

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**BIOSENSORES Y BIOCHIPS:
HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO
Y LA TERAPÉUTICA**

DISCURSO DEL

EXCMO. SR. DON FIDEL ORTEGA ORTIZ DE APODACA

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 11 DE MAYO DE 2006
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DEL

EXCMO. SR. DON VICENTE VILAS SÁNCHEZ



MADRID 2006

A mi querida madre

ÍNDICE

	Pag.
SALUTACIÓN Y AGRADECIMIENTOS.....	1
ELECCIÓN DEL TEMA.....	7
BIOSENSORES.....	8
Clasificación de los biosensores	11
MATERIALES, HERRAMIENTAS Y TÉCNICAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE BIOSENSORES	12
Materiales básicos empleados	12
Fibras ópticas	12
Electrodos.....	14
Nanotubos y nanocables.....	15
Técnicas de microfabricación.....	16
Marcadores fluorescentes y nanopartículas	19
Metodologías de señalización basadas en transferencia de energía	23
ELEMENTOS BIOLÓGICOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	27
Sensores biocatalíticos.....	28
Enzimas	28
Células, tejidos y orgánulos subcelulares.....	29
Sensores de bioafinidad.....	30
Anticuerpos	31
Receptores y canales iónicos.....	32
Lectinas	33
Células.....	33
Ácidos nucleicos	34
Aptámeros	34
Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).....	35
Polímeros de impresión molecular.....	35
Métodos de inmovilización	36

Métodos de inmovilización física	39
Adsorción.....	39
Atrapamiento	40
Métodos de inmovilización química	41
Inmovilización mediante enlace covalente	41
Inmovilización a través de una capa intermedia.	42
SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN.....	44
Transductores electroquímicos	44
Biosensores amperométricos.....	45
Biosensores potenciométricos	46
Biosensores conductimétricos e impedimétricos	47
Biosensores de efecto de campo	48
Transductores ópticos	49
Optrodos.....	50
Resonancia de plasmones superficiales (SPR).....	51
Resonancia de espejos.....	52
Interferómetros.....	53
Reflexión interna total de fluorescencia.....	54
Transductores másicos.....	55
Transductores termométricos	56
Transductor magnético	57
Transductor nanomecánico.....	58
APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES	59
Composición y biocompatibilidad.....	69
LOS BIOCHIPS.....	71
Nomenclatura y clasificación	73
Métodos de fabricación	75
Chips de ADN	76
Gene chip de Affimetrix.....	77
HyChip® de Hyseq Inc.....	79
Incyte Pharmaceuticals Inc (Synteni).....	80
Microarrays de proteínas	82
Clases de microarrays de proteínas	86
DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICA	87
Diagnóstico a través del perfil de expresión genética.....	88
Diagnóstico a través del análisis del genotipo.....	93
Diagnóstico a través del perfil proteómico.....	94
Información genética y utilidad terapéutica	97
Integración y estandarización de los datos.....	99
EPÍLOGO	100
DISCURSO DE CONTESTACIÓN.....	107
REFERENCIAS.....	119

Excmo. Sr. Presidente

Excmas. y Excmos. Sras. y Sres. Académicos

Señoras y Señores

Soy plenamente consciente de que hoy he llegado hasta aquí gracias a la generosidad de los miembros de esta Academia y muy especialmente por la que han demostrado los Excmos. Sres. Académicos D. Antonio Doadrio López, D. Vicente Vilas Sánchez y D. José Miñones Trillo, quienes confiaron en mi persona y currículum para que su propuesta prosperara.

La generosidad hacia mi persona ha sido, sin lugar a duda, una constante que he disfrutado y compartido con quienes me han acompañado a lo largo de mi vida, tanto en el plano profesional como personal. Quizás porque ha sido uno de los principales valores que mi familia me ha inculcado y que luego he buscado y proyectado en los demás y hacia los demás.

Debo y quiero aprovechar este acto y esta tribuna para agradecer a todos los que han hecho posible este acontecimiento, particularmente a mi padre, quien ha dirigido mi carrera desde el mismo día en que decidí estudiar la licenciatura en Farmacia. De él he aprendido que la ciencia representa entrega y pasión por descubrir y crear, así como que el esfuerzo continuado es el compañero principal del científico, al margen de los premios y reconocimientos.

Recuerdo con gran claridad que siendo niño mi padre solía llevarme las tardes de domingo a los jardines de las proximidades de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, por aquel entonces la única que existía en Madrid. Allí coincidíamos con el Profesor Doadrio y su familia, y mientras ellos, nuestros padres, supervisaban alguna actividad, nosotros correteábamos por el plácido entorno de la Facultad. Son momentos de infancia que, sin duda, recordará también nuestro actual Secretario de esta Academia, el Profesor Doadrio Villarejo. Allí, junto a la memorable escultura de Anna Hyatt Huntington, los portadores de la antorcha, entendí que mi futuro siempre estaría ligado a continuar la labor de mis maestros en general y en particular la de mi propio padre. Profecía que se está cumpliendo con exactitud matemática.

Es de justicia reconocer también el derroche de generosidad que los profesores de la Facultad de Farmacia me brindaron durante mi paso por la Universidad y de los cuales guardo un grato recuerdo, tanto por su aportación a mi formación académica como individual. Me estoy refiriendo a los tristemente desaparecidos Profesores Santos Ruiz, Hoyos de Castro, Gómez Serranillos, Otero Aenlle, Folch Jou, Casares López, Villanúa Fungairiño y García Puertas. Otros de los profesores que contribuyeron a mi formación y a quienes quiero manifestar mi más sincero agradecimiento son el Profesor Doadrio López, el Profesor Varela Mosquera, la Profesora Avendaño López y el Profesor Fernández Galiano. Y como no, puesto que su influencia sobre mí ha sido determinante en muchos aspectos de mi vida, mi agradecimiento más especial al Profesor Vilas Sánchez y al Profesor del Castillo García. Ellos no solamente se han preocupado de mi aprendizaje, sino que además me han regalado su sabiduría más exclusiva y lo más importante, su amistad.

En mi etapa predoctoral mi agradecimiento a los compañeros del laboratorio de Técnicas Instrumentales de la naciente Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá, al que me incorporé en unos momentos en el que nuestro entusiasmo colectivo determinó su continuidad como una Universidad creíble y con identidad propia.

La juventud y el ambiente de compañerismo caracterizaron el trabajo en el Departamento, con importantes logros científicos que contrastaban con la escasez de medios disponibles entonces, aunque magistralmente administrados por el Profesor Ortega Mata, Catedrático y Decano de la Facultad.

Además, en aquellos momentos, nos vimos obligados a participar en numerosas actividades de gestión y representación que, en lo que a mí respecta, acabaron conduciéndome a tomar parte en el Gobierno de la Facultad, primero como Secretario y Vicedecano de la misma durante 13 años, con el entonces Decano, D. Vicente Vilas Sánchez, para continuar, después, como Decano tras su jubilación y como heredero de su gran obra al frente de la Facultad de Farmacia.

A lo largo de los años de dedicación al Decanato, he tenido la oportunidad de enriquecerme como persona, fundamentalmente por la inmensa suerte de haber compartido tareas de responsabilidad con compañeros tan excepcionales como lo han sido la Dra. Rodríguez Caabeiro, el Dr. Álvarez-Builla Gómez, la Dra. Jiménez González y el Dr. Zaragoza García, así como con los prematuramente desaparecidos y también Vicedecanos, el Dr. Masoud Musa y el Dr. Granero Ribelles. En mi etapa más reciente, mi agradecimiento más sincero a los que me han acompañado como miembros en el equipo decanal que tengo el honor de dirigir, la Dra. Burgos García, Dra. Guinea López, Dra. Lastra González y los Doctores Guzmán Navarro y Gómez Rubio, sin olvidarme de nuestra siempre eficiente y fiel secretaria, Bertha Argüeso.

También quiero expresar mi agradecimiento a los que han influido de modo determinante en que adquiriera madurez investigadora, la Profesora Domínguez Cañas y el Profesor Lo Gorton, así como a mis colaboradores más directos en esta tarea, la Dra. Ballesteros González y el Dr. López Gil.

Y quisiera finalizar este apartado de agradecimientos refiriéndome a mis familiares más directos, en quienes he encontrado el refugio necesario para recobrar las fuerzas en los momentos más difíciles y con quienes he contraído una deuda de gratitud impagable. Por ello gracias a mi mujer Celia y a mis hijas Celia y Sara, que han aprendido a sobrellevar mis repetidas ausencias y a soportar los cambios de humor que ello me supone, y a mis hermanos Begoña, Manuel, Antonio y especialmente a Pepa, que ha vivido con tanto entusiasmo como yo, si cabe, este nombramiento.

El sillón que voy a ocupar lo dejó vacante, aunque no vacío, el Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero, ya que su legado permanecerá entre nosotros y entre las paredes de esta Real Institución.

Don Pablo, para quienes lo conocimos, respetábamos y admirábamos su quehacer científico y académico, poseía la medalla nº 22, e ingresó en esta Real Academia en el año 1983, leyendo el magnífico discurso titulado “*Desarrollo y Alcance de las Técnicas Polarográficas*”. Un auténtico manual de referencia de estas técnicas instrumentales que, por su carácter didáctico, todavía continúa vigente para los que nos movemos en el ámbito del análisis instrumental.

D. Pablo perteneció a esa estirpe de luchadores que se encontraron con la obligación de levantar un país paralizado después de una guerra. Su capacidad y espíritu de lucha lo llevaron a ocupar los niveles más altos en la jerarquía académica, llegando a desempeñar el cargo de Rector en la Universidad de Santiago de Compostela, con liderazgo y brillantez.

Como científico destacó por sus aportaciones en la investigación en métodos polarográficos de análisis, participando en la Escuela de Polarografía de la Facultad de Farmacia de Madrid, dirigida por el Profesor Portillo, de la que salió un elenco de magníficos investigadores. En su etapa en la Universidad de Santiago de Compostela, D. Pablo integró el laboratorio de polarografía de la Facultad de Farmacia en el Departamento de Investigaciones Químicas Farmacéuticas del CSIC, lo que supuso un gran empuje para el mismo y la potenciación de sus logros.

No obstante, la polarografía no fue la única línea en la que investigó el Profesor Sanz Pedrero. Su estancia en la Universidad de Uppsala, en Suecia, le permitió también familiarizarse con las técnicas de electroforesis y ultracentrifugación, de la mano directa de dos premios Nóbel como fueron Arne Tiselius y Theodor Svedberg.

De regreso a la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense en el año 1978, se incorporó como catedrático de Técnicas Instrumentales donde alcanzaría su jubilación en el año 1986, aunque continuó como Profesor emérito hasta octubre de 1994. Desde entonces su dedicación a la Real Academia fue constante, desarrollando una importante labor, especialmente en la Sección de Física y Química. Desgraciadamente su gran fortaleza se fue debilitando como consecuencia de su enfermedad, hasta que falleció el 10 de junio de 2004, en la ciudad de Valladolid.

