden agrupar en tres categorías: MS, detección eléctrica y detección óptica. Para todas las técnicas discutidas, se han descrito estudios donde se muestra que el uso de nanomateriales mejora la sensibilidad y la especificidad de la detección de este biomarcador. Esta mejora se debe a las propiedades únicas de los nanomateriales y la colaboración sinérgica entre ellos, lo que permite obtener mejores resultados o desarrollar nuevas estrategias. De los sensores estudiados, se ha podido destacar una gran variedad de nanomateriales como los QD, las MNP y las NP; así como nanomateriales derivados como las QB y las MB; otros nanomateriales como el grafeno y las nanoesferas de SiO<sub>2</sub>; y materiales novedosos como los MIP.

Por último, con respecto a las estrategias de detección, se han observado tendencias hacia el desarrollo de nanosensores de detección simultánea de múltiples biomarcadores y la miniaturización de los mismos (modalidad laboratorio en un chip). Por un lado, en cuanto a la detección simultánea, destacan los nanosensores basados en fluorescencia, resonancia del plasmón superficial (SPR) y espectroscopía Raman mejorada en superficie (SERS). Por otro lado, en cuanto a la miniaturización, destacan los nanosensores basados en SPR y los basados en la detección electroquímicas. Por ello, se espera un énfasis y una mejora en estas técnicas para el desarrollo de futuros nanosensores.

En general, los nanosensores muestran un gran potencial para el diagnóstico de enfermedades y monitoreo de CEA en pacientes. En ese sentido, todos los avances realizados hasta el momento tienen como último objetivo trasladar estos sensores a la clínica y volverlos más accesibles a los pacientes con el fin de mejorar su calidad de vida.



## 7 Referencias bibliográficas

- (1) Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (recuperado el 6 de mayo del 2020).
- (2) Vineis, P.; Wild, C. P. Global Cancer Patterns: Causes and Prevention. *Lancet* **2014**, *383* (9916), 549–557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62224-2).
- (3) Atkinson, A. J.; Colburn, W. A.; DeGruttola, V. G.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Hoth, D. F.; Oates, J. A.; Peck, C. C.; Schooley, R. T.; Spilker, B. A.; Woodcock, J.; Zeger, S. L. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, *69* (3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- (4) Chan, D.; Schwartz, M. Tumor Markers: Introduction and General Principles. En *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*; Diamandis, E. P., Fritsche, H. A., Lilja, H., Chan, D., Schwartz, M., Eds.; Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2002; pp 9-18.
- (5) Mordente, A.; Meucci, E.; Martorana, G. E.; Silvestrini, A. Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives. En *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Scatena, R., Ed.; Springer New York LLC, 2015; Vol. 867, pp 9–26. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_2).
- (6) Kulasingam, V.; Diamandis, E. P. Strategies for Discovering Novel Cancer Biomarkers through Utilization of Emerging Technologies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2008**, *5* (10), 588–599. <https://doi.org/10.1038/ncponc1187>.
- (7) Ye, F.; Zhao, Y.; El-Sayed, R.; Muhammed, M.; Hassan, M. Advances in Nanotechnology for Cancer Biomarkers. *Nano Today* **2018**, *18*, 103–123. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.12.008>.
- (8) Naghibalhossaini, F.; Ebadi, P. Evidence for CEA Release from Human Colon Cancer Cells by an Endogenous GPI-PLD Enzyme. *Cancer Lett.* **2006**, *234* (2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.028>.
- (9) Herbeth, B.; Bagrel, A. A Study of Factors Influencing Plasma CEA Levels in an Unselected Population. *Oncodev. Biol. Med.* **1980**, *1* (4–5), 191–198. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7279704/>
- (10) Hammarström, S. The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family: Structures, Suggested Functions and Expression in Normal and Malignant Tissues. *Semin. Cancer Biol.* **1999**, *9* (2), 67–81. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
- (11) Sener, S. F.; Imperato, J. P.; Chmiel, J.; Fremgen, A.; Sylvester, J. The Use of Cancer Registry Data to Study Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level as an

Indicator of Survival in Colorectal Cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **1989**, *39* (1), 50–57. <https://doi.org/10.3322/canjclin.39.1.50>.

