

Dispositius avançats per al nanodiagnòstic clínic

M. Carmen Estévez i Laura M. Lechuga

Grup de Nanobiosensors i Aplicacions Bioanalítiques (Grup NanoB2A), Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC, CIBER-BBN i BIST.

Correspondència: Laura M. Lechuga, (Grup NanoB2A), Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC, CIBER-BBN i BIST, 08193 Bellaterra, Barcelona. Adreça electrònica: laura.lechuga@icn2.cat.

DOI: 10.2436/20.1501.02.176

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 13/02/2018

Acceptat: 26/03/2018

Resum

El diagnòstic del futur (ràpid, precís, mínimament invasiu i portàtil) ha esdevingut una àrea clau en nanomedicina, ja que és sempre el primer pas en medicina i esdevé posteriorment imprescindible en el seguiment de les teràpies. Les noves tècniques analítiques proporcionaran una detecció més ràpida, precisa i fiable en estats precoços de la malaltia, requerint idealment una mínima quantitat de mostra del pacient (una gota de mostra), la qual cosa tindrà un clar impacte social i econòmic. Les noves tecnologies de diagnòstic apareixen com una combinació hàbil i imaginativa de principis físics que apareixen a la nanoescala, amb receptors biològics altament selectius envers dels biomarcadors específics per a una determinada condició o malaltia. En aquesta revisió es descriurà l'estat de l'art i les perspectives de futur de l'àrea de nanodiagnòstic i, en particular, dels dispositius nanobiosensors i del tipus *point-of-care* per al diagnòstic precoç i descentralitzat, posant especial èmfasi en aquells basats en detecció òptica, atès el seu creixent potencial i les excel·lents propietats que presenten.

Paraules clau: diagnosi precoç, *point-of-care*, biosensors òptics, biomarcadors, nanomedicina.

Introducció

La nanomedicina, entesa com l'aplicació de les eines i els fenòmens físics que ofereix la nanotecnologia en l'escala nanomètrica (10^{-9} m) en l'àmbit clínic i biomèdic, ha esdevingut en els darrers anys una disciplina clau per assolir reptes revolucionaris dirigits a millorar la qualitat de vida del pacient. L'enorme progrés produït en el vessant físic i tecnològic de la nanotecnologia, especialment en la fabricació i caracterització de nous instruments i sobretot de materials i nanoestructures amb propietats úniques, ha obert un camp d'aplicacions ampli i ha situat la nanomedicina en el focus d'atenció. En termes generals la nanomedicina engloba dos grans àmbits d'investigació: el terapèutic i el diagnòstic. En l'àmbit terapèutic, se centra en (i) el desenvolupament de noves tècniques i materials que millorin l'eficiència de l'administració de fàrmacs, de manera dirigida als òrgans o teixits diana, esquivant així efectes secundaris a zones sanes de l'organisme,

i en (ii) la medicina regenerativa emprant nous biomaterials, amb l'objectiu de reparar o substituir teixits o òrgans afectats. En l'àmbit diagnòstic, la nanomedicina es focalitza a generar noves eines de diagnòstic que ofereixin prestacions avançades tant per al (i) diagnòstic *in vivo*, desenvolupant nous agents d'imatge amb propietats més potents, o per al (ii) diagnòstic *in vitro*, promovent el desenvolupament de dispositius d'anàlisi compactes, sensibles, específics i econòmics. Ambdós vessants del diagnòstic van dirigits principalment a la detecció precoç de malalties de forma ràpida i mínimament invasiva, al disseny de tractaments personalitzats més eficients i al seguiment constant de l'evolució de la malaltia. Aquestes metes plantejades per la nanomedicina són actualment factibles en part gràcies a la major comprensió en els mecanismes subjacents a malalties complexes, com el càncer, malalties autoimmunes o neurodegeneratives, que al seu torn, ha vingut donada per l'expansió de disciplines com la proteòmica, la genòmica o la metabolòmica.

Desenvolupar estratègies de diagnòstic a nivell precoç de la malaltia i altament específiques requereix inevitablement nous instruments de detecció avançats i, en aquest sentit, els dispositius del tipus *point-of-care* (POC) s'han convertit en eines indispensables. Tenir un diagnòstic ràpid, fiable i idealment de baix cost permetria abordar tractaments i un seguiment del pacient més eficients. Milloraria la capacitat de resposta i podria oferir més probabilitats de recuperació al pacient, incidint en una disminució de costos per al sistema sanitari i un increment de la qualitat de vida del pacient. Així doncs, plataformes sensores descentralitzades (allunyades de laboratoris d'anàlisi tradicionals) i ubicades en centres clínics o d'atenció primària, que permetin l'anàlisi de marcadors de certes malalties i el monitoratge de la seva evolució per avaluar, per exemple, l'eficiència d'un tractament determinat, estan