Dada la amistad que Don Pablo tenía con mis padres, mi relación con él, como con tantas otras ilustres personalidades del mundo de la Farmacia y del entorno universitario, se extendió más allá de lo meramente académico, comenzando prácticamente desde mi infancia. Es más, como buen amigo de la familia, D. Pablo asistió a mi propio bautizo.

Don Pablo imponía un respeto reverencial sin duda incrementado por su imponente presencia. Ante sus alumnos y colaboradores mostraba un carácter aparentemente duro, sin embargo, en el trato familiar era un hombre afable y bondadoso, que siempre tenía un comentario cariñoso para nosotros, los hijos de sus colegas, compañeros y amigos.

Tengo la seguridad de que D. Pablo habría visto con agrado que su lugar lo ocupara alguien, como yo, a quien apreciaba y a quien en numerosas ocasiones mostró su cariño y simpatía.

ELECCIÓN DEL TEMA

El espectacular avance que las tecnologías ómicas ha experimentado en los últimos años y que recientemente ha sido recogido en una excepcional monografía publicada por esta Real Academia,¹ ha abierto un panorama sin precedentes para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico clínico y de pautas terapéuticas, que revolucionará en un futuro, no muy lejano, el mundo de la Medicina y de la Farmacia.

Parece evidente que el uso de medicamentos estará cada vez más vinculado al empleo de ensayos analíticos, que nos permitan comprobar la eficacia e inocuidad de los mismos. La selectividad de los tratamientos requerirá el diagnóstico genético previo o la comprobación del perfil proteómico en particular, para poder abordar de manera individualizada cada enfermedad. En la actualidad ya se utilizan terapias selectivas apoyadas en este tipo de pruebas, como por ejemplo, el empleo del fármaco *Gefitinib* (Iressa), eficaz frente al cáncer de pulmón, aunque solamente válido para un tipo de cáncer con una mutación genética específica, presente sólo en un 10% de los tumores,² o como el fármaco BiDil (isosorbida dinitrato/ clorhidrato de hidralazina) únicamente útil en un determinado grupo de enfermos afro-americanos, para el tratamiento de una enfermedad coronaria específica.³ Otros medicamentos como la Warfarina necesitan dosis personalizadas, dado que su metabolismo puede verse enormemente afectado por las variaciones habidas en la familia de enzimas del grupo citocromo P450, muy dependientes de la configuración genética de cada individuo.⁴ Para conocer dichas variaciones existen ensayos rápidos que nos permiten administrar la dosis apropiada para cada paciente o seleccionar el fármaco más adecuado para cada caso.

Diagnóstico y terapéutica, por tanto, se combinan en una nueva práctica conocida como “teranóstica”⁵, en la que el descubrimiento de nuevos biomarcadores juega un papel determinante. La química analítica, a través de la combinación de diversas técnicas, ofrece herramientas de indiscutible valía para este objetivo y entre ellas, los Biosensores y los *Biochips* se perfilan como los ingenios de futuro que jugarán un papel de importancia fundamental, como refuerzo, en la implantación de la medicina personalizada.

En el presente discurso pretendo conjugar el pasado, presente y futuro de estos dispositivos y constatar su natural evolución desde los prototipos a macro escala inicialmente diseñados, hasta los más novedosos y prometedores artilugios fruto de la micro y nanofabricación.⁶

BIOSENSORES

En el año 1985, el mercado mundial de los biosensores fue cuantificado en 5 millones de dólares. Hoy sobrepasa la cifra de 5.000 millones. Recientemente la revista *Biosensor and Bioelectronics* ha celebrado su vigésimo aniversario y para conmemorarlo ha dedicado una de sus publicaciones a analizar el panorama que justifica este incremento, con una serie de revisiones y publicaciones que finalizan con un análisis crítico sobre la investigación en este campo. Como el Dr. Anthony P.F. Turner⁷ observa en el prefacio de dicha publicación, el extraordinario éxito de los biosensores se debe, sin lugar a duda, a la naturaleza estratégica de su utilización, capaz de combinar la investigación básica más imaginativa con el objetivo, eminentemente práctico, de generación de riqueza y muy especialmente de mejora de la calidad de vida. Un atractivo adicional para la investigación en biosensores radica en su naturaleza multidisciplinar que demanda no sólo experiencia en química, física, biología o ingeniería, sino también un profundo conocimiento de las áreas en las que los biosensores se aplican, donde se encuentran el campo farmacéutico, el control de los alimentos, el control medioambiental, la seguridad y defensa, además del importante campo de la clínica y el cuidado de la salud. Todo ello unido al dominio del entorno comercial en el que dichos biosensores se utilizarán.

De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo.⁸ No debe confundirse con un sensor químico implantado en una matriz biológica para obtener datos de la misma, ya que si carece del elemento biológico no se corresponderá con un biosensor.

Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas, son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta

que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste, entre otras.

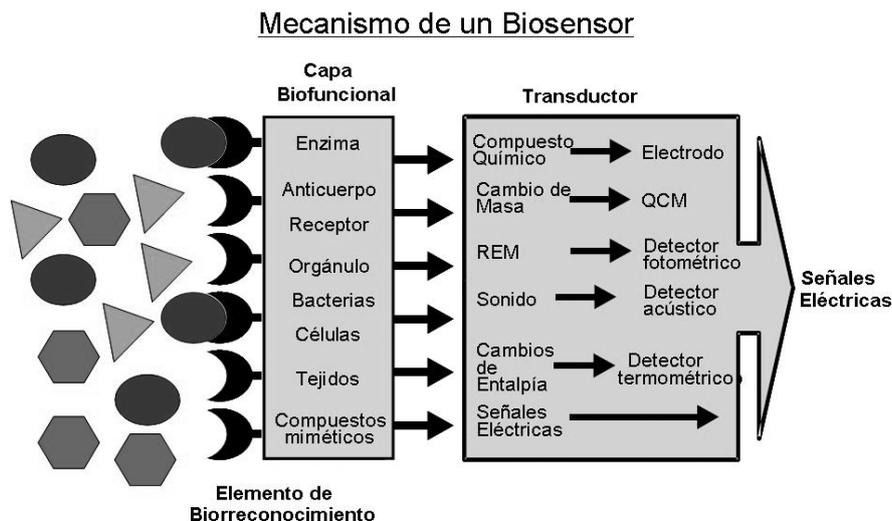


Figura 1. Mecanismo de funcionamiento de un Biosensor, incorporando los diferentes componentes que pueden integrarlo.

De acuerdo con Turner, el pionero en establecer este concepto de biosensor, entendido en los términos arriba indicados, fue el profesor Leland C. Clark Jr., quien basándose en el empleo del electrodo de oxígeno,⁹ sugirió la oportunidad de incrementar las posibilidades analíticas de los sensores electroquímicos, “*volviéndolos más inteligentes*” mediante la incorporación de una enzima atrapada con una membrana semipermeable. Este concepto fue ilustrado con un experimento en el que la enzima glucosa oxidasa fue confinada en la proximidad del electrodo, mediante una membrana de diálisis, observando que su respuesta era proporcional a la concentración de glucosa.¹⁰ En esta publicación Clark y Lyons acuñan el término “electrodo enzimático” para describir este tipo de biosensor que posteriormente implementaron Updike y Hicks.¹¹ En el año 1975 fue comercializado con éxito por la compañía *Yellow Springs Instrument (Ohyo)*, como analizador de glucosa basado en la detección amperométrica del peróxido de hidrógeno. Ese mismo año Divis publicó la primera aplicación de los biosensores que incorporaban

microorganismos para la determinación de etanol.¹² Desde entonces el desarrollo de los biosensores ha sido espectacular, muy especialmente en el campo del diagnóstico clínico, con un gran éxito de los biosensores para glucosa, extendiéndose con fuerza a los sectores estratégicos anteriormente indicados. Basta mencionar que, en enero de 2006, la búsqueda a través de la *ISI Web of Knowledge* del término “Biosensor” localizó 21.124 publicaciones, de las cuales 10.454 correspondían a los últimos cuatro años, lo que da idea del avance exponencial de la investigación en este área.

Actualmente el desarrollo de biosensores compromete a diferentes campos de investigación que convergen en tres líneas fundamentales: elementos de reconocimiento molecular, herramientas y técnicas para su construcción y diseño de dispositivos sensores básicos.

Como elementos de reconocimiento se han utilizado numerosos instrumentos biológicos, desde los más simples, como las enzimas, hasta los más novedosos productos de la ingeniería genética y los derivados artificiales de síntesis. Las nacientes, pero cada vez más consolidadas técnicas de microfabricación, incluidas las de fabricación a nanoescala, han abierto un panorama de gran porvenir para el desarrollo y aplicación de los biosensores, dada la reducción de costes que la miniaturización conlleva y la posibilidad de producirlos a gran escala.

Los nuevos diseños y la utilización de novedosas herramientas, como el empleo de Polímeros Conductores,¹³ las películas polimerizadas favorecidas mediante plasma (PPFs)¹⁴ o las partículas magnéticas bacterianas (BMPs),¹⁵ han conducido también a una mejora de las capacidades y propiedades de los biosensores. Los avances en los nuevos sistemas de transducción de las señales, como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), la resonancia de plasmones superficiales (SPR), la introducción de la microfluídica y la electroforesis capilar miniaturizada en chip, así como el espectacular grado de perfeccionamiento de los biochips para el análisis de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, auguran un futuro muy prometedor para estos dispositivos.

Uno de los aspectos más críticos de los biosensores y en especial cuando se trata de multisensores, cada vez más empleados, es el posterior tratamiento de los datos para obtener una respuesta coherente y útil. Para ello se utilizan métodos de análisis multiparamétricos. Estos métodos recogen toda la información que se obtiene de los sensores, seleccionan

aquella que puede ser más significativa y mediante algoritmos para reconocimiento de patrones interpretan las señales de todos los sensores. Entre ellos se recurre a diferentes métodos matemático-estadísticos, como las redes neuronales (*artificial neural networks, ANN*), el análisis de componentes principales (*principal component analysis, PCA*), los mínimos cuadrados (*partial least squares, PLS*), el análisis discriminante (*Discriminant Analysis DA*), etc., que presentan características distintas en cuanto al tratamiento de los datos. En el reconocimiento de patrones, el sistema sensor es expuesto a diferentes concentraciones de los analitos, que se supone tendrá la matriz de la muestra, para que establezca modelos de respuesta, en un proceso que es como un entrenamiento del sistema. Las respuestas en función del tipo de analito deben ser almacenadas en una base de datos, para su procesamiento posterior.

Clasificación de los biosensores

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, como el modo en que interaccionan el elemento de reconocimiento y el analito, la metodología de detección empleada para concretar dicha interacción y la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema de transducción.