(12) Boehm, M. K.; Perkins, S. J. Structural Models for Carcinoembryonic Antigen and Its Complex with the Single-Chain Fv Antibody Molecule MFE23. *FEBS Lett.* **2000**, *475* (1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01612-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01612-4).

(13) Terry, L. A.; White, S. F.; Tigwell, L. J. The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (5), 1309–1316. <https://doi.org/10.1021/jf040319t>.

(14) Šmuc, T.; Ahn, I. Y.; Ulrich, H. Nucleic Acid Aptamers as High Affinity Ligands in Biotechnology and Biosensorics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *81–82*, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.014>.

(15) Whitesides, G. M. The “right” Size in Nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (10), 1161–1165. <https://doi.org/10.1038/nbt872>.

(16) Pareek, V.; Bhargava, A.; Gupta, R.; Jain, N.; Panwar, J. Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Adv. Sci. Eng. Med.* **2017**, *9* (7), 527–544. <https://doi.org/10.1166/ asem.2017.2027>.

(17) Shevtsov, M.; Multhoff, G. Recent Developments of Magnetic Nanoparticles for Theranostics of Brain Tumor. *Curr. Drug Metab.* **2016**, *17* (8), 737–744. <https://doi.org/10.2174/1389200217666160607232540>.

(18) Rocha-Santos, T. A. P. Sensors and Biosensors Based on Magnetic Nanoparticles. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *62*, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.016>.

(19) Cotin, G.; Pertont, F.; Blanco-Andujar, C.; Pichon, B.; Mertz, D.; Bégin-Colin, S. Design of Anisotropic Iron-Oxide-Based Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. En *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*; Fratila, R. M., De La Fuente, J. M., Eds.; Elsevier, 2018.

(20) Akbarzadeh, A.; Samiei, M.; Davaran, S. Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>.

(21) Caizer, C. Nanoparticle Size Effect on Some Magnetic Properties. En *Handbook of Nanoparticles*; Aliofkhaezrai, M., Ed.; Springer International Publishing, 2015; pp 1–38. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13188-7\\_24-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13188-7_24-1).

(22) Durán Guerrero, J. G. Desarrollo de Materiales Híbridos Nanoestructurados Basados en Nanofibras de CMC/PVA y Nanopartículas de Magnetita, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2017.

- (23) Vatta, L. L.; Sanderson, R. D.; Koch, K. R. Magnetic Nanoparticles: Properties and Potential Applications. En *Pure and Applied Chemistry*; 2006; Vol. 78, 1793–1801. <https://doi.org/10.1351/pac200678091793>.
- (24) Brus, L. E. Electron-Electron and Electron-Hole Interactions in Small Semiconductor Crystallites: The Size Dependence of the Lowest Excited Electronic State. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80* (9), 4403–4409. <https://doi.org/10.1063/1.447218>.
- (25) Pawar, R. S.; Upadhaya, P. G.; Patravale, V. B. Quantum Dots: Novel Realm in Biomedical and Pharmaceutical Industry. En *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*; Hussain, C., Ed.; Elsevier, 2018; 621–637. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00035-3>.
- (26) Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (46), 9463–9475. <https://doi.org/10.1021/jp971091y>.
- (27) Vasudevan, D.; Gaddam, R. R.; Trinchi, A.; Cole, I. Core-Shell Quantum Dots: Properties and Applications. *J. Alloys Compd.* **2015**, *636*, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.02.102>.
- (28) Fontes, A.; de Lira, R. B.; Lopes Seabra, M. A. B.; da Silva, T. G.; Castro Neto, A. G. de; Saegesser, B. Quantum Dots in Biomedical Research. En *Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine*; Hudak, R., Ed; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/50214>.
- (29) H. R, C.; Schiffman, J. D.; Balakrishna, R. G. Quantum Dots as Fluorescent Probes: Synthesis, Surface Chemistry, Energy Transfer Mechanisms, and Applications. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *258*, 1191–1214. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.189>.
- (30) Jin, S.; Hu, Y.; Gu, Z.; Liu, L.; Wu, H.-C. Application of Quantum Dots in Biological Imaging. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/834139>.
- (31) Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5* (9), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>.
- (32) Wagner, M. K.; Li, F.; Li, J.; Li, X. F.; Le, X. C. Use of Quantum Dots in the Development of Assays for Cancer Biomarkers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (8), 3213–3224. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3847-9>.
- (33) Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of

Quantum Dot Fluororeagents. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (3), 684–688. <https://doi.org/10.1021/ac035083r>.