Advanced devices for clinical nanodiagnostics

Summary

Advanced diagnostics (fast, accurate, non-invasive and portable) has become a key area in the field of nanomedicine, as it is the crucial first step to establish the disease and later on, for the therapy follow-up. Forthcoming novel analytical techniques will provide a fast, precise and reliable detection in early stages of a disease, requiring a low volume of patient's sample (ideally a simple drop of sample), which will result in a noticeable social and economic impact. New diagnostic technologies ingeniously merge physical principles at the nanoscale with the use of highly selective biological receptors towards specific biomarkers related to particular clinical conditions or diseases. In this review we describe the state-of-the-art and future perspectives in the area of nanodiagnostics, in particular in the field of point-of-care devices for early and decentralized diagnosis: We especially emphasize those based on optical detection, as they currently show increasing potential and excellent properties for this purpose.

Keywords: early diagnosis, optical biosensors, point-of-care, biomarkers, nanomedicine.

destinades a ser clau en la medicina «a mida».

Tenint com a precedents aquestes bases, en aquesta revisió es pretén descriure quin és l'estat de l'art i les perspectives de futur en l'àrea de nanodiagnòstic i, en particular, dels dispositius nanobiosensors i tipus POC per al diagnòstic precoç i descentralitzat.

Nanodiagnòstic

El diagnòstic en termes generals implica la detecció i identificació de la patologia, el seu grau de progressió i la selecció del tractament més adient. Disposar de tècniques que permetin fer un seguiment eficient de l'evolució de la malaltia i la resposta davant del tractament aplicat suposa uns beneficis afegits que globalment poden, en gran mesura, millorar la qualitat de vida del pacient.

En l'àmbit del nanodiagnòstic *in vivo*, focalitzat en el disseny de tècniques d'imatge que permetin visualitzar o detectar anomalies a nivell molecular, cel·lular o anatòmic dintre de l'organisme, la nanotecnologia ha trobat un sector clau en el desenvolupament de nous agents de contrast d'imatge, particularment aquells basats en nanopartícules (Bogart *et al.*, 2014). Entre elles destaquem nanopartícules com els *quantum dots*, o punts quàntics, que són partícules semiconductoras d'entre 1 i 10 nm de diàmetre amb propietats òptiques i electròniques úniques dependents de la seva forma i grandària. Poder ajustar acuradament aquestes propietats seleccionant, doncs, aquelles partícules amb les dimensions adients (és a dir, la tunabilitat que ofereixen) les ha posicionat com a candidates líders en molts tipus d'aplicacions no vinculats a l'àmbit nanomèdic, com per exemple en components electrònics (transistors) i òptics (LED, làsers), tot i que en destaca el potencial que tenen precisament com a sondes fluorescents en diagnòstic per imatge. Tot i així, els dubtes no resolts referents a la seva degradació i efectes toxicològics en limiten parcialment una futura aprovació com a eina de diagnòstic. Altres tipus de nanopartícules destacables són les metàl·liques (essencialment d'or i/o plata). De fàcil fabricació, i també amb una elevada tunabilitat, ofereixen prestacions similars tot i que són més estables a l'organisme i tenen una toxicitat menor. A més, són particularment interessants des d'un punt de vista també terapèutic, per a l'aplicació de tractament de calor (hipertèrmia local) generat intrínsecament a les partícules i que pot ser útil, per exemple, en oncologia. Altres nanopartícules, com les magnètiques, que poden ser dirigides a la zona d'estudi de l'orga-

nisme mitjançant l'ús de camps magnètics, són també un exemple representatiu que fusiona imatge i teràpia a partir del mateix principi. De fet, ja hi ha actualment la primera teràpia basada en nanotecnologia amb aprovació de la UE basada en l'ús d'hipertèrmia amb nanopartícules magnètiques per al tractament de tumors cerebrals (NanoTherm, de MagForce AG, www.magforce.de). En general, aquests i altres tipus de nanopartícules són candidats ideals com a agents en diagnòstic per imatge, ja que poden ser fàcilment modificables. La incorporació de diverses funcionalitats que promoguin la unió de fàrmacs (bé encapsulats a l'interior o ancorats a la superfície) i de receptors específics (per exemple, pèptids o anticossos) que dirigixin la partícula a la zona diana a visualitzar o tractar, les converteixen en sondes multimodals amb prestacions molt versàtils. Així, un únic sistema pot detectar, veure i administrar tractament de manera específica i localitzada, permetent idealment reduir la dosi de fàrmac administrada. Aquest concepte de nanosistemes multimodals, que poden integrar imatge, diagnòstic i tractament (concepte global anomenat *teranòstic*), es pot estendre a altres partícules que permetin combinar agents de contrast a l'interior, augmentar-ne l'estabilitat, millorar-ne la distribució en l'organisme, l'especificitat i selectivitat, etc., la qual cosa obre un ventall fascinant de possibilitats en el seu disseny. De manera global, aquests sistemes van clarament dirigits a potenciar la medicina personalitzada.