Criterios de clasificación de los biosensores	
Mecanismo de interacción	Metodología de la detección
Catalítico	Directa.
Afinidad	Indirecta
Sistema de reconocimiento	Sistema de transducción
Enzima.	Electroquímico.
Orgánulo, tejido o célula.	Óptico
Receptor biológico.	Piezoeléctrico.
Anticuerpo	Termométrico
Ácidos nucleicos.	Magnético
PIM, PNA, aptámero	Nanomecánico.

MATERIALES, HERRAMIENTAS Y TÉCNICAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE BIOSENSORES

La selección de los materiales y técnicas de fabricación son determinantes para el adecuado funcionamiento de un biosensor. Por ello es por lo que el desarrollo de estos dispositivos va aparejado inevitablemente al avance tecnológico, a la investigación en nuevas moléculas de reconocimiento, a las modernas técnicas de inmovilización, los progresos en los sistemas de transducción, miniaturización y nanotecnología, las metodologías de señalización y a la investigación con los materiales de última generación, como los nuevos copolímeros que permiten una mayor compatibilidad de uso en las variadas matrices en las que los biosensores pueden utilizarse.

Materiales básicos empleados

Fibras ópticas

Se podría decir que las fibras ópticas son como “cables de luz” dado que la radiación electromagnética puede ser eficientemente transportada a través de las mismas, siempre y cuando cumplan con una serie de características.

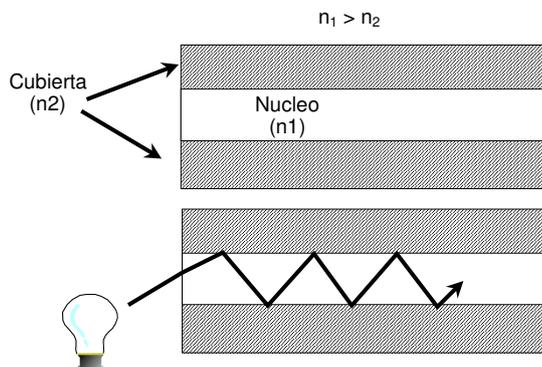


Figura 2. Fibras ópticas y el fenómeno de reflexión interna total (TIR).

Están fabricadas normalmente de algún tipo de cristal transparente (normalmente sílice) u otro compuesto de naturaleza polimérica y poseen una estructura central o núcleo con un índice de refracción determinado,

rodeado de un recubrimiento cuyo material posee un índice de refracción ligeramente inferior al anterior. Esta diferencia en el valor de los índices de refracción determina la apertura numérica de la fibra y está relacionada con la capacidad de ésta para poder transmitir las radiaciones que sobre ella inciden con un ángulo determinado.

La radiación que penetra en una fibra se transmite en ella en virtud del fenómeno de reflexión interna total (*total internal reflection –TIR–*), siempre que el ángulo de incidencia (θ) de dicha radiación sea superior al ángulo límite, determinado por la relación $[\text{sen}\theta = n_1/n_2]$, siendo n_1 y n_2 los índices de refracción del núcleo y del recubrimiento respectivamente. No obstante, no es éste el único requisito para que la radiación se transmita a su través, ya que dado el carácter ondulatorio de la radiación electromagnética, el camino óptico en el interior de la fibra deberá ser igual a un número entero de longitudes de onda, puesto que de otro modo la interferencia destructiva provocará su atenuación progresiva.

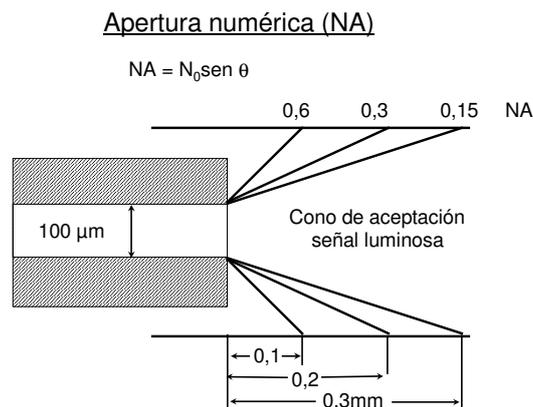


Figura 3. Fibras ópticas, apertura numérica y cono de aceptación de luz .

El número de distintas longitudes de onda que la fibra óptica puede transportar dependerá del diámetro del núcleo central y de la relación de los índices de refracción de éste y del recubrimiento. En este sentido las fibras podrán ser fibras monomodo o multimodo en función de su capacidad para guiar una o varias longitudes de onda.

Cuando se utilizan en la construcción de biosensores, las fibras ópticas pueden emplearse como simples guías de luz que recogen la radiación emitida por un marcador fluorescente, o simplemente la radiación

dispersada por una suspensión de partículas y que revela alguna interacción o reacción catalítica en la proximidad inmediata de la fibra, o bien formar parte del propio dispositivo, albergando en su estructura el elemento de reconocimiento. En el primer caso se utiliza el extremo final de la fibra al que se acoplará el sistema biocatalítico o de afinidad, normalmente mediante membranas, y será determinante la apertura numérica de la fibra, definida por la fórmula $[NA = n_0 \text{sen}\theta]$, siendo n_0 el índice de refracción del medio en el que se encuentra la muestra. En la segunda opción el elemento de reconocimiento es inmovilizado sobre la parte lateral de la fibra, retirando el recubrimiento en una zona determinada de ésta. (Fig. 4.)

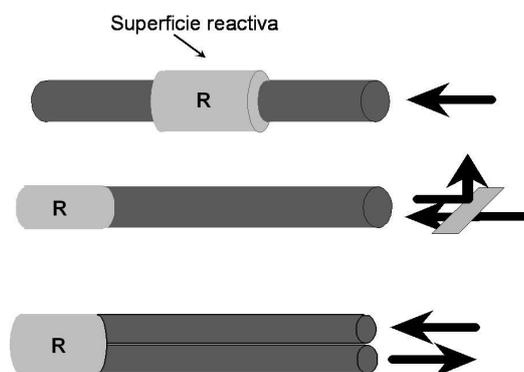


Figura 4. Modelos de incorporación de elementos de reconocimiento sobre fibras ópticas para su utilización como biosensores.

Electrodos

El material soporte utilizado para la fabricación de los electrodos empleados como biosensores electroquímicos puede ser, un metal noble (oro o platino), carbono (varillas o pasta), aunque también se emplean composites conductores¹⁶ preparados a partir de diferentes materiales como polvo de grafito dispersado sobre un polímero de resina epoxi, silicona, metacrilato o poliuretano.¹⁷ Últimamente también ha cobrado gran interés el uso de sales y polímeros orgánicos conductores, ya que proporcionan una matriz con características muy adecuadas para la inmovilización de compuestos biológicos. Conocidos también como metales sintéticos, son polímeros orgánicos con cualidades y capacidades

eléctricas y ópticas extraordinarias. Se trata de materiales poliheterocíclicos como el polipirrol, también llamado “pirrol negro”¹⁸, si bien se han sintetizado también otros derivados conductores como polifuranos, poliindoles, policarbazoles y polianilinas entre otros. Estos polímeros son utilizados extensamente en el desarrollo de biosensores electroquímicos en numerosas aplicaciones,¹⁹ como los electrodos fabricados a partir de una película flexible de polipirrol dopada con polianiones y una capa microporosa de negro de platino.²⁰

Nanotubos y nanocables

Los nanotubos y nanocables son estructuras nanométricas que pueden ser de carbono o de materiales semiconductores como el silicio o el boro dopado. Presentan una serie de propiedades que fundamentan el interés que han despertado en numerosas aplicaciones tecnológicas. Son sistemas ligeros, huecos y porosos que tienen alta resistencia mecánica y por tanto interesantes para el reforzamiento estructural de materiales y formación de composites de bajo peso. Presentan alta resistencia a la tracción y están dotados de gran elasticidad. Electrónicamente, se ha comprobado que los nanotubos se comportan como hilos cuánticos ideales con características de aislante, semiconductor o metálico dependiendo de los parámetros geométricos de los tubos.

Nanocables de silicio con su superficie modificada con 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) se han utilizado como sensores para la determinación del pH en una configuración tipo transistor efecto de campo (FET),²¹ en virtud de la variación que experimenta el nanocable en el valor de su conductancia en presencia de iones hidrógeno. De forma análoga se ha demostrado también su bioactividad, en nanocables funcionalizados con biotina que modifican su conductividad en presencia de estreptavidina.²²

El empleo de estas estructuras posibilita construir sensores con capacidad para detectar la unión de una molécula o incluso de una partícula de virus.²³

Los nanotubos de carbono están constituidos por redes hexagonales curvadas y cerradas, formando tubos de tamaño nanométrico. Sus dimensiones y propiedades químicas los convierten en un material ideal para su empleo en la construcción de biosensores, tanto de pared única

(SWNT- *single wall nanotube*)²⁴ como de pared múltiple (MWNT). Así se han confeccionado biosensores electroquímicos de glucosa, utilizando glucosa oxidasa inmovilizada, sin apenas pérdida de su actividad enzimática y con una capacidad catalítica un orden de magnitud superior a los electrodos de carbono microscópicos convencionales. Este incremento de sus prestaciones se debe por un lado a una mayor capacidad de carga enzimática y por otro, a la mayor eficacia en la comunicación eléctrica del nanotubo.²⁵

Estos elementos presentan también la ventaja de que pueden utilizarse en dispositivos integrados, como por ejemplo una configuración *array* de biosensores amperométricos, a partir de la alineación de nanotubos de carbono de pared múltiple sobre un sustrato de platino.²⁶

Técnicas de microfabricación

En la actualidad estas técnicas son unas herramientas imprescindibles para la fabricación de biosensores, especialmente para su integración en dispositivos miniaturizados y su producción a gran escala a nivel industrial, como los *Biochips*.

Los métodos de microfabricación incluyen tecnologías húmedas, como la fotolitografía, grabado al aguafuerte y galvanizado o tecnologías secas como el grabado convencional, la electrodeposición anódica y serigrafiado (*screen-printing*). Entre los materiales soporte más utilizados se encuentran el vidrio, el cristal, el silicio y el plástico, sobre los que se generan los materiales que se emplearán en la construcción de los biosensores.

Las técnicas más comunes para producir los sustratos conductores que se utilizan como electrodos son la impresión, la deposición electroquímica, la polimerización, la polimerización favorecida por plasma y la fotolitografía.

Los **métodos de impresión** permiten extender una fina capa del material electródico directamente sobre una superficie determinada, utilizando para ello una máscara que servirá de molde de impresión diseñado de forma previa. Ello posibilita preparar electrodos multicanal en un espacio reducido, para la determinación simultánea de varios analitos, tanto en aplicaciones potenciométricas como amperométricas. De hecho pueden prepararse biosensores impresos, como el diseñado por Khan,²⁷ que

utilizó una pasta preparada a partir de una mezcla de glucosa oxidasa adsorbida sobre un complejo de transferencia de carga cristalino de naturaleza orgánica, con un elemento de enlace y un disolvente. Esta pasta se imprime posteriormente sobre un sustrato y se seca en cámara de vacío. Finalmente una delgada capa de gelatina es extendida sobre el electrodo. Este biosensor proporciona una respuesta exenta de interferencias debidas al oxígeno disuelto con una respuesta lineal para glucosa hasta 100 mM.