(34) Altintas, Z.; Davis, F.; Scheller, F. W. Applications of Quantum Dots in Biosensors and Diagnostics. En *Biosensors and Nanotechnology: Applications in Health Care Diagnosis*; Altintas, Z., Ed; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; 183–199. <https://doi.org/10.1002/9781119065036.ch9>.

(35) Bolaños, K.; Kogan, M. J.; Araya, E. Capping Gold Nanoparticles with Albumin to Improve Their Biomedical Properties. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 6387–6406. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210992>.

(36) Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* **2012**, *12* (2), 1657–1687. <https://doi.org/10.3390/s120201657>.

(37) Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. Gold Nanoparticles for the Development of Clinical Diagnosis Methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (3), 943–950. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1768-z>.

(38) Turkevich, J.; Garton, G.; Stevenson, P. C. The Color of Colloidal Gold. *J. Colloid Sci.* **1954**, *9* (SUPPL. 1), 26–35. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(54\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0095-8522(54)90070-7).

(39) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241* (105), 20. <http://doi.org/10.1038/physci241020a0>

(40) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.

(41) Haynes, C. L.; McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (17), 338 A-346 A. <https://doi.org/10.1021/ac053456d>.

(42) Peiris, S.; McMurtrie, J.; Zhu, H. Y. Metal Nanoparticle Photocatalysts: Emerging Processes for Green Organic Synthesis. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6* (2), 320–338. <https://doi.org/10.1039/c5cy02048d>.

(43) Wilcoxon, J. Optical Absorption Properties of Dispersed Gold and Silver Alloy Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (9), 2647–2656. <https://doi.org/10.1021/jp806930t>.

(44) Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (29), 13857–13870. <https://doi.org/10.1021/jp0516846>.

- (45) Ashley, M. J.; Bourgeois, M. R.; Murthy, R. R.; Laramy, C. R.; Ross, M. B.; Naik, R. R.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Shape and Size Control of Substrate-Grown Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Chemical Analytes. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (4), 2307–2314. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11440>.
- (46) Michaels, A. M.; Jiang, J.; Brus, L. Ag Nanocrystal Junctions as the Site for Surface-Enhanced Raman Scattering of Single Rhodamine 6G Molecules. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (50), 11965–11971. <https://doi.org/10.1021/jp0025476>.
- (47) Ding, S. Y.; Yi, J.; Li, J. F.; Ren, B.; Wu, D. Y.; Panneerselvam, R.; Tian, Z. Q. Nanostructure-Based Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy for Surface Analysis of Materials. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1* (6), 1–16. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.21>.
- (48) Qian, J.; Wang, C.; Pan, X.; Liu, S. A High-Throughput Homogeneous Immunoassay Based on Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dots and Gold Nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *763*, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.011>.
- (49) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Universal Scaling of Plasmon Coupling in Metal Nanostructures: Extension from Particle Pairs to Nanoshells. *Nano Lett.* **2007**, *7* (9), 2854–2858. <https://doi.org/10.1021/nl071496m>.
- (50) Sharma, S.; Byrne, H.; O’Kennedy, R. J. Antibodies and Antibody-Derived Analytical Biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60* (1), 9–18. <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>.
- (51) Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O’Kennedy, R. J. Antibody Production, Design and Use for Biosensor-Based Applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20* (1), 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.010>.
- (52) Chon, H.; Lee, S.; Son, S. W.; Oh, C. H.; Choo, J. Highly Sensitive Immunoassay of Lung Cancer Marker Carcinoembryonic Antigen Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (8), 3029–3034. <https://doi.org/10.1021/ac802722c>.
- (53) Polyclonal vs. Monoclonal Antibodies - Creative Diagnostics <https://www.creative-diagnostics.com/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies.htm> (recuperado el 7 de mayo del 2020).
- (54) Tadepalli, S.; Kuang, Z.; Jiang, Q.; Liu, K. K.; Fisher, M. A.; Morrissey, J. J.; Kharasch, E. D.; Slocik, J. M.; Naik, R. R.; Singamaneni, S. Peptide Functionalized Gold Nanorods for the Sensitive Detection of a Cardiac Biomarker Using Plasmonic Paper Devices. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep16206>.

- (55) Endo, T.; Kerman, K.; Nagatani, N.; Hiepa, H. M.; Kim, D. K.; Yonezawa, Y.; Nakano, K.; Tamiya, E. Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (18), 6465–6475. <https://doi.org/10.1021/ac0608321>.
- (56) Song, K. M.; Lee, S.; Ban, C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors* **2012**, *12* (1), 612–631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>.
- (57) Ulrich, H.; Trujillo, C.; Nery, A.; Alves, J.; Majumder, P.; Resende, R.; Martins, A. DNA and RNA Aptamers: From Tools for Basic Research Towards Therapeutic Applications. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2006**, *9* (8), 619–632. <https://doi.org/10.2174/138620706778249695>.
- (58) Peyrin, E. Nucleic Acid Aptamer Molecular Recognition Principles and Application in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (10), 1531–1536. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900061>.
- (59) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (5), 1948–1998. <https://doi.org/10.1021/cr030183i>.
- (60) About Aptamer – Aptamer Sciences <http://aptsoci.com/en/aptamer/aptamer/> (recuperado el 8 de mayo del 2020).
- (61) Kalra, P.; Dhiman, A.; Cho, W. C.; Bruno, J. G.; Sharma, T. K. Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front. Mol. Biosci.* **2018**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00041>.
- (62) Sazani, P. L.; Larralde, R.; Szostak, J. W. A Small Aptamer with Strong and Specific Recognition of the Triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (27), 8370–8371. <https://doi.org/10.1021/ja049171k>.
- (63) Wen, W.; Huang, J. Y.; Bao, T.; Zhou, J.; Xia, H. X.; Zhang, X. H.; Wang, S. F.; Zhao, Y. Di. Increased Electrocatalyzed Performance through Hairpin Oligonucleotide Aptamer-Functionalized Gold Nanorods Labels and Graphene-Streptavidin Nanomatrix: Highly Selective and Sensitive Electrochemical Biosensor of Carcinoembryonic Antigen. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *83*, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.039>.
- (64) Yurushkin, M. V.; Gervich, L. R.; Bachurin, S. S.; Kletskii, M. E. Detection of Nucleotide Sequences Capable of Forming Non-Canonical DNA Structures: Application of Automata Theory. *Comput. Biol. Chem.* **2019**, *80*, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.04.009>.
- (65) Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-Based Biosensors. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>.

- (66) Lakhin, A. V.; Tarantul, V. Z.; Gening, L. V. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae* **2013**, *5* (19), 34–43. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>.
- (67) Werengowska-Ciećwierz, K.; Wiśniewski, M.; Terzyk, A. P.; Furmaniak, S. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/198175>.
- (68) Wang, M.; Cao, X.; Lu, W.; Tao, L.; Zhao, H.; Wang, Y.; Dong, J.; Qian, W. Surface-Enhanced Raman Scattering Immunoassay for Carcinoembryonic Antigen Based on Gold Nanostars. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16* (7), 6711–6716. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11368>.
- (69) Bamrungsap, S.; Treetong, A.; Apiwat, C.; Wuttikhun, T.; Dharakul, T. SERS-Fluorescence Dual Mode Nanotags for Cervical Cancer Detection Using Aptamers Conjugated to Gold-Silver Nanorods. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (1), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1639-9>.
- (70) Yüce, M.; Kurt, H. How to Make Nanobiosensors: Surface Modification and Characterisation of Nanomaterials for Biosensing Applications. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49386–49403. <https://doi.org/10.1039/c7ra10479k>.
- (71) Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F.; Ren, J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir* **2012**, *28* (9), 4464–4471. <https://doi.org/10.1021/la204289k>.
- (72) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques: Third Edition*; Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>.
- (73) Bartczak, D.; Kanaras, A. G. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir* **2011**, *27* (16), 10119–10123. <https://doi.org/10.1021/la2022177>.
- (74) Hernandez Garcia, Y. Funcionalización de Nanopartículas de Oro Para Terapia Génica, Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España, 2013.
- (75) Jazayeri, M. H.; Amani, H.; Pourfatollah, A. A.; Pazoki-Toroudi, H.; Sedighimoghaddam, B. Various Methods of Gold Nanoparticles (GNPs) Conjugation to Antibodies. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2016**, *9*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>.
- (76) Liu, R.; Liu, X.; Tang, Y.; Wu, L.; Hou, X.; Lv, Y. Highly Sensitive Immunoassay Based on Immunogold-Silver Amplification and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (6), 2330–2336. <https://doi.org/10.1021/ac103265z>.

- (77) Avidin-Biotin Interaction | Thermo Fisher Scientific - PE <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html> (recuperado el 13 de junio del 2020).
- (78) Li, R.; Feng, F.; Chen, Z. Z.; Bai, Y. F.; Guo, F. F.; Wu, F. Y.; Zhou, G. Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen Using Surface Plasmon Resonance Biosensor with Gold Nanoparticles Signal Amplification. *Talanta* **2015**, *140*, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.041>.
- (79) Ermini, M. L.; Song, X. C.; Špringer, T.; Homola, J. Peptide Functionalization of Gold Nanoparticles for the Detection of Carcinoembryonic Antigen in Blood Plasma via SPR-Based Biosensor. *Front. Chem.* **2019**, *7* (FEB). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00040>.
- (80) Zheng, C.; Yang, L.; Sturgeon, R. E.; Hou, X. UV Photochemical Vapor Generation Sample Introduction for Determination of Ni, Fe, and Se in Biological Tissue by Isotope Dilution ICPMS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (9), 3899–3904. <https://doi.org/10.1021/ac1004376>.
- (81) Zhang, C.; Zhang, Z.; Yu, B.; Shi, J.; Zhang, X. Application of the Biological Conjugate between Antibody and Colloid Au Nanoparticles as Analyte to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (1), 96–99. <https://doi.org/10.1021/ac0103468>.
- (82) Liu, R.; Liu, X.; Tang, Y.; Wu, L.; Hou, X.; Lv, Y. Highly Sensitive Immunoassay Based on Immunogold-Silver Amplification and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (6), 2330–2336. <https://doi.org/10.1021/ac103265z>.
- (83) Cao, Y.; Mo, G.; Feng, J.; He, X.; Tang, L.; Yu, C.; Deng, B. Based on ZnSe Quantum Dots Labeling and Single Particle Mode ICP-MS Coupled with Sandwich Magnetic Immunoassay for the Detection of Carcinoembryonic Antigen in Human Serum. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1028*, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.039>.
- (84) Zhang, X.; Chen, B.; He, M.; Zhang, Y.; Xiao, G.; Hu, B. Magnetic Immunoassay Coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of Alpha-Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2015**, *106*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.01.011>.
- (85) Cheng, Y. T.; Rodak, D. E.; Wong, C. A.; Hayden, C. A. Effects of Micro- and Nano-Structures on the Self-Cleaning Behaviour of Lotus Leaves. *Nanotechnology* **2006**, *17* (5), 1359–1362. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/5/032>.



- (86) Munawar, A.; Ong, Y.; Schirhagl, R.; Tahir, M. A.; Khan, W. S.; Bajwa, S. Z. Nanosensors for Diagnosis with Optical, Electric and Mechanical Transducers. *RSC Adv.* **2019**, *9* (12), 6793–6803. <https://doi.org/10.1039/c8ra10144b>.
- (87) Topkaya, S. N.; Azimzadeh, M.; Ozsoz, M. Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers Detection: Recent Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2016**, *28* (7), 1402–1419. <https://doi.org/10.1002/elan.201501174>.
- (88) Peng, D.; Liang, R. P.; Huang, H.; Qiu, J. D. Electrochemical Immunosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Signal Amplification Strategy of Graphene and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au NPs. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *761*, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.014>.
- (89) Shu, H.; Wen, W.; Xiong, H.; Zhang, X.; Wang, S. Novel Electrochemical Aptamer Biosensor Based on Gold Nanoparticles Signal Amplification for the Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Electrochem. Commun.* **2013**, *37*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.09.018>.
- (90) Shekari, Z.; Zare, H. R.; Falahati, A. Electrochemical Sandwich Aptasensor for the Carcinoembryonic Antigen Using Graphene Quantum Dots, Gold Nanoparticles and Nitrogen Doped Graphene Modified Electrode and Exploiting the Peroxidase-Mimicking Activity of a G-Quadruplex DNAzyme. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3572-9>.
- (91) Stern, E.; Vacic, A.; Rajan, N. K.; Criscione, J. M.; Park, J.; Ilic, B. R.; Mooney, D. J.; Reed, M. A.; Fahmy, T. M. Label-Free Biomarker Detection from Whole Blood. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (2), 138–142. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.353>.
- (92) Ding, L.; Chen, X.; He, L.; Yu, F.; Yu, S.; Wang, J.; Tian, Y.; Wang, Y.; Wu, Y.; Liu, L. e.; Qu, L. Fluorometric Immunoassay for the Simultaneous Determination of the Tumor Markers Carcinoembryonic Antigen and Cytokeratin 19 Fragment Using Two Kinds of CdSe/ZnS Quantum Dot Nanobeads and Magnetic Beads. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (3), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3914-7>.
- (93) Chen, Z.; Liang, R.; Guo, X.; Liang, J.; Deng, Q.; Li, M.; An, T.; Liu, T.; Wu, Y. Simultaneous Quantitation of Cytokeratin-19 Fragment and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum via Quantum Dot-Doped Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.036>.
- (94) Hao, M.; Ma, Z. An Ultrasensitive Chemiluminescence Biosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Autocatalytic Enlargement of Immunogold Nanoparticles. *Sensors (Switzerland)* **2012**, *12* (12), 17320–17329. <https://doi.org/10.3390/s121217320>.
- (95) Wu, J.; Ju, H. X. Clinical Immunoassays and Immunosensing. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*; Pawliszyn, J., Ed.; Elsevier Inc., 2012; Vol. 3, 143–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00071-5>.

- (96) Zheng, X.; Mo, G.; He, Y.; Qin, D.; Jiang, X.; Mo, W.; Deng, B. An Electrochemiluminescence Immunosensor Based on ZnSe@ZnS QDs Composite for CEA Detection in Human Serum. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *844*, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.05.025>.
- (97) Liu, M.; Jia, C.; Jin, Q.; Lou, X.; Yao, S.; Xiang, J.; Zhao, J. Novel Colorimetric Enzyme Immunoassay for the Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Talanta* **2010**, *81* (4–5), 1625–1629. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.014>.
- (98) Liang, K.; Zhai, S.; Zhang, Z.; Fu, X.; Shao, J.; Lin, Z.; Qiu, B.; Chen, G. N. Ultrasensitive Colorimetric Carcinoembryonic Antigen Biosensor Based on Hyperbranched Rolling Circle Amplification. *Analyst* **2014**, *139* (17), 4330–4334. <https://doi.org/10.1039/c4an00417e>.
- (99) Luo, C.; Wen, W.; Lin, F.; Zhang, X.; Gu, H.; Wang, S. Simplified Aptamer-Based Colorimetric Method Using Unmodified Gold Nanoparticles for the Detection of Carcinoma Embryonic Antigen. *RSC Adv.* **2015**, *5* (15), 10994–10999. <https://doi.org/10.1039/c4ra14833a>.
- (100) Bellassai, N.; D'Agata, R.; Jungbluth, V.; Spoto, G. Surface Plasmon Resonance for Biomarker Detection: Advances in Non-Invasive Cancer Diagnosis. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 570. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00570>.
- (101) Masson, J. F. Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. *ACS Sensors* **2017**, *2* (1), 16–30. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00763>.
- (102) Wang, H.; Wang, X.; Wang, J.; Fu, W.; Yao, C. A SPR Biosensor Based on Signal Amplification Using Antibody-QD Conjugates for Quantitative Determination of Multiple Tumor Markers. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33140>.
- (103) Nalbant Esenturk, E.; Hight Walker, A. R. Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy via Gold Nanostars. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (1), 86–91. <https://doi.org/10.1002/jrs.2084>.
- (104) Carneiro, M. C. C. G.; Sousa-Castillo, A.; Correa-Duarte, M. A.; Sales, M. G. F. Dual Biorecognition by Combining Molecularly-Imprinted Polymer and Antibody in SERS Detection. Application to Carcinoembryonic Antigen. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *146*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111761>.
- (105) Bai, X. R.; Wang, L. H.; Ren, J. Q.; Bai, X. W.; Zeng, L. W.; Shen, A. G.; Hu, J. M. Accurate Clinical Diagnosis of Liver Cancer Based on Simultaneous Detection of Ternary Specific Antigens by Magnetic Induced Mixing Surface-Enhanced Raman Scattering Emissions. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (4), 2955–2963. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05153>.