El diagnòstic *in vitro* es basa en l'anàlisi i detecció de biomarcadors específics indicatius de la presència o de la severitat d'una determinada patologia o condició en tot tipus de fluids biològics (sang, orina, saliva, llàgrimes, etc.). Les tècniques tradicionals emprades en l'anàlisi clínica, basades en processos ben establerts i en molts casos automatitzats, però duts a terme en laboratoris centralitzats, impliquen multiplicar les visites mèdiques per a la posterior discussió de resultats, per exemple, i s'allunyen del model cada vegada més demanat d'atenció assequible, amb resultats instantanis en qualsevol lloc i moment. Aquestes noves tècniques han de garantir uns nivells de sensibilitat suficients per proporcionar una detecció precoç, si és possible en els primers estadis de la patologia, i que permetin, en conseqüència, la presa de mesures terapèutiques adequades. Addicionalment, el diagnòstic *in vitro* hauria de possibilitar el seguiment o progressió de la malaltia en el moment en què es comença a aplicar el tractament. Actualment

hi ha una tendència ascendent a desenvolupar dispositius intel·ligents que proveeixin instrumentació compacta, però amb un nombre creixent de prestacions, i el camp de la salut representa un mercat immens d'expansió. Els biosensors i en particular els dispositius POC poden, en darrer terme, cobrir aquests requeriments.

Dispositius POC. El valor global del mercat diagnòstic amb POC és enorme i s'espera que assoleixi un valor de 36.960 milions de dòlars al 2021, amb un creixement anual del 9,8%.¹ Algunes àrees amb major projecció, tant per la seva rellevància clínica com pel nivell d'incidència en la població, inclouen els sensors de detecció de glucosa, de marcadors cardíacs, de malalties infeccioses, de drogues, tests de fertilitat/embaràs, marcadors de càncer, tests de colesterol o tests de coagulació. L'OMS va establir uns criteris que haurien de proporcionar els dispositius POC per a la detecció de malalties de transmissió sexual, però que podrien ser assimilables per a tot tipus d'aplicacions. La directriu és coneguda com a ASSURED en anglès, i inclou els següents criteris: *Affordable* (assequible); *Sensitive, Specific* (sensible i específic); *User-friendly* (fàcil d'emprar per personal no qualificat); *Rapid and Robust* (ràpid i robust); *Equipment free* (mínima o nul·la instrumentació) i *Delivered* (entregat a l'usuari final). La disponibilitat d'aquest tipus de dispositius permetria dur a terme, per exemple, cribratges ràpids i econòmics i deteccions de malalties especialment en localitzacions amb recursos limitats, que podrien ser prèvies a una confirmació de diagnòstic en l'àmbit hospitalari. Permetria també, en certes malalties, el control continuat de la patologia mitjançant el seguiment de biomarcadors, dut a terme directament pel pacient a casa, amb la consegüent disminució de costos per al sistema de salut. Els POC podrien primerament classificar-se en funció del resultat que aporten, diferenciant aquells pensats com a eines per a un primer cribratge o seguiment d'un procés crònic d'aquells pensats per ser ubicats en hospitals per dur a terme, per exemple, un seguiment més exhaustiu de condicions més complexes. En el primer cas tindriem, per exemple, POC per al control de sucre, embaràs, detecció de drogues, virus com HIV o hepatitis, entre d'altres, mentre que en el segon cas hi hauria dispositius més sofisticats amb capacitat per fer biòpsies líquides, com el dispositiu RainDrop^{Plus}™ (www.raindancetechn.com), analitzant sang per detectar cèl·lules o

trossos d'ADN cancerosos o el dispositiu Quanterix SR-X (www.querix.com) per a la detecció multiplexada (simultània) de fins a sis biomarcadors, seleccionats de la llista oferta per la companyia.

En termes generals, podem trobar dos tipus de dispositius POC: (1) aquells basats en tires reactives, en què la tècnica principal es basa en assaigs en flux lateral (*lateral flow assays*), essent-ne el test d'embaràs convencional l'exemple més distintiu, i (2) els dispositius biosensors pròpiament dits, en què l'exemple més conegut és el biosensor de glucosa, àmpliament estès en la societat i que requereix l'ús d'una petita gota de sang de l'usuari.