Las otras técnicas arriba indicadas generan películas delgadas que se utilizan en los biosensores para crear mono o multicapas de láminas conductoras sobre la superficie del sustrato soporte, con la finalidad de conseguir una comunicación eléctrica directa entre el lugar donde se produce la reacción catalítica y el material que constituye el soporte.

La **deposición electroquímica** o tradicional puede utilizarse para depositar una capa electroconductora sobre un sustrato soporte, que puede ser una lámina metal como el platino o bien un material catalítico como el óxido de titanio (TiO) o también un complejo metálico. Conjuntamente se puede acoplar un material biológico durante la electrodeposición, que permitirá diseñar diferentes biosensores.²⁸

La **polimerización** tiene lugar por la condensación de pequeñas moléculas sobre monómeros o por la generación de radicales libres que reaccionan reconfigurando los enlaces dentro de cada monómero. Los radicales libres se producen cuando se rompen los dobles enlaces debido a un proceso iniciado mediante una activación térmica, fotoquímica o electroquímica. Es posible obtener una adecuada conductividad eléctrica mediante la adición de polvo de metal en el monómero antes de que se realice la polimerización o bien a través de los electrones no conjugados en el monómero. Una técnica novedosa permite generar una película delgada de azul de polimetileno modificado sobre electrodos de oro, para formar una capa conductora electrocatalítica activa en contacto íntimo con la superficie del electrodo.²⁹ Este proceso permite emplear un reducido potencial de sólo 200 mV y evitar la interferencia de especies co-oxidables con una contaminación electródica mínima.

La **polimerización favorecida por plasma** se ha utilizado con distintos fines, como por ejemplo conseguir un recubrimiento dieléctrico para evitar la corrosión de materiales.³⁰ Resulta el método más novedoso y atractivo para la obtención de finas películas para su utilización en

biosensores. *Grosso modo*, su fabricación consiste en favorecer la polimerización a partir de un plasma (gas altamente ionizado) reactivo, obtenido mediante una descarga eléctrica a baja temperatura en una cámara de vacío, en el que se encuentran los monómeros en fase gaseosa. En este estado se favorece la activación de los monómeros, vía formación de radicales, iones y electrones libres, cuyas colisiones desencadenan la polimerización de los mismos en láminas de pequeño espesor (>50 nm) sobre un sustrato seleccionado. Estas películas sólidas (*Plasma Polymerized Films* o PPFs) se depositan fácilmente sobre la superficie de cualquier material, como metales, vidrio, cristal, plástico o silicio, sin que éstos se alteren y con la particularidad de que pueden incorporar grupos funcionales que permitan la inmovilización de moléculas de reconocimiento, siendo especialmente útiles en el diseño de biosensores ópticos y másicos, como SPR y QCM *chips*. Las PPFs poseen además propiedades adicionales favorables como la discriminación por tamaños y ausencia de adsorción no específica. Estas propiedades precisamente son explotadas en la detección electroquímica de H₂O₂ en presencia de compuestos interferentes como el ácido ascórbico o el paracetamol, al no poder penetrar en la película.³¹

Las características del recubrimiento obtenido dependen del monómero seleccionado y de sus grupos funcionales con los que interaccionarán los elementos de reconocimiento. Esta tecnología se aplica en la fijación de anticuerpos en transductores de tipo QCM y SPR.

Las técnicas de fotolitografía han demostrado su eficacia en la fabricación de *biochips* en configuraciones de micro y *macroarrays* y no cabe duda que representan una alternativa poderosa para la construcción de dispositivos alineados en una configuración integrada en el análisis multiparamétrico.

La combinación de todas las técnicas arriba indicadas puede generar estructuras multicapa que mejoran la eficacia de los biosensores. Sirva como ejemplo la propuesta de Kranz y colaboradores,³² que utiliza una arquitectura multicapa que integra mediadores redox, la enzima inmovilizada y restricciones difusionales de acceso de compuestos interferentes y que permite una adecuada transferencia de electrones. La multicapa consiste en una primera película de polipirrol funcionalizado enlazado covalentemente a un polímero redox de una sustancia quinoide

polimerizada. La capa superficial la constituye la enzima tirosinasa atrapada en un polímero de polipirrol.

Marcadores fluorescentes y nanopartículas

Los marcadores fluorescentes se han convertido en herramientas fundamentales en el diseño, desarrollo y fabricación de biosensores, especialmente en aquellos que utilizan transducción óptica.

En la actualidad existen numerosos marcadores, cuya elección dependerá fundamentalmente de las características de la molécula que requiere ser marcada y especialmente de los grupos funcionales que ésta posea. (Fig.5)

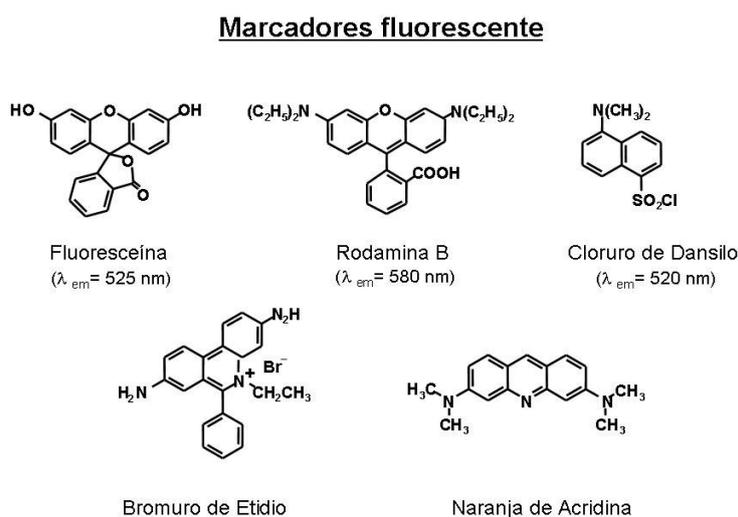


Figura 5. Marcadores fluorescentes convencionales

Los métodos de detección pueden recurrir a diferentes estrategias para evidenciar el desarrollo de la interacción analito-receptor, que van desde la transducción directa de la emisión luminiscente generada por el marcador, la amortiguación de la señal de fluorescencia en distintas situaciones o en otros el concurso de campos evanescentes.

La utilidad de las nanopartículas para transducir las interacciones biomoleculares está fuera de toda duda y en los últimos años han cobrado un gran interés.³³ No obstante, no todas las partículas son igualmente útiles para las distintas técnicas de detección.

Normalmente se definen como nanopartículas a estructuras con un tamaño entre 1 y 100 nm de diámetro. Entre ellas podemos distinguir estructuras diversas como las partículas de oro y plata coloidal, los elementos lantánidos, las perlas poliméricas, los *quantum dots*, las partículas magnéticas bacterianas y las nanopartículas orgánicas.³⁴

Las *partículas de oro coloidal* se conocen desde hace varios siglos como colorante del cristal y de la seda y se han empleado también en el diagnóstico de la sífilis. Probablemente sea el coloide más estable.

En la mayor parte de sus aplicaciones en el diagnóstico inmunológico se utiliza combinado o adsorbido físicamente a proteínas en virtud de tres fenómenos básicos: a) atracción electrostática debida a la carga negativa de la partícula y la carga positiva de la proteína. b) interacción hidrofóbica entre la partícula y la proteína y c) enlace dativo entre el azufre de la proteína y el metal.

La base para su utilización como marcador es su brillo de metal noble, que es debido a la presencia de bandas de absorción de plasmones. Estas bandas de absorción se producen cuando la frecuencia de un fotón que incide sobre la superficie del metal se encuentra en resonancia con la frecuencia de oscilación colectiva de los electrones excitados de la banda de conducción de la partícula de metal. Este fenómeno se conoce como “resonancia localizada de plasmones de superficie” (LSPR). La posición en el espectro de la banda de resonancia depende decisivamente de la forma y el tamaño de la partícula. Así, mientras que partículas esféricas de 10 a 40 nm de diámetro son rojas, partículas irregulares y de mayor tamaño son azules. El tamaño típico utilizado en los ensayos inmunológicos es de 40 nm.

La LSPR conduce a elevados coeficientes de extinción molar ($\sim 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), con una eficacia equivalente a 10^6 moléculas de fluoróforo y un fuerte incremento del campo eléctrico local próximo a la nanopartícula.³⁵ Presentan además otra serie de ventajas como la ausencia de fotodescomposición y de la toxicidad asociada a otros marcadores, siendo además muy estables.

Los *elementos lantánidos* pertenecen a los metales conocidos como tierras raras en la tabla periódica, con pesos atómicos entre 58 y 71. Aunque los iones lantánidos presentan sólo unas débiles bandas de absorción en la región visible del espectro, forman complejos muy absorbentes en presencia de determinados ligandos, con la peculiaridad de presentar propiedades luminiscentes con una vida media de emisión prolongada, que permite su uso como marcadores fluorescentes y su determinación mediante técnicas de fluorescencia de tiempo resuelto. Además del Eu(III), se emplean Dy(III), Tb(III) y Sm(III), que pueden ser fácilmente identificables por sus diferentes longitudes de onda y tiempos de vida de emisión.

Estos complejos, como EuTc pueden incorporarse en diferentes matrices poliméricas como poliestireno, poliacrilonitrilo o ácido poliacrílico en forma de nanopartículas que excitadas (405 nm), emiten una fluorescencia rosácea que puede ser modificada al enlazar biomoléculas a través de los grupos carboxílicos superficiales presentes.

Una ventaja que presentan algunos de estos elementos es que pueden emitir su fluorescencia en la región infrarroja próxima, como los iones de Yterbio(III) que emite a 980 nm cuando forman un complejo con el isotiocianato de fluorexon, un derivado de la fluoresceína excitable a 510 nm.³⁶

Los puntos cuánticos o *quantum dots* (QDs) son cristales tridimensionales de semiconductores con un intervalo de tamaño entre 1 y 10 nm. En muchos aspectos estos cristales luminiscentes se encuentran a caballo entre los semiconductores convencionales y los átomos aislados. Poseen incluso su propia tabla periódica.³⁷

En sentido amplio, en los semiconductores (como en los metales y dieléctricos) el solapamiento de los orbitales atómicos conduce a la formación de bandas de valencia y de conducción separadas y con un contenido energético diferente. La excitación del semiconductor provocará que un electrón se promocioe desde la banda de valencia, completa, a la de conducción (mayoritariamente vacía), generando un hueco y por tanto una carga positiva en la banda de valencia. La separación espacial (radio de Bohr) de este par electrón-hueco (“excitón”), se encuentra normalmente en el intervalo de 1 a 10 nm para la mayoría de los semiconductores. En los *quantum dots*, que se encuentran en ese mismo intervalo de tamaño, los excitones se hallan por

tanto confinados del mismo modo que el que se corresponde con un modelo cuántico de una partícula en una caja. Como consecuencia de ello sus propiedades ópticas dependerán de su tamaño y estarán gobernadas por los efectos cuánticos resultantes de la cuantización de sus niveles energéticos, con un comportamiento que se asemeja al de los átomos y moléculas. Estas características permiten obtener *quantum dots* con un amplio intervalo de longitudes de onda de emisión. Cuanto más pequeño es el tamaño del mismo, mayor será su desplazamiento (absorción y emisión) hacia la zona azul (efecto hipsocrómico). Por ejemplo, el máximo de emisión de los CdSe *QDs* puede ajustarse de manera casi continua entre 450 y 650 nm.³⁸

En cuanto a sus ventajas, poseen un brillo muy potente (elevada eficacia cuántica), una estrecha banda de emisión (30 nm), un elevado desplazamiento de Stokes y unos coeficientes de extinción incrementados en la zona del ultravioleta cercano ($\sim 10^5$ a 10^6 M⁻¹cm⁻¹). Su principal inconveniente es que son susceptibles de foto-oxidación por lo que tienen que encapsularse mediante un escudo protector, sobre el cual puede agregarse también una capa hidrofóbica que facilite la bioconjugación, bien por adsorción o mediante enlace covalente.

Las *partículas magnéticas bacterianas* (BMPs) son nanopartículas (50-100 nm), constituidas a partir de greigita (Fe₃S₄) o de magnetita (Fe₃O₄), aisladas a partir de la bacteria perteneciente al género *Magnetospirillum*, que las produce recubiertas con una membrana citoplasmática. Ello permite que elementos de reconocimiento, como anticuerpos, enzimas o moléculas de ADN puedan ser inmovilizados sobre la propia membrana mediante métodos químicos con reactivos de entrecruzamiento, para poder utilizarse en análisis cuantitativo, como el descrito por Matsunaga y colaboradores, que a través de un inmunoensayo luminiscente, consiguen límites de detección equivalentes a 4.000 moléculas por mL⁻¹ (1fg mL⁻¹ ó 6,7 zmol) de IgG.³⁹ Su utilización ha sido adaptada también en el diseño de biosensores para el análisis electroquímico de ADN.⁴⁰

Metodologías de señalización basadas en transferencia de energía

Para muchos de los biosensores que utilizan transducción óptica o electroquímica, la magnitud de la señal, generada como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y la molécula reconocida, depende de la eficacia con que se produce la transferencia electrónica, o la transferencia energética particular, entre un elemento donador, que puede ser el analito, y otro receptor, que será la molécula de reconocimiento u otro elemento unido a ésta (biomolécula).

Dado que la eficacia de la transferencia donador/aceptor (D/A) está directamente relacionada con la distancia entre ambos, la modulación del proceso de transferencia proporciona un medio efectivo de señalización para diseñar la arquitectura del biosensor.

Basándose en este modelo existen numerosas alternativas a utilizar como mecanismo de detección en el diseño de biosensores, como por ejemplo las que se basan en la **transferencia de energía de resonancia fluorescente** (FRET), cuya pérdida de eficacia está relacionada con la sexta potencia de la distancia, o la **transferencia electrónica** (ET), cuya eficacia cae exponencialmente con la distancia.

Existen numerosos ejemplos, como el biosensor de maltosa basado en la utilización de la proteína enlazante de maltosa MBP (*Maltose-Binding Protein*) en un ensayo competitivo. El parceptor-donador se prepara utilizando la proteína MBP asociada con un punto cuántico (QD), que emite fluorescencia a 560 nm, y un ligando de β -cilodextrina marcado con un amortiguador de la fluorescencia. En ausencia de maltosa el ligando análogo de β -cilodextrina marcado permanece unido a la proteína y por tanto la proximidad del amortiguador hace que la fluorescencia del QD se transfiera a éste. En presencia de su ligando natural, la maltosa, se produce el desplazamiento y por tanto cesa la amortiguación al aumentar la distancia entre el receptor y el donador, desarrollándose la fluorescencia.⁴¹

Los polímeros conjugados pueden también utilizarse en la construcción de biosensores empleando este modelo de detección, en virtud de sus elevados coeficientes de extinción molar (del orden de $10^6 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y de su capacidad para transferir energía a un receptor próximo, a través de sus

cadena. Por ejemplo Bazan y sus colaboradores⁴² han diseñado una serie de biosensores en los que utilizan un ácido nucleico peptídico (PNA) marcado con fluoresceína como sonda para el análisis de ADN y un polímero conjugado de naturaleza catiónica (PF). En ausencia de la molécula de ADN, la cadena neutra del PNA no interacciona con el polímero conjugado, por lo que la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) desde la molécula de fluoresceína hacia el polímero no sucede. No obstante, cuando se produce la hibridación, el carácter aniónico de la hebra de ADN complementaria al PNA, provoca la atracción electrostática hacia el polímero conjugado, lo que supone un aumento de la señal fluorescente en un factor de 25.

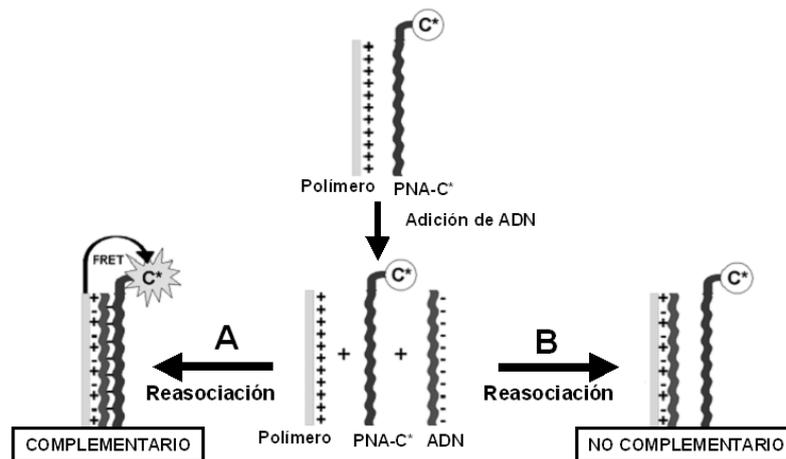


Figura 6. Esquema de señalización basado en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Adaptada de Gaylord, B.S., et al. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 10954–10957.

El principal inconveniente de este tipo de arquitecturas es que, al tratarse de metodologías competitivas, requieren la adición de reactivos externos, por lo que en determinadas ocasiones resultan relativamente lentas e inapropiadas, en especial en aplicaciones que precisan una monitorización constante. Existen otras alternativas que utilizan opciones no competitivas, como por ejemplo las basadas en cambios conformacionales de las biomoléculas. Tyagi y Kramer⁴³ demostraron esta posibilidad utilizando una “baliza molecular” (*molecular beacon*) de ADN. Esta sonda es un oligonucleótido en forma de horquilla que

dispone de un marcador fluorescente en uno de sus extremos y de un amortiguador de la fluorescencia (*quencher*) en el otro, ambos unidos a los extremos 3' y 5' respectivamente mediante enlaces covalentes. En la configuración de horquilla original, el amortiguador próximo al fluoróforo impide la emisión de fluorescencia por parte de éste. Cuando la sonda hibrida con una secuencia complementaria (véase la figura 7) pierde su forma de horquilla, el amortiguador se aleja del marcador y éste puede ahora emitir fluorescencia.

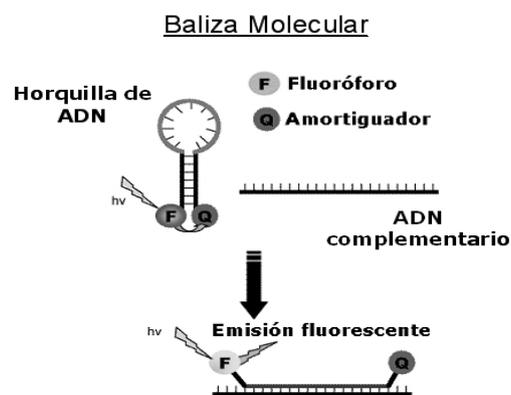


Figura 7. Esquema de señalización basado en el empleo de balizas moleculares.

Estas balizas moleculares se utilizan en una gran variedad de aplicaciones, entre las que se encuentran el genotipado, monitorización de interacciones ADN-proteína en tiempo real y detección de ARN en células vivas.

Este tipo de cambios conformacionales pueden también transducirse mediante técnicas electroanalíticas que presentan ciertas ventajas muy prometedoras, como su elevada sensibilidad y rapidez de respuesta, su disponibilidad a bajo coste y su funcionamiento con mínimos requerimientos de potencia, masa y volumen. Además, la industria de la microelectrónica proporciona a las técnicas de detección electroquímicas una plataforma creciente cada vez más compatible con las exigencias de los *microarrays* y los dispositivos integrados.

Como en los métodos ópticos anteriormente comentados, la transferencia de electrones en los métodos electroquímicos, en un medio heterogéneo, entre el electrodo y la molécula redox confinada en su

superficie, muestra una dependencia de tipo exponencial, tanto con la distancia como con el factor de acoplamiento β , de acuerdo con la teoría de Marcus.⁴⁴ Debido a esta dependencia exponencial, pequeñas alteraciones conformacionales en la superficie de confinamiento de la macromolécula (marcada con el polímero redox) conllevan enormes variaciones en la velocidad de transferencia de electrones, que se traslada en cambios cuantificables de las señales electroquímicas. Por ejemplo, Benson y colaboradores proponen una estrategia que utiliza la capacidad de plegamiento de una proteína inducida por la presencia de un ligando. En esta configuración un electrodo de oro es previamente recubierto con una monocapa autoensamblable (SAM) que proporciona una plataforma versátil para la inmovilización de proteínas en sitios específicos.⁴⁵ La proteína enlazante de maltosa se une a la superficie del electrodo con una orientación específica de modo que el grupo redox del complejo de rutenio $[\text{Ru}(\text{II})(\text{NH}_3)_4(1,10\text{-fenantrolina-5-maleimida})](\text{PF}_6)$ se fija en la superficie del electrodo. Cuando el ligando de maltosa se une a la proteína produce un plegamiento de ésta que desplaza el complejo de rutenio, alterándose la transferencia de electrones. Esta modificación en la respuesta electroquímica es proporcional a la concentración de maltosa. (Fig. 8)

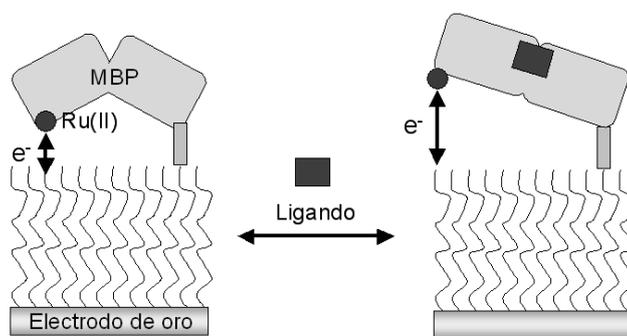


Figura 8. Esquema de señalización basado en cambios en la transferencia de electrones entre un par aceptor/donador por cambios en la conformación del elemento de reconocimiento. (Adaptada de Benson, D.E., et al (2001): Science 293, 1641–1644.

Existe también un sensor de ADN electroquímico equivalente al que utiliza la baliza molecular, en el que el fluoróforo se sustituye por una

especie electroactiva como ferroceno o antraquinona. Cuando la horquilla de ADN, con el marcador electroquímico, inmovilizada sobre la superficie del electrodo se encuentra plegada sobre sí misma, el marcador se sitúa en la proximidad del electrodo y por tanto la transferencia de electrones es eficiente. Sin embargo, cuando se produce la hibridación, la hebra de ADN se estira aumentando la distancia entre el mediador electroquímico y la superficie del electrodo, con el consiguiente cambio en la respuesta electroquímica.⁴⁶ (Fig. 9)

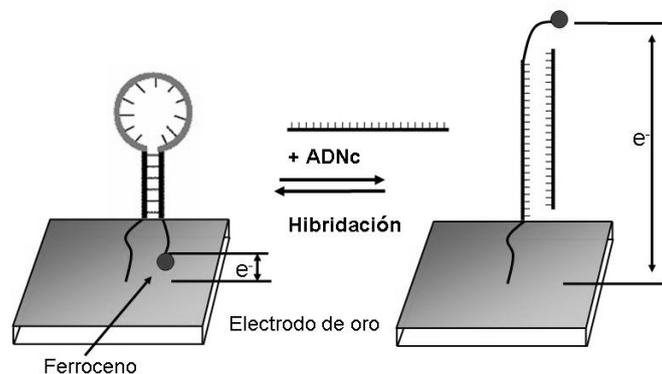


Figura 9. Esquema de señalización basado en cambios en la transferencia de electrones entre un par aceptor/donador por alteraciones en la disposición del elemento de reconocimiento. Adaptada de Fan, C., et al. (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 9134–9137.

ELEMENTOS BIOLÓGICOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Las moléculas utilizadas en los biosensores como elementos de reconocimiento deberán cumplir con ciertos criterios fundamentales para poder ser empleadas como unidades sensoras. En primer lugar tienen que poseer afinidad hacia el elemento objeto del reconocimiento, que deberá ser suficientemente selectiva para reconocer a este elemento en presencia de otros compuestos y además deberá permanecer estable a lo largo del tiempo.

El reconocimiento molecular puede conllevar simplemente el enlace entre el elemento receptor y la molécula reconocida (antígeno-anticuerpo) o bien la interacción puede ser de naturaleza catalítica

(enzima-sustrato-producto). Éste es el principal criterio que se utiliza en la clasificación de los biosensores como biocatalíticos o de bioafinidad.

Sensores biocatalíticos

Como su nombre indica los sensores biocatalíticos se basan en la utilización de catalizadores biológicos que median en una reacción química, en la que intervienen uno o varios sustratos, para generar uno o varios productos. Finalizado el proceso, el biocatalizador se regenera y puede ser nuevamente reutilizado.

Estos biocatalizadores pueden ser enzimas inmovilizadas aisladas o paquetes multienzimáticos coimmobilizados, que actúan de modo encadenado, orgánulos celulares, células completas y tejidos animales o vegetales.

Pueden emplearse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, bien cuantificando la desaparición de algún cosustrato o cofactor conocido, distinto de aquel que se quiere detectar o bien por la generación de algún producto conocido y determinable.

También pueden utilizarse indirectamente para detectar compuestos que interfieren en la reacción de manera selectiva, inhibiendo las capacidades del biocatalizador, como por ejemplo determinados insecticidas del tipo de los carbamatos, que inhiben la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa y cuya presencia puede cuantificarse a través del grado de inactivación de esta enzima,⁴⁷ o los metales pesados que inhiben la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, presente en la membrana de la microalga *Chlorella vulgaris*, que adecuadamente inmovilizada en el extremo de una fibra óptica permiten su determinación.⁴⁸

A continuación se describen los elementos de reconocimiento de tipo biocatalítico más utilizados, los cuales pueden acoplarse a los distintos tipos de transductores más comunes.

Enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan una reacción química mediante la unión de su sustrato específico en una región concreta de la misma, conocida como centro activo. Estas enzimas, a menudo requieren de la

presencia de coenzimas que pueden participar en la reacción de dos maneras distintas, bien a través de una fijación enérgica a la proteína, de manera que no son modificados una vez finalizado el ciclo catalítico, o bien como un segundo sustrato, modificándose después del ciclo, por lo que en general requieren de otra enzima para volver al estado original.

La actividad enzimática está controlada normalmente por la presencia de estos cofactores y además por la temperatura, pH y fuerza iónica del medio en el que se desarrolla la catálisis. La estabilidad de las enzimas es un factor limitante para el tiempo de vida de un biosensor enzimático, por lo que se emplean diferentes métodos para aumentarla, como estabilización química y/o inmovilización.

Entre las enzimas disponibles comercialmente, las más utilizadas son las correspondientes a la familia de las óxido-reductasas. Se trata de enzimas muy estables que catalizan reacciones de oxidoreducción y que pueden acoplarse a distintos sistemas de transducción, como dispositivos potenciométricos, amperométricos, optoelectrónicos, calorimétricos y piezoeléctricos, mediante diferentes técnicas de inmovilización química.

Para mejorar la capacidad de los biosensores enzimáticos y extender la vida útil de las enzimas, así como otras de sus propiedades, se puede recurrir a su purificación y tratamiento posterior mediante ingeniería bioquímica avanzada como por ejemplo, la enzima glucosa deshidrogenasa GDH (PQQ) hidrosoluble que puede purificarse a partir de *Klebsiella pneumoniae*⁴⁹ y posteriormente transformarla en una enzima termoestable, simplemente mediante la sustitución de un aminoácido.⁵⁰ Otras alternativas son las transformaciones genéticas a través de plásmidos⁵¹ y la mutación directa.⁵²

Son numerosas las ventajas que presentan las enzimas para su utilización en los biosensores, entre ellas su elevada selectividad y capacidad de respuesta rápida, la simplicidad de la configuración de los prototipos, su capacidad de auto-regenerarse y su extensa disponibilidad comercial.

Células, tejidos y orgánulos subcelulares.

Se utilizan *células* procedentes de microorganismos o de organismos superiores. En función de su actividad celular, se pueden emplear para el análisis de distintos compuestos, como por ejemplo los relacionados con

el crecimiento celular, como las vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos o compuestos nitrogenados y también aquellos que influyan en su respiración o metabolismo como respuesta ante la presencia de un tóxico o contaminante.

La mayor limitación a la hora de utilizar células completas es la difusión de sustratos y productos a través de la membrana celular que da como resultado una respuesta más lenta, en comparación con los biosensores enzimáticos.⁵³

Al igual que las células completas, determinados *tejidos* vegetales son una fuente de enzimas o de sistemas enzimáticos conjugados. Para ello se utilizan distintos cortes y homogeneizados de tejidos, como hojas, raíces, frutas o semillas.⁵⁴

También pueden emplearse *orgánulos* que contengan determinados paquetes enzimáticos, aunque no posean todos los que corresponden a una célula completa, como por ejemplo los cloroplastos o las mitocondrias. Determinados agentes tóxicos para las células como plaguicidas, metales pesados o detergentes actúan sobre estos sistemas enzimáticos inhibiéndolos, lo que da pie a su utilización como biosensores para detectarlos.

Las ventajas del empleo de células y tejidos se derivan de su bajo coste y escasa preparación previa, ya que se evitan los procesos de purificación asociados al empleo de las enzimas, no se requiere adición de cofactores para la regeneración enzimática y se asocian con una buena estabilidad, lo que representa prolongadas vidas útiles de los biosensores. Como contrapartida suelen presentar baja sensibilidad, respuesta lenta y selectividad limitada.

Sensores de bioafinidad

Los sensores de bioafinidad se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que medie transformación catalítica. La interacción conlleva la modificación de un equilibrio en el que se forma un complejo analito-receptor.

Para cuantificar la interacción, puede recurrirse a métodos directos, tipo sándwich, de desplazamiento y competitivos. Dado que en la interacción no se consumen sustratos ni se generan productos, como ocurre con los sensores catalíticos, en la mayor parte de este tipo de biosensores se

recurre al marcaje del receptor implicado en la interacción o bien al de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor. Como marcadores se utilizan compuestos fluorescentes, nanopartículas o enzimas que intervengan en una reacción complementaria transducible, con la que se asocia el mecanismo de detección.

Existen algunos inconvenientes con este tipo de sistemas. El principal es que habitualmente se requieren pasos adicionales de lavado y separación de las moléculas marcadas que permanecen en exceso. Además, necesita de la adición de sustratos específicos de las enzimas que se utilizan como marcadores. Por ello han proliferado otros sistemas de transducción directa basados en cuantificar la interacción entre el receptor y el analito a través de los cambios de masa que se producen sobre la superficie del material empleado como transductor,⁵⁵ o también por los cambios que experimenta una radiación electromagnética, adecuadamente utilizada, y que se producen como consecuencia de esta interacción.⁵⁶

Una de sus ventajas principales es que permite su utilización en configuraciones integradas en dispositivos “*arrays*” para multianálisis y la obtención masiva de información biológica, al nivel que requiere la bioquímica actual, en un tiempo mínimo.

En la actualidad se emplean distintos tipos de reactivos de bioafinidad, como anticuerpos, receptores y canales iónicos, lectinas, células, ácidos nucleicos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) y polímeros de impresión molecular (PIMs).

Anticuerpos

Los *anticuerpos* han sido quizás los componentes de los sensores de bioafinidad más utilizados en la tecnología de los biosensores, constituyendo de hecho un amplio grupo de diferentes dispositivos, conocidos como *inmunosensores*.⁵⁷

Un anticuerpo es una proteína que se une de manera selectiva a un antígeno específico y que en condiciones determinadas también puede reconocer moléculas de pequeño tamaño conocidas como haptenos. Tanto los antígenos como los haptenos constituyen los analitos objeto de la construcción de estos sensores.

Con fines analíticos, cada antígeno o hapteno requiere la producción de un anticuerpo particular, su aislamiento y normalmente su purificación y pueden utilizarse tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de una mayor especificidad, aunque su sensibilidad suele ser menor que la correspondiente a los anticuerpos policlonales. En los últimos años, y cada vez con más frecuencia, se ha evolucionado a la producción de anticuerpos recombinantes y al uso de fragmentos (Fab, Fab' o Fv) de anticuerpos con la finalidad de incrementar la selectividad y disminuir las interacciones no específicas.

La regeneración del inmunosensor representa la etapa más limitante del empleo de los mismos, ya que condiciona su reutilización. Habitualmente, para conseguir selectividades y límites de detección adecuados, se requiere la formación de complejos antígeno-anticuerpo de elevada afinidad, cuya disociación suele ser complicada, lo que limita su utilización a un único uso. También es importante minimizar las interacciones no específicas que conducen a falsos positivos.⁵⁸

Receptores y canales iónicos

Se denominan ***receptores*** a las zonas celulares que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Son proteínas o glicoproteínas presentes en la membrana celular, en la membrana de las organelas o en el citosol celular, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas, llamadas moléculas señalizadoras, como las hormonas y los neurotransmisores. Los receptores, al igual que las enzimas, pueden aislarse e inmovilizarse en diferentes superficies y asociarse a diversos dispositivos de transducción.

De especial interés son las proteínas transportadoras, como los ***canales iónicos***, ya que permiten controlar el flujo de sus iones asociados y monitorizarlos mediante métodos electroquímicos miniaturizados, como, por ejemplo, los canales iónicos de gramicidina, que preparados a partir de membranas lipídicas de bacterias termófilas sobre microelectrodos de oro (> 30 µm de diámetro), permiten conseguir límites de detección del orden nanomolar.⁵⁹ Representan también un instrumento valioso para la posible detección de una sola molécula, como las denominadas proteínas

porosas, que se utilizan en la detección simultánea de varios metales divalentes.⁶⁰

Lectinas

Las *lectinas* constituyen un grupo de glicoproteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, tanto libres como formando parte de estructuras más complejas. Las lectinas forman estructuras conjugadas como lectina-glicoproteína, lectina-enzima y lectina-anticuerpo, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas cromatográficas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas. Ejemplo de ellas es la purificación de IgG utilizando anti-IgG acoplada a la Con A-Sepharose y la purificación de IgM usando Con A-Sepharosa, así como también la purificación de enzimas y de las propias lectinas. Como moléculas de reconocimiento son fácilmente utilizables, económicas y de gran disponibilidad y pueden asociarse a diferentes tipos de transductores, especialmente los másicos. En el diseño de biosensores se han utilizado de manera extensiva, especialmente en la fabricación de sensores de glucosa con la lectina concanavalina A (Con-A), dada su capacidad para enlazarse a este tipo de azúcar.⁶¹

Células

Las membranas celulares están constituidas por lípidos y proteínas constituyendo una barrera que impide el paso de la mayor parte de las sustancias. La selectividad de los canales de proteínas le permite a la célula controlar la salida y entrada de las sustancias necesarias, así como los transportes entre compartimentos celulares. El reconocimiento y la unión de determinados compuestos en la superficie celular están controlados por receptores celulares, conectados a sistemas internos, que sólo actúan cuando la sustancia se une a la superficie de la membrana. Todo ello desencadena la activación de sistemas secundarios y la intervención de enzimas, que pueden ser monitorizados por distintos transductores. Determinados compuestos tóxicos ejercen su acción bloqueando los sistemas de señalización, como las toxinas paralizantes de origen marino, que ejercen su acción tóxica bloqueando los canales de sodio en las células que forman la membrana de la vejiga de rana. Esta

característica puede utilizarse para la fabricación de biosensores empleando este tipo de tejido.⁶²

Ácidos nucleicos

Los ***ácidos nucleicos*** son estructuras moleculares formadas por la repetición de una molécula unidad que es el nucleótido. Los nucleótidos son las unidades estructurales básicas que constituyen las cadenas de ADN. Es relativamente sencillo construir sintéticamente secuencias encadenadas de nucleótidos que responden a la estructura de determinados genes previamente identificados. Estas cadenas se enlazarán específicamente a su secuencia complementaria en un proceso conocido como hibridación. En los biosensores para el análisis de ADN, conocidos también como genosensores, se utiliza este proceso en la etapa de biorreconocimiento. Su utilización se extiende tanto a los procesos de secuenciación genética y análisis de la expresión génica, como a la detección de mutaciones y alteraciones del ADN asociadas con determinadas enfermedades.

En los sensores de ADN se recurre habitualmente al marcaje con marcadores fluorescentes, aunque se han desarrollado numerosas metodologías de detección acopladas a variados dispositivos de transducción.

Aptámeros

Un ***aptámero*** es una secuencia de oligonucleótidos (ADN o ARN) de cadena sencilla, sintetizada artificialmente, capaz de reconocer diversas moléculas diana con una afinidad y especificidad elevadas. Los aptámeros son obtenidos mediante un proceso denominado “evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial” (SELEX).⁶³ Estas moléculas biomiméticas se asemejan a los anticuerpos. Se pliegan en el espacio y adquieren una conformación con determinadas regiones a las que puede unirse el analito. Existen numerosas aplicaciones de estas moléculas asociadas a biosensores que han motivado la acuñación del término ***aptasensor*** para describir este tipo de dispositivos, como los aptámeros de ARN para la detección y transducción directa de ATP mediante sensores ópticos, a pesar de la relativa inestabilidad de la

molécula de ARN, comparada con la ADN, como elemento de reconocimiento,⁶⁴ entre otras.⁶⁵

Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs)

Los *PNAs* son polímeros sintéticos lineales de ácidos nucleicos, como el ADN, pero difieren en que su estructura está formada por una secuencia aquiral de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)glicina unidas, mediante enlaces peptídicos, con las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas. Además no contienen unidades de 2'-desoxi-D-ribosa ni los enlaces fosfodiéster, presentes en la molécula de ADN. Su esqueleto por tanto es neutro, lo que reduce la repulsión electrostática durante el proceso de hibridación, estableciendo enlaces más fuertes con las hebras de ADN y moléculas de ARN que reconocen, que los correspondientes a las hibridaciones naturales. La adsorción inespecífica es notablemente inferior a la observada en las moléculas de ADN. Su utilización en biosensores de afinidad, especialmente en análisis rutinario de ADN, como por ejemplo la detección de microorganismos, tiene un gran potencial de futuro.⁶⁶

Polímeros de impresión molecular

Los *polímeros de impresión molecular* o PIMs son matrices sintéticas obtenidas a partir de materiales con la capacidad de adoptar en su estructura la forma de las moléculas presentes en el medio en el que polimerizan y que permanecen en el material a modo de moldes moleculares. Son consideradas por muchos autores como “anticuerpos artificiales” (*Plastibodies*). Teóricamente presentan la capacidad de reconocer e interactuar de forma selectiva con las moléculas que produjeron en su estructura la huella correspondiente. Se trata, por tanto, de materiales biomiméticos que reproducen el mecanismo de reconocimiento de los sistemas bioquímicos convencionales, como los anteriormente expuestos (enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc.). Entre sus ventajas se suele considerar que poseen una mayor estabilidad que otros sistemas biológicos de reconocimiento.

Estos polímeros presentan una serie de características muy interesantes para su utilización como biosensores, especialmente en el campo del análisis de medicamentos y medioambiental, por su potencial para poder

desarrollar PIMs destinados a un gran número de analitos, para los que aún no se encuentran disponibles sistemas de reconocimiento biológicos.⁶⁷ Representan un campo de investigación relativamente reciente, por lo que sus aplicaciones se incrementarán en un futuro, en especial cuando se obtengan derivados artificiales activos biológicamente y se investigue en la obtención de inhibidores, agonistas o ligandos artificiales con capacidad competitiva.⁶⁸ Se han utilizado con éxito en la construcción de biosensores para la detección de fragancias, como el 2-metilisoborneol (2-MIB) y la geosmina (GEO), que pueden detectarse a niveles de ppbs.⁶⁹

Métodos de inmovilización

El componente biológico de cualquier biosensor tiene que ser incorporado en el dispositivo de manera que se garantice su actividad si posee propiedades catalíticas o bien que, el sitio de unión en el que se produce la interacción con el analito se encuentre accesible al mismo. Por ello la adecuación del proceso de inmovilización de este componente esencial es determinante en el desarrollo de un biosensor. (Fig. 10)

En los métodos de inmovilización que en general se utilizan en la fabricación de biosensores, se puede recurrir a varias alternativas que van, desde la simple adsorción física a la superficie sensora, la unión covalente, el atrapamiento en el interior de matrices poliméricas o el acoplamiento indirecto mediante especie biomoleculares intermedias.

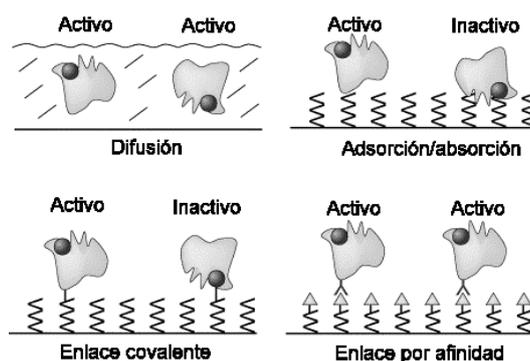


Figura 10. Ejemplos de inmovilización y su repercusión sobre la accesibilidad del biocatalizador.

TABLA I. Ventajas e inconvenientes de los elementos de reconocimiento más comunes

Enzimas	Ventajas	Inconvenientes
	<p>Elevada sensibilidad. Respuesta rápida. Autorregenerables. Permiten monitorización continua. No requieren pasos de lavado. Gran variedad de enzimas disponibles. Facilitan la detección de tóxicos desconocidos que inhiben enzimas. Permiten amplificar señales. Diseño sencillo. Fácil construcción. Bajo coste. Manejo sencillo.</p>	<p>Sensibilidad frente a condiciones ambientales (pH, temperatura o fuerza iónica). En ocasiones requieren presencia de cofactores Pueden ser inhibidos por sustancias de la muestra. Tiempo de vida limitado.</p>
Tejidos	Ventajas	Inconvenientes
	<p>Bajo coste. Evitan procesos de extracción y purificación de enzimas. No requieren la adición de cofactores para la regeneración enzimática. Simplicidad de construcción. Alta estabilidad. Elevada actividad.</p>	<p>Baja sensibilidad. Respuesta lenta. Selectividad limitada.</p>
Aptámeros	Ventajas	Inconvenientes
	<p>Mayor estabilidad en comparación con los elementos biológicos. Inmovilización sencilla sobre las superficies. Producción a gran escala con un coste bajo.</p>	<p>Bajas constantes de afinidad.</p>

TABLA I. Ventajas e inconvenientes de los elementos de reconocimiento más comunes (continuación) *

Anticuerpos	Ventajas	Inconvenientes
	<p>Sensibilidad y selectividad levadas. Estabilidad química. Afinidad variable. Respuesta rápida. Bajo coste.</p>	<p>Difícil regeneración. Requieren contacto directo con la muestra. En ocasiones requieren marcaje. No amplifican la señal. No existe consumo del analito por lo que se saturan (estrecho intervalo de linealidad) No permiten detectar sustancias desconocidas.</p>
PIMs	Ventajas	Inconvenientes
	<p>Sensibilidad y selectividad elevadas. Posibilidad de desarrollar PIMs destinados a muy diversos analitos incluyendo especies para las que aún no se han encontrado elementos de reconocimiento biológico apropiados. Especificidad predecible teóricamente aunque, en la práctica, la existencia de interacciones de carácter no específico hace difícil su determinación. Producción a gran escala con un bajo coste. Tiempo de vida largo: estabilidad química, térmica y mecánica elevadas.</p>	<p>Tecnología en desarrollo en el ámbito de los biosensores. En general, las constantes de afinidad son bajas, lo que implica mayores tiempos de análisis. Requiere altas concentraciones de moléculas molde. El procedimiento de síntesis de los PIMs conlleva múltiples etapas y resulta laborioso Además, hay pérdidas de material útil y se obtienen redes con una distribución poco homogénea de los puntos de unión. Dificultad para operar en medios acuosos porque no se produce el reconocimiento del analito.</p>

(*)Adaptada de⁷⁰

Métodos de inmovilización física

Adsorción

Representa el método más sencillo para la inmovilización de proteínas y otras biomoléculas, por lo que suele resultar la alternativa más simple de inmovilización. No obstante, presenta el inconveniente de su reversibilidad y variabilidad, que puede representar un problema cuando las condiciones ambientales fluctúan (pH, disolventes empleados etc.). Además, la densidad de moléculas inmovilizadas sobre la superficie suele ser inferior a otros métodos de inmovilización alternativos.⁷¹ Sin embargo y dada su simplicidad, la inmovilización física goza todavía de gran popularidad para la inmovilización de numerosas moléculas sobre superficies sensoras.⁷²

Con el fin de mejorar los rendimientos de inmovilización se han utilizado moléculas de recubrimiento para los materiales empleados, como poli-L-lisina, especialmente en la construcción de *microarrays*.⁷³ Sin embargo, el uso de este particular tipo de enlace, no covalente, no ha alcanzado el éxito esperado en el campo de los biosensores, en parte debido a la naturaleza iónica de su interacción. Las fuerzas de cizalladura causadas por el movimiento de fluidos en el interior del biosensor producen la desorción de los elementos de biorreconocimiento, en especial cuando se utilizan disoluciones tampón de elevada fuerza iónica o de pHs no neutros.

Una estrategia utilizada para aumentar la adsorción, especialmente útil en los biosensores electroquímicos, consiste en electrodepositar el elemento de reconocimiento sobre la superficie metálica de un electrodo.⁷⁴ Para ello se aplica un sobrepotencial durante un tiempo limitado en un área restringida, lo que permite una deposición selectiva.

En general, debido a la naturaleza de la unión conseguida mediante adsorción (fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones mediadas por electrones π), tanto la orientación espacial de las moléculas inmovilizadas, como la accesibilidad de los analitos y sustratos a los lugares de unión de las mismas, se encuentran sometidas al azar. En cualquier caso, se ha utilizado en multitud de materiales, como plásticos, cristal, carbono

vitrificado o pirolítico o metales como oro, plata amalgamada y mercurio, entre otros.

Atrapamiento

Consiste en la retención física del elemento de reconocimiento en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por polímeros del tipo de poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, poliestireno, alcohol polivinílico, etc.

En general, este método de inmovilización puede llevarse a cabo de maneras distintas, como la polimerización interfacial, la simple evaporación del disolvente, el atrapamiento en una matriz polimérica y la retención mediante membranas.

En los biosensores electroquímicos se emplean además otras alternativas, como el atrapamiento mediante *electropolimerización*, los electrodos de *pasta de carbono* y los *composites conductores*. En los primeros el elemento de biorreconocimiento es sometido a un potencial en presencia de un monómero, de manera que los radicales del mismo que se forman por oxidación anódica se adsorben sobre la superficie del electrodo, polimerizando y proporcionando una matriz tridimensional que atrapa la molécula. Se puede recurrir a polímeros conductores, como el polipirrol, que permiten controlar el espesor de la película polimérica. Los polímeros orgánicos conductores presentan además la ventaja de proporcionar una matriz apropiada para la inmovilización, permiten una buena comunicación eléctrica directa con materiales electródicos, como el carbono o los metales, siendo de gran utilidad en los biosensores electroquímicos, al facilitar el intercambio de portadores de carga entre la superficie del electrodo y el centro redox del catalizador.

Los electrodos de pasta de carbono se pueden obtener fácilmente mezclando polvo de carbono (partículas de 5-20 μm de diámetro) con un conglomerante, como el nujol (aceite de parafina), formando un electrodo de trabajo semisólido. El carácter hidrofóbico del nujol garantiza el atrapamiento de las moléculas de biorreconocimiento en medio acuoso, a la vez que permite la incorporación de mediadores electroquímicos que favorecen los procesos de transferencia de carga.

Se han utilizado distintas membranas semipermeables como medio de atrapamiento, del tipo acetato de celulosa, policarbonatos, teflón, Nafion

y poliuretano. Presentan la ventaja de preservar la configuración y actividad de las moléculas inmovilizadas, aunque introducen barreras difusionales que normalmente afectan a los tiempos de respuesta de los sensores.

En los últimos años están cobrando también gran interés los sistemas de atrapamiento a través de procesos *sol-gel*, dada la facilidad de su preparación y la elevada estabilidad que se consigue. Básicamente consisten en la generación de materiales cerámicos a baja temperatura, a través de la hidrólisis de compuestos precursores tipo alcóxido y copolimerización de monómeros hidroxilados. Los alcoxisilanos producidos generan en medio ácido una red sólida de estructura comparable a los cristales convencionales, con un tamaño de poro y grosor controlable.⁷⁵

Métodos de inmovilización química

Inmovilización mediante enlace covalente

En las reacciones químicas utilizadas en la inmovilización covalente, generalmente intervienen los grupos nucleófilos de las moléculas como grupos amina (-NH₂), grupos carboxílicos (-COOH), alcoholes (-OH), tioles (-SH) o también grupos imidazol. Las vías principales de reacción suelen reducirse a la activación de ácidos carboxílicos en ésteres mediante carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, a la formación de una base de Schiff entre una amina nucleófila y un aldehído y a las sustituciones nucleofílicas entre aminas primarias o tioles y grupos electrófilos con un elemento saliente, como un éster activado o un halogenuro de ácido.

Los materiales utilizados en la construcción de biosensores son muy variados. En los sensores ópticos, el sustrato que más se emplea como superficie de inmovilización es el vidrio y en este caso la mayoría de los métodos de inmovilización utilizan silanos, que proporcionan, en primer lugar, una molécula fácilmente modificable y sirven además como grupos activables. La primera categoría de estos silanos incluye grupos tiol y amino terminales que requieren de la adición de una especie activadora, como glutaraldehído o bien de reactivos homo o heterobifuncionales de entrecruzamiento para unir la molécula de interés a la superficie silanizada. La mayoría de los reactivos de

entrecruzamiento disponibles en el mercado se utilizan para la modificación de proteínas, mediante la transformación vía tiol o aminas primarias. El entrecruzamiento químico, conseguido de esta manera, genera moléculas de reconocimiento inmovilizadas con una orientación distribuida al azar, a pesar de que se asume que los sitios de unión activos se orientan adecuadamente. La segunda categoría de silanos, utilizados para la inmovilización de biomoléculas, incorpora grupos activos como aldehídos y epoxi, así como también moléculas fotoactivables. De particular interés resultan los silanos fotoactivables sintéticos que poseen residuos de polietilenglicol (PEG) proteína resistente, ya que se consigue reducir significativamente las uniones inespecíficas.⁷⁶⁻⁷⁷

Inmovilización a través de una capa intermedia.

Otra vía de inmovilización consiste en generar un sedimento de moléculas, con capacidad de enlace selectivo, sobre la superficie sensora del biosensor, como la proteína A y la proteína G⁷⁸ o la avidina.⁷⁹

La utilización de capas mono o multi ensambladas (SAMs) se presenta como una alternativa atractiva, especialmente en la construcción de biosensores electroquímicos. La combinación del complejo avidina-biotina ha sido muy utilizada en numerosas configuraciones, mediante la unión de uno de los reactivos a la superficie del sustrato o monocapa y del otro al elemento de biorreconocimiento.⁸⁰

La avidina, como la estreptavidina, son grandes proteínas tetraméricas (70 kD) que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La biotina es una molécula pequeña que se une con gran afinidad al sitio de unión con una constante de afinidad de $1 \times 10^{15} \text{M}^{-1}$. Este valor es casi cercano al de la unión covalente, por lo que sólo puede eliminarse en condiciones muy adversas. Debido a su fuerte interacción, la formación del complejo casi no se afecta con cambios de pH, ni temperaturas extremas, disolventes orgánicos ni con agentes desnaturizantes.

La unión tetravalente de la estreptavidina con la biotina permite la construcción de sándwiches moleculares, donde la avidina unida a una superficie puede acoplarse con los elementos de reconocimiento biotinilados. La estabilidad acuosa del complejo avidina-biotina hacen de fácil manejo este sistema; sin embargo, la presencia de esta capa de

TABLA II. Técnicas de inmovilización, descripción, matrices, ventajas e inconvenientes.

Inmovilización	Descripción	Matriz	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción física	Unión del ER* a la matriz mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals.	Celulosa. Gel de sílice. Colágeno. Hidroxiapatita.	Sencilla. Bajo coste. Matriz regenerable. Sin modificaciones en ER.	Unión débil, pérdida de ER por condiciones externas. Control estricto del proceso.
Atrapamiento	Retención física del ER en las cavidades interiores de la matriz.	Geles: agar, nylon, almidón, poliacrilamida. Matrices electródicas composites rígidas: grafito-teflón o grafito-resina epoxi.	Sencilla. Bajo coste. Se necesita poca cantidad de ER. Sin modificaciones en ER. Proximidad entre ER y el transductor.	Unión débil. Control estricto de la polimerización de la matriz. No regenerable.
Entrecruzamiento	Uniones irreversibles de los ERs entre sí mediante reactivos bifuncionales.	Reactivos: Glutaraldehído Hexameten-diisocianato, 2,4-dinitro-benceno.	Coste moderado. Estable en condiciones extremas. Mínima pérdida de ER.	Utilización de sustancias químicas tóxicas. No regenerable.
Enlaces covalentes	Uniones covalentes del ER con grupos químicos activados de la matriz o directamente del transductor.		Fácil manipulación Estable en condiciones extremas	Alteración del ER (centro activo en enzimas). Inadecuado para ERs muy sensibles (pH, temperatura) No regenerable. Utilización de sustancias químicas tóxicas. Coste alto

(*ER: Elemento de Reconocimiento).- Adaptada de⁷⁰

proteína puede inducir la adsorción inespecífica y comprometer la sensibilidad y selectividad del biosensor.

También se ha sintetizado una biotina funcionalizada con un grupo pirrol, lo que permite la preparación de películas de polipirrol-biotina electropolimerizadas sobre diferentes superficies⁸¹ que presentan, por tanto, sitