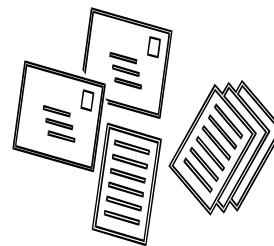


Comentario Especializado



PEBBLEs: LAS NANOESFERAS SENSORAS.

Ing. José Seco Álvarez

Tecnólogo de II Nivel. Dirección de Diagnóstico Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: jose.seco@cnic.edu.cu

INTRODUCCIÓN

Hacer mínimas las interferencias de todo tipo, entre el elemento sensor y la muestra, es el objetivo común para todos aquellos que trabajan en el desarrollo de nuevos sensores.

Cuando se trabaja a nivel celular, las dimensiones son tan pequeñas que la introducción de un marcador molecular, o de contraste, puede provocar daños biológicos, toxicidad, alteración del funcionamiento de la célula, errores en la medición efectuada, y puede incluso causar hasta la muerte de la célula.

Con la utilización de una matriz inerte en la cual se puedan encapsular esos sistemas (marcadores moleculares y de contraste, captadores de iones, etc.) se logra reducir de forma considerable todo tipo de interacción entre la célula y el sensor.

Kopelman y cols. introdujeron en 1998 el término PEBBLE,¹ (*Probes Encapsulated by Biologically Localized Embedding*, una posible traducción podría ser: sensores encapsulados por incrustamientos biológicamente localizados), aplicable a toda una familia de nanosensores y técnicas de nanofabricación, compuestos los primeros por matrices poliméricas inertes de diferente tipo utilizadas para miniaturizar diferentes tecnologías e insertar elementos sensores para la realización de mediciones ópticas.² Se utiliza generalmente la fluorescencia como elemento transductor para su trabajo, teniendo en cuenta, la "facilidad" que proporciona esta para su medición.

NANOSENSORES PEBBLES

Los nanosensores PEBBLES fueron desarrollados para su uso en aplicaciones intracelulares teniendo en cuenta las posibilidades de protección que proveen los sensores de fibra óptica, combinada con la gran capacidad de protección que brinda a la célula con respecto a las perturbaciones mecánicas y físicas durante su operación.

Combinan las ventajas de diferentes tipos de sensores, eliminando las interferencias químicas y físicas entre el sensor y la muestra. Su pequeño tamaño permite la realización de su trabajo de un modo prácticamente no invasivo en la célula, teniendo en cuenta que la naturaleza porosa de la matriz, permite la interacción del analito con el indicador, de manera que su detección se realiza mediante una variación en la fluorescencia emitida.

Esta es la principal ventaja de los sensores PEBBLES sobre los marcadores fluorescentes cuando se realizan mediciones intracelulares, ya que esta matriz provee una cubierta protectora para los marcadores de contraste, protegiendo la respuesta en la medición de interferencias tales como enlaces con proteínas, secuestro de organelos de la muestra biológica o ambos.³

Los nanosensores PEBBLES aventajan de forma apreciable a los de fibra óptica en cuanto al volumen de inserción en la célula.

la. Estos son muy útiles en el estudio y seguimiento de analitos simples, aunque tienen un volumen de inserción muchísimo mayor, de forma tal que la utilización de varios de estos sensores, pueden introducir serios errores en la medición e incluso provocar la muerte de la célula. Sin embargo, en un volumen semejante, pueden introducirse cientos, e incluso miles de sensores PEBBLES en el interior de una célula sin ocasionar problemas semejantes.

La matriz polimérica reduce a la mínima expresión las perturbaciones físicas que se pudieran introducir al desarrollar una medición por parte del contenido intracelular y al mismo tiempo, el contenido celular es protegido de la posible toxicidad que pudieran provocarle los marcadores de contraste u otros marcadores.² Esta dualidad en la protección es una característica fundamental de los nanosensores PEBBLES.

Durante su utilización pueden identificarse fácilmente dos zonas en el sensor. En una de ellas, la matriz concentrará todos los elementos sensores, mientras que los analitos se encuentran en el entorno celular. La constitución porosa de la matriz permitirá la difusión de iones y otros analitos neutros y su interacción con los marcadores de contraste o captadores de iones, pero al mismo tiempo, evitará la difusión de estos marcadores hacia el interior de la célula, garantizando de esta forma, la protección del contenido celular e incluso permitiendo que se utilicen diferentes marcadores de contraste que, utilizados de otra forma, pudieran provocar toxicidad y muerte de la célula.

Existen diferentes matrices, conocidas de acuerdo con el material del que son fabricadas: poli(acrilamida), PDMA [poli(decilmetacrilato)] y sol gel de dióxido de silicio.

Los nanosensores con matriz de poli(acrilamida) más conocidos son los desarrollados para medir: pH,⁴ calcio,⁴ oxígeno,⁵ zinc⁷ y magnesio.⁸ Esta fue la primera matriz utilizada para producir los nanosensores PEBBLES⁹ y con ella se fabrica uno sensible a la glucosa,⁶ que está considerado como una de los buenos exponentes en este campo de los nanosensores. Se inmoviliza en la matriz, una enzima (glucosa-oxidasa), un fluoróforo de referencia y un marcador fluorescente estándar.

También con matriz de poli(acrilamida) existe un nanosensor capaz de realizar la medición de la concentración de radicales libres,¹⁰ conocidos como una de las especies más dañinas para los sistemas biológicos,¹¹ los cuales no son detectados por otros métodos dado su corto tiempo de vida (cercano a 1 ns) en ellos.^{11,12}

Con matriz de poli(decilmetacrilato) PDMA son también construidos los PEBBLES sensibles a los iones potasio,¹³ sodio² y cloruro.²

Utilizando la matriz de sol gel de dióxido de silicio, se construyen sensores sensibles al oxígeno y NO.²

En el caso de los PEBBLES con matriz de sol gel de dióxido de silicio, se recubren con poliglicol-polietileno (PEG), que no es tóxico y su unión con las nanopartículas de dióxido de silicio incorpora una superficie biocompatible de protección,¹⁴ con lo que se logra un mayor tiempo de vida útil (al ser menos "agredido" el sensor por el entorno), condición de gran importancia en la realización de mediciones *in vivo*.

Para introducir estos nanosensores en las células a estudiar, existen diferentes métodos ampliamente descritos.¹⁵⁻¹⁷

MOONS Y MAG MOONS

Los Nanosensores Ópticos Modulados, MOONS (*MODulated Optical Nanosensors*) constituyen nuevas generaciones de nanosensores PEBBLES que se desarrollan para resolver las dificultades que se pueden presentar en las mediciones por la fluorescencia de fondo en los instrumentos ópticos de medición, así como la autofluorescencia en las muestras biológicas. Dentro de estos sensores modulados, se encuentran los MagMOONS y MOONS modulados por movimiento térmico aleatorio (*Brownian Moons*).

Los MagMOONS [Sensores Ópticos Modulados Magnéticos (Magnetic MOONS)],^{18,19} son nanoesferas de sol gel de dióxido de silicio en las cuales se introduce un material ferromagnético de forma que pueden ser moduladas por un campo magnético externo.

Estos nanosensores incrementan considerablemente la sensibilidad y la relación señal/ruido (en más de dos órdenes) durante la realización de las mediciones, lo que permite incrementar la confiabilidad, disminuir los niveles de detección y mejorar la calidad de las mediciones a realizar, así como eliminar los problemas ya referidos relacionados con la fluorescencia de fondo.

PRINCIPALES VENTAJAS DE LOS PEBBLES

Los sensores PEBBLES, trabajan con la relación existente entre los valores de los marcadores indicadores y de referencia. Esto posibilita la solución al problema que provocan factores tales como las fluctuaciones de la señal y la dispersión de la luz por parte de la muestra, que se producen en los sensores basados en marcadores fluorescentes, los cuales trabajan en función de un pico único de intensidad.

La separación que produce la matriz inerte entre el entorno intracelular y los elementos sensores permite la protección de ambos de las interferencias que pudiera provocar uno en el otro. La matriz protege a la célula de cualquier citotoxicidad provocada por el marcador fluorescente, u otro elemento sensor y, al mismo tiempo, protege al elemento sensor de cualquier posible evento que pueda ocurrir en el entorno celular (secuestro de organelos, uniones de proteínas, etc.), que afectarían la respuesta correcta durante la medición.

Por otra parte, el pequeño tamaño del nanosensor (entre 20 y 200 nm),²⁰ permite su introducción en las células sin producir la mortalidad de estas e incluso, puede introducirse un gran número de sensores PEBBLES, en el mismo volumen que ocuparía un solo sensor de otro tipo. *Dourado y Kopelman*²¹ han puntualizado las ventajas que ofrecen los sensores con dimensiones nanométricas y hecho incapié en que según disminuyen estas, mejoran considerablemente sus características.

El tiempo de respuesta con cualesquiera de las matrices utilizadas es muy pequeño, lo que es una necesidad de primer orden cuando se trabaja en tiempo real de una célula.

Se pueden realizar simultáneamente varias mediciones, combinando marcadores fluorescentes de contraste y de referencias, catalizadores, enzimas y captadores de iones.

Los tiempos de vida reportados para estos nanosensores dependen de la matriz que se utilice en su fabricación. *Xu et al.*, reportan tiempos de vida de más de tres días para los PEBBLES con matriz de sol gel y de un día para los de poli(acrilamida),⁵ mientras que *Brasuel et al.* reportan tiempos de vida de 30 min

para PEBBLES de potasio con matriz de PDMA.¹³ Estos tiempos de vida son muy buenos para la realización de mediciones *in vivo*, en células cuyo tiempo de vida es muy corto una vez comenzado el estudio.

LIMITACIONES

La vida útil de los nanosensores PEBBLES está limitada por la lixiviación de los marcadores en la matriz de los sensores. En esto influye de forma considerable el tamaño de las moléculas del marcador, así como su solubilidad en agua y en la matriz del nanosensor, determinando el tiempo de vida útil de los PEBBLES en sus diferentes matrices.

ALGUNAS APLICACIONES

Entre las principales aplicaciones de los nanosensores PEBBLES se encuentra la realización de mediciones intracelulares en tiempo real, muy estrechamente relacionadas con el objetivo inicial de estos sensores, así como la obtención de imágenes intracelulares.¹⁵

Nanopartículas de sol gel de dióxido de silicio con un elemento fluorescente han sido preparadas para la obtención de imágenes biológicas.²²

También se les ha empleado como exploradores para la realización de mediciones intracelulares y el desarrollo posterior de terapias fotónicas,²⁰ en la detección de cáncer y su terapia posterior, así como en imagenología y en la entrega de medicamentos a nivel celular.

Kopelman et al.²³ reportan la utilización de un microtubulador magnético que combina las ventajas de un control magnético externo con la realización de mediciones químicas *in situ* para la determinación de pH, que ofrece además, la posibilidad de utilizar los diferentes nanosensores PEBBLES desarrollados para la medición de diferentes iones y moléculas tales como NO, O₂, etc.

CONCLUSIONES

Los nanosensores PEBBLES reúnen en buena medida las características buscadas por los diferentes grupos científicos que se dedican al desarrollo de nuevos sensores, tales como velocidad de respuesta, pequeño tamaño, reproducibilidad en su fabricación, protección del entorno en que se realiza la medición, etc.

Es importante destacar que, a pesar de su pequeño tamaño, mantienen todas las potencialidades en cuanto a funcionalidad y biocompatibilidad se refiere, de los macrosensores, e incluso, los superan en cuanto a velocidad de respuesta y al límite de detección absoluta.

La incorporación de nuevas posibilidades técnicas en los nanosensores PEBBLES desarrollados inicialmente, han contribuido al surgimiento de nuevas generaciones de sensores tales como los MOONS (nanosensores ópticos modulados), los que no solo han incrementado considerablemente sus potencialidades, sino también, su utilización en nuevas aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Clark H.A., Barker S.L., Brasuel M., Miller M.T., Monson E., Parus S. et al. Subcellular optochemical nanobiosensors: Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding (PEBBLES). *Sens. Actuators, B*, 51, 12-16, 1998.
- Xu H., Buck S.M., Kopelman R., Philbert M.A., Brasuel M., Monson E. et al. Fluorescent PEBBLE nanosensors and Nanoexplorers for real-time Intracellular and biomedical applications. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 10, C.D. Geddes and J. R. Lakowicz, Eds., Kluwer, Academic/Plenum Press, 69-126, 2005.
- Grabber M.L., Dilillo D.C., Friedman B.L. and Pastorizamunoz E. Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH. *Anal. Biochem.*, 156, 202-212, 1986.
- Clark H.A., Kopelman R., Tjalkens R. and Philbert M.A. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cell: Sensors

- for pH, calcium and the intracellular application of PEBBLE Sensors. **Anal. Chem.**, **71**, 4837-4843, 1999.
5. Xu H., Aylott J.W., Kopelman R., Miller T. J. and Philbert M.A. A real-time ratiometric method for the determination of molecular oxygen inside living cells using sol-gel based spherical optical nanosensors with applications to rat C6 glioma. **Anal. Chem.**, **73**, 4124-4133, 2001.
6. Xu H., Aylott J.W. and Kopelman R., Fluorescent nano-PEBBLE sensors for the real-time measurement of glucose inside living Cells. **Analyst**, **127**, 1471-1477, 2002.
7. Summer J.P., Aylott J.W., Monson E. and Kopelman R. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. **Analyst**, **127**, 11-16, 2002.
8. Park E.J., Brasuel M., Behrend C., Philbert M.A. and Kopelman R. Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentration inside viable cells. **Anal. Chem.**, **75**, 3784-91, 2003.
9. Monson E., Brasuel M., Philbert M. and Kopelman R., Dinh T.V., Ed., Biomedical Photonics Handbook, PEBBLE Nanosensors for *in vitro* bioanalysis, CH. 59, 1-14, CRC Press, USA, 2003.
10. King M. and Kopelman R. Development of a hidroxil radical ratiometric nanoprobe. **Sens. Actuators B-Chem.**, **90**, 76-81, 2003.
11. Roots R. and Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian-cells. **Radiat. Res.**, **64**, 306-320, 1975.
12. Lubec G. The hidroxil radical: from chemistry to human disease. **J. Invest. Med.**, **44**, 324-346, 1996.
13. Brasuel M., Kopelman R., Miller T.J., Tjalkens R. and Philbert M.A. Fluorescent nanosensors for Intracellular chemical analysis: decyl metacrylate liquid polymer matrix and ion-exchanged-based potassium PEBBLE sensors with real-time application to viable rat C6 glioma cells. **Anal. Chem.**, **73**, 2221-2228, 2001.
14. Gref R., Luck M., Quéllec P., Marchand M., Dellacherie E., Harrisch S., Blunk T. and Muller R. H. "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and on the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloid Surf. B-Biointerfaces**, **18**, 301-333, 2000.
15. Aylott J.W. Optical nano sensor an enabling technology for intracellular measurements. **Analyst**, **128**, 309-312, 2003.
16. Clark H.A., Hoyer M., Parus S., Philbert, M. and Kopelman, R. Optochemical nanosensors and subcellular applications in living cell, **Mikrochim. Acta**, **131**, 121-124, 1999.
17. Clark H.A., Hoyer M., Philbert M.A. and Kopelman R. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. **Anal. Chem.**, **71**, 4831-4836, 1999.
18. Ankers J.N. and Kopelman R. Magnetic modulated optical nanoprobe. **Appl. Phys. Lett**, **82**, 1102-1104, 2003.
19. Roberts T.G., Anker J.N. and Kopelman R. Magnetically modulated optical nanoprobe (MagMOONs) for detection and measurement of biologically important ions against the natural background fluorescence of intracellular environments. **Journal of Magnetism and Magnetic Mat.**, **293**, 715-724, 2005.
20. Kopelman R. Bionanosensors. <http://www.umich.edu/~koplab> (Consultado: 3 de noviembre de 2007.)
21. Dourado S. and Kopelman R. Is Smaller Better? Scaling of characteristics with size of fiber-optic chemical and biochemical sensors, Proceeding of SPIE, Chemical, Biochemical and Environmental Fibers Sensors VIII, Robert A. Lieberman Editor, December, Vol. 2836, 2-11, 1996.
22. Qhobosheane M., Santra S., Shang P. and Tan W.H. Biochemically Functionalized Silica Nanoparticles, **Analyst**, **126**, 1274-1278, 2001.
23. Mac Naughton B.H., Anker J.N. and Kopelman R. Magnetic Microdrill as a modulated pH sensor. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, **293**, 697-701, 2005.