Assaigs en flux lateral. Les tires reactives estan habitualment fabricades en materials adsorbents, com paper o derivats de cel·lulosa, i contenen adsorbents diferents tipus de substàncies que, en entrar en contacte amb els marcadors que han de detectar, condueixen a un canvi generalment visual (canvi de color detectat a ull nu) (Koczuka i Gallota, 2016). El primer POC basat en aquest sistema data ja dels anys cinquanta, amb les tires reactives d'orina, que actualment detecten del pH de la mostra a la presència de glucosa, proteïnes, leucòcits, etc. La tira s'introdueix en la mostra durant uns segons, i aquesta flueix per capil·laritat fins arribar a les diferents zones de detecció, on s'estableixen reaccions químiques que condueixen a la generació de colors diferenciats. Avui dia, aquestes tires reactives es fonamenten principalment en la formació d'una reacció immunoquímica, és a dir, basada en el reconeixement específic del marcador per part d'anticossos. En aquest cas, la mostra migra per diverses zones de la tira, fins arribar a la zona de captura, on es revela la resposta.

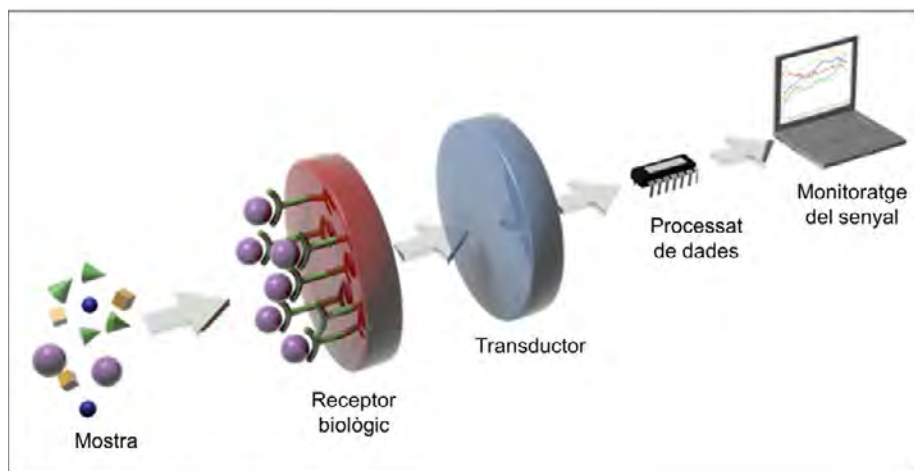
La gran especificitat inherent als anticossos expandeix la possibilitat de desenvolupar dispositius per a una gran varietat de molècules. Els seus principals avantatges són el baix cost, la rapidesa en la resposta (pocs segons o minuts), facilitat d'ús pels usuaris finals i el fet de no requerir instrumentació addicional. D'altra banda, en molts casos tenen una sensibilitat limitada, la reproductibilitat pot variar de lot a lot, i es tracta de detecció qualitativa, en què s'obté una resposta SÍ/NO (positiu o negatiu) sense proporcionar-ne dades quantitatives. A més, generalment, no admeten anàlisis multiplexades en les quals s'analitzi més d'un marcador simultàniament. Aquests factors poden ser limitants en moltes aplicacions o patologies concretes. De totes maneres, la nanotecnologia també hi ha influït i hi ha introduït millores, principalment a partir de la incorporació precisament de nanopartícules (metàl·liques o fluorescentes) com a marcadors addicionals que amplifiquen el senyal obtingut i, en conseqüència, la sensibilitat. Els exemples de POC basats en tires actualment al mercat inclouen el test d'embaràs o de fertilitat, essent probablement un dels més venuts mundialment i basat en la detecció de nivells hormonals, o més recentment, el test de detecció del virus HIV que detecta anticossos per al virus a la saliva, el test d'intolerància al gluten, que detecta anticossos específics, o el que detecta la ingesta de gluten en orina (la Figura 1 en mostra alguns exemples). D'altra banda, diverses companyies (DCN^{DX}, AlereTM Reader, Sofia 2 Analyzer de Quidel, BD Veritor Plus Analyzer de Becton Dickinson, Qiagen, Ellume, etc.) han desenvolupat lectors portàtils compatibles amb les tires, cosa que proporciona dades quantitatives i n'augmenta el potencial.

Biosensors. Els biosensors representen l'alternativa més potent en el desenvolupament de dispositius POC. Són dispositius integrats i autònoms constituïts per un element de reconeixement biològic (anticossos, enzims, proteïnes, sondes de DNA, cèl·lules, etc.) en contacte íntim amb un transductor, de manera que quan s'estableix una interacció entre el receptor immobilitzat i la molècula a detectar es produeix un canvi fisicoquímic a la interfase detectable pel transductor, que resulta en un senyal que pot ésser adquirit, amplificat i processat fins a obtenir informació quantificable (Figura 2). La combinació del component biològic, que aporta l'especificat necessària, amb transductors que integren principis físics que permeten assolir nivells de sensibilitat extremadament baixos, juntament amb la possibilitat d'automatització, facilitat d'ús i rapidesa de resposta, converteix els biosensors en eines molt potents en molts àmbits, però especialment en diagnòstic clínic. De fet, dins de l'àmbit dels POC, només els biosensors representaran un mercat de 33.000 milions de dòlars de cara al 2027, essent-ne el diagnòstic el principal impulsor del creixement.



† Figura 1. Exemples d'assaigs en flux lateral per anàlisi d'orina, detecció d'ingesta de gluten (GlutenDetect, de l'empresa Biomedal SL Espanya) o test d'ovulació (Clearblue[®], de l'empresa SPD Swiss Precision Diagnostics GmbH, Suïssa).

¹ <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/point-of-care-diagnostic-market-106829185.html>



† Figura 2. Esquema d'un biosensor que inclou la mostra, el receptor, el transductor i el sistema de processat de senyal.

Els avenços en nanotecnologia han facilitat enormement l'expansió en el terreny dels transductors, no sols pel que fa a millorar-ne la sensibilitat explotant nous principis físics que ocorren en la nanoescala, sinó també en la miniaturització dels components físics i electrònics (que en facilita la integració i la portabilitat) i en la capacitat d'anàlisi multiplexada, mitjançant la incorporació de sistemes microfluidics que permeten distribuir les mostres fent-les fluir d'una manera controlada i precisa. En molts casos es pretén dissenyar dispositius compactes, i fins i tot anar més enllà, fins a obtenir dispositius miniaturitzats del tipus *lab-on-a-chip* (que engloba la integració de diverses funcionalitats en un únic xip de pocs mil·límetres o centímetres amb una àmplia autonomia).

Els biosensors es poden classificar segons la naturalesa física del transductor, és a dir, pel tipus de canvi generat a la superfície un cop s'estableix la interacció específica. Els més habituals són els sensors electroquímics, òptics i nanomecànics. En els transductors electroquímics es produeixen canvis electroquímics en el medi i es mesuren canvis elèctrics en un elèctrode, com per exemple en el corrent (amperomètrics), en el potencial (potenciomètrics), en la conductivitat (conductimètrics) o en la impedància (impedimètrics) (Da Silva *et al.*, 2017). Generalment, empen enzims que proporcionen l'especificitat requerida, i es generen o consumeixen espècies com electrons, ions o compostos amb estats d'oxidació variable. Permeten nivells adequats de miniaturització; avui dia es tracta d'un dels tipus més

emprats, però els principals desavantatges provenen de la necessitat de recórrer a l'ús de marcadors o etapes que n'amplifiquin el senyal per tal d'assolir nivells de sensibilitat suficients i tenen una limitada capacitat multiplexadora. Van ser dels primers a desenvolupar-se, essent-ne el d'anàlisi de glucosa en sang, de tipus amperomètric i descrit el 1962, el primer i més reeixit exemple (tot i que la seva comercialització va trigar al voltant de trenta anys). La incorporació de nous nanomaterials que poden millorar-ne les prestacions, com ara el grafè, que ofereix extraordinàries propietats elèctriques i és de fàcil i econòmica fabricació, pot suposar una nova etapa en l'àmbit de sensors electroquímics, com demostra, per exemple, el recent llançament al mercat del primer biosensor basat en grafè i produït en massa (Agile R100, de Nanomedical Diagnostics, Inc, www.nanomedicaldiagnostics.com), tot i que actualment va dirigit a l'àmbit de recerca, i no a l'usuari final.

La tendència actual, però, indica que aquells biosensors amb més pes són els biosensors òptics. Els transductors òptics mesuren variacions en les propietats de la llum que es donen en produir-se la interacció molecular sobre la seva superfície, com ara les variacions en l'absorció, fluorescència o luminescència. Mentre que aquests canvis habitualment impliquen l'ús de marcadors que els generin, els dispositius òptics en els quals es mesuren canvis d'índex de refracció (IR) a la superfície del transductor ofereixen avantatges addicionals: (i) no requereixen marcadors, ja que la interacció amb el receptor immobilitzat a la superfície altera directament l'IR; (ii) els nivells de

sensibilitat són especialment elevats; (iii) ofereixen una major capacitat de miniaturització i, per tant, de ser integrats en dispositius *lab-on-a-chip*, que al seu torn facilita (iv) un volum de mostra especialment petit. El principi físic darrer d'aquest tipus de dispositius es basa en l'ona evanescent, que s'observa precisament a la nanoescala. Breument, les ones evanescentes es generen quan la llum que viatja a través d'un medi ho fa sota unes condicions tals que es produeix reflexió interna total (la llum incideix amb un angle determinat que fa que es transmeti a través de múltiples reflexions internes). Sota aquest règim, un cert component de la llum, anomenat camp evanescent, es propaga fora del medi unes poques desenes de nanòmetres. El camp evanescent és altament dependent de l'entorn, de manera que petits canvis en l'IR en aquesta zona (per exemple, en establir-se una interacció entre un receptor i un biomarcador) n'alteren les propietats que poden ser mesurades i relacionades amb el nombre d'interaccions. Aquest fenomen ofereix un nivell de sensibilitat enorme i ha estat àmpliament explotat en el disseny dels anomenats dispositius (nano)plasmònics i nanofotònics. Poden detectar canvis en l'IR de l'ordre del $10^{-5} - 10^{-8}$ unitats, que implica, en condicions òptimes d'anàlisi, deteccions de biomolècules de l'ordre de nM-fM, el que en la majoria de casos cobreix els requeriments necessaris en diagnòstic clínic. La detecció de la interacció no requereix amplificacions ni etapes addicionals, cosa que en facilita la mesura directa en mostres d'orina, plasma, o altres fluids humans. Permeten també realitzar mesures en temps real, i això fa que n'ampliï el tipus d'informació que se'n pot extreure. S'han desenvolupat diverses configuracions i dissenys (de materials i estructures), millorant-ne les prestacions en tres àmbits ja anomenats: sensibilitat, capacitat integradora de components (i, per tant, de miniaturització) i capacitat multiplexadora. Alguns dissenys empen transductors basats en superfícies metàl·liques d'or o plata, o bé planes de pocs nanòmetres de gruix (generalment entre 40-50 nm) o bé basades en nanoestructures de diverses formes també d'escala nanomètrica, i han donat lloc als biosensors plasmònics i nanoplasmònics, respectivament (Lopez *et al.*, 2017), en els quals s'explota el fenomen de ressonància de plasmó superficial (SPR) o localitzat (LSPR). Els biosensors SPR foren els primers a ser desenvolupats i avui dia estan àmpliament estesos i establerts tant en recerca com a nivell industrial en el camp farmacèutic i mèdic, i ofereixen infor-

mació clau en la caracterització d'interaccions proteïna-proteïna o en la detecció de biomolècules de tota mena (metabòlits, espècies com virus i bacteris, proteïnes, anticossos, RNA, DNA, etc.). Diverses empreses en comercialitzen avui dia diferents models (Biacore, BioNavis, Nicoya, Horiba, Bio-rad, entre d'altres) amb diferències en mides, sensibilitat i capacitat multiplexadora, tot i que en general es tracta de dispositius de dimensions mitjanes-grans que no es poden considerar POC. Els dispositius basats en LSPR tenen uns requeriments òptics més flexibles, la qual cosa permet dissenyar dispositius més compactes i amb una major versatilitat multiplexadora si es compara amb la configuració SPR. En aquest cas també es poden assolir nivells de sensibilitat majors modulant acuradament el disseny de les nanoestructures. La penetració en el mercat és avui dia molt més limitada en comparació amb els biosensors SPR. La companyia LamdaGen (www.lamdagen.com) n'és un exemple, tot i que en aquest cas tampoc no podem parlar de dispositiu POC; segueix tractant-se de productes dirigits essencialment a l'àmbit de recerca. Tot i així, malgrat que el progrés és lent, hi ha tendències que permeten augurar perspectives interessants en l'assoliment de dispositius plasmònics portàtils: (i) el disseny i fabricació controlada de multitud de nanoestructures susceptibles de ser explotades en LSPR, emprant processos dirigits a abaratir costos i augmentar-ne la reproductibilitat i producció en massa; (ii) el progrés en telefonia mòbil, tant en prestacions dels dispositius com en el desenvolupament d'aplicacions, que pot resultar una eina complementària en el desenvolupament de POC dins de l'àmbit de la salut, especialment en zones amb recursos limitats.

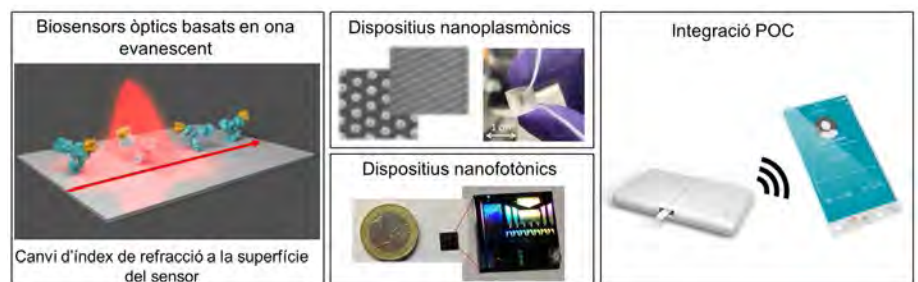
D'altra banda, els biosensors òptics nanofotònics de silici engloben els dispositius basats en òptica integrada, que inclou tots aquells processos de fabricació microelectrònica anàlegs als emprats en la fabricació de circuits integrats en l'electrònica tradicional (Estévez *et al.*, 2012). L'òptica integrada ofereix molta versatilitat en la fabricació de sensors pel que fa a materials (silici, òxid de silici, nitru de silici o polímers) i configuracions, i condueix a rendiments, fiabilitat, qualitat i robustesa elevats. A més, facilita la integració de totes les funcionalitats (òptica, química, electrònica i microfluídica) en el mateix procés de fabricació, cosa que n'expandeix les possibilitats de miniaturització. Els dispositius nanofotònics són els que avui dia ofereixen una major sensibilitat, que pot ser d'entre 2 i 3 ordres de mag-

nitud millor que, per exemple, el biosensor SPR. En particular aquest nivell de sensibilitat l'ofereixen els anomenats interferòmetres en diverses variants. Un d'ells, l'interferòmetre basat en guies bimodals, desenvolupat al nostre laboratori, presenta unes prestacions especialment atractives de cara a situar-se en la primera posició en l'àmbit sensor: sensibilitat màxima, capacitat multiplexadora (gràcies a un disseny i una fabricació optimitzada que permet, per exemple, obtenir en un procés desenes de xips que incorporin entre 4 i 16 sensors) i capacitat d'integració final.

En definitiva, la conjunció de diverses àrees com (i) disseny i fabricació de noves nanoestructures, (ii) caracterització amb tecnologies compatibles amb les seves dimensions, (iii) explotació dels fenòmens físics que en deriven, (iv) integració dels components (físics i microfluídics), (v) integració final dels components electrònics, *software* i *hardware* per tenir autonomia completa, esdevé clau per a l'obtenció de dispositius operatius. Tot i això, el seu potencial per ser implementats i arribar amb èxit al mercat depèn en gran mesura de la viabilitat de transferir mesures puntuals a escala de laboratori a anàlisis autònomes, fiables i reproduïbles en ambients descentralitzats. És en aquest sentit que el paper de la biologia i la química esdevenen igualment crucials de cara a explotar al màxim les seves prestacions. A continuació s'indiquen alguns exemples d'aplicabilitat de dispositius òptics en l'àmbit diagnòstic i biomèdic.

Aplicacions dels biosensors òptics en diagnòstic clínic. Les aplicacions compatibles amb els biosensors òptics abasten pràcticament tots els camps, des d'àmbits relacionats amb la vigilància mediambiental, control

i tractament d'aigües, seguretat alimentària, passant pel descobriment de nous fàrmacs fins arribar a l'àmbit de diagnòstic. Emprant un dispositiu nanoplasmònic desenvolupat al laboratori ha estat possible, per exemple, la detecció d'al·lèrgia a antibiòtics (a amoxicil·lina) mitjançant l'anàlisi directa de sèrum del pacient. En particular, el biosensor és capaç de detectar la presència d'immunoglobulines (IgE) generades per l'organisme en un brot al·lèrgic. En aquest cas, un xip modificat amb derivats de l'antibiòtic proporciona l'especificitat necessària per fer una quantificació precisa i fiable, que queda validada amb tècniques actualment emprades per aquest diagnòstic (Soler *et al.*, 2015). L'anàlisi només necessita una petita mostra de sang, cosa que en facilita una futura introducció a anàlisis rutinàries. Emprant un dispositiu molt similar, s'ha posat a punt una aplicació dirigida al monitoratge de la ingesta de gluten basat en la detecció de petits pèptids excretats en l'orina un cop metabolitzat el gluten. L'assaig és prou sensible per poder distingir pacients que han ingerit quantitats puntuals d'aliments amb gluten, el que el fa adient com a eina per al seguiment d'adhesió a una dieta lliure d'aquesta proteïna. Un assaig com aquest resulta molt interessant, ja que és no invasiu, és sensible i específic, i només requereix una petita mostra d'orina (Soler *et al.*, 2016). Aquests serien dos exemples que es poden fàcilment implementar en el mercat de manera àmplia, ja sigui en l'àmbit d'usuari final o en centres d'atenció primària. Pensant en la implementació de dispositius en escenaris amb recursos limitats, s'han desenvolupat aplicacions centrades en la detecció de tuberculosi en països en vies de desenvolupament, a partir de la detecció de biomarcadors específics (glicolípids, proteïnes i ADN) per a la di-



↑ Figura 3. (Esquerra) Esquema que mostra el principi físic de l'ona evanescent, base del funcionament dels dispositius nanoplasmònics i nanofotònics. (Centre) Exemples de sensors basats en aquest principi, on es veuen les dimensions que es poden assolir. (Dreta) Possible disseny de producte final tipus POC, amb el sensor integrat (cartutx extraïble per a la càrrega de la mostra) i potencial connectivitat per a l'enviament de dades.

agnosi ràpida de la malaltia en orina, sang o esput. S'ha treballat en aquesta línia amb dos biosensors, un plasmònic i un nanofotònic, amb la finalitat de, un cop assolida una integració completa i viable, possibilitar la transferència a mesures de camp. Un altre àmbit que requereix de manera creixent tècniques ràpides, sensibles, i sobretot específiques, és el de les malalties infeccioses. Detectar l'agent patògen amb rapidesa i identificar-ne la variant per esbrinar-ne la possible resistència a antibiòtics és una necessitat urgent, donat l'augment preocupant dels anomenats *superbacteris*, amb resistència a un espectre ampli d'antibiòtics. És igual d'important per millorar la diagnòstic de sèpsia, un procés d'elevada mortalitat el diagnòstic del qual no és sempre senzill ni ràpid. Una detecció precoç de la infecció pot permetre l'aplicació del tractament adient amb més celeritat, millorant-ne la perspectiva de recuperació del pacient. En aquest sentit, el potencial dels biosensors fotònics per detectar bacteris de manera directa, ràpida, a nivells relativament baixos (pocs bacteris per mL de mostra), s'ha demostrat a nivell de laboratori en mostres de pacients cirròtics (detecció d'*E. coli* en líquid ascític), emprant anticossos específics com a receptor immobilitzat al sensor. (Maldonado *et al.*, 2016). També la detecció de perfils de resistència a antibiòtics està sent subjecte d'estudi, ja sigui emprant receptors que siguin capaços de distingir entre una variant del bacteri resistent d'una convencional, o mitjançant la detecció de gens específics que codifiquin per mecanismes de resistència. En termes globals, traslladar dispositius d'aquest

tipus directament a l'hospital per analitzar de manera immediata mostres de pacients pot suposar un avenç clau en el diagnòstic avançat dels processos infecciosos, i això pot proporcionar un tractament antibiòtic dirigit, precís i immediat que ajudi a prevenir complicacions posteriors.

Conclusions i perspectives futures

En termes generals, l'assistència sanitària ha entrat en un nou paradigma, en el qual comença a predominar el concepte d'una medicina més personalitzada, centrada en el pacient. D'altra banda, l'augment de la població i el seu progressiu envelliment a nivell mundial, juntament amb la situació econòmica global, situa l'àmbit de salut amb una pressió pressupostària en certs casos insostenible. En aquest sentit, molts països s'enfronten a la realitat d'haver de controlar o reduir el pressupost destinat a l'assistència mèdica. Incentivar l'atenció duta a terme als centres d'atenció primària, descentralitzar les anàlisis per evitar multiplicar les visites mèdiques o facilitar i promoure la tele-assistència són tendències creixents que ajudarien a reduir despeses, tant en països desenvolupats com al Tercer Món, on facilitaria l'accés a l'assistència. En aquest sentit, eines de diagnòstic i tractament avançades que ofereixin precisió, rapidesa, especificitat, sensibilitat, a un cost assequible suposen un atractiu innegable. Els avenços en diverses branques de la ciència han permès progressar en gran mesura en aquest terreny, tal com queda clar en els exemples descrits aquí, i la nanotecnologia aplicada n'és un dels camps que més hi ha con-

tribuït. Els dispositius POC i en particular els nanobiosensors han demostrat el seu potencial, tot i que tret d'algunes excepcions reeixides ja comentades, en la majoria dels casos encara es troben a escala de laboratori. Continua essent necessari dirigir l'esforç a accelerar el trasllat d'aquests prototips a la pràctica clínica, la qual cosa es pot assolir aconseguint els nivells de miniaturització, autonomia i senzillesa d'ús necessaris per fer-los competitiu amb les metodologies tradicionals. La tendència global va indubtablement en aquest camí, i és esperable una presència creixent d'aquests dispositius a la vida diària en les properes dècades.

Bibliografia

- BOGART, L.K. [et al.] (2014). «Nanoparticles for Imaging, Sensing, and Therapeutic Intervention». *ACS Nano*, 8: 3107–3122.
- KOCZULA, K.M.; GALLOTTA, A. (2016). «Lateral Flow Assays». *Essays Biochem.*, 60: 111–120.
- DA SILVA, E.T.S.G. [et al.] (2017). «Electrochemical Biosensors in Point-of-Care devices: Recent Advances and Future Trends». *Chemelectrochem*, 4: 778–794.
- LÓPEZ, G.A. [et al.] (2017). «Recent Advances in nanoplasmonic biosensors: Applications and lab-on-a-chip Integration». *Nanophotonics*, 1: 123–136.
- ESTÉVEZ, M.-C. [et al.] (2012). «Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing Applications». *Laser Photon. Rev.*, 6: 463–487.
- SOLER, M. [et al.] (2015). «Highly sensitive dendrimer-based nanoplasmonic biosensor for drug allergy diagnosis». *Biosens. Bioelectron.*, 66: 115–123.
- SOLER, M. [et al.] (2016). «Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up». *Biosens. Bioelectron.*, 79: 158–164.
- MALDONADO, J. [et al.] (2016). «Label-free bimodal waveguide immunosensor for rapid diagnosis of bacterial infections in cirrhotic patients». *Biosens. Bioelectron.* 2016, 85: 310–316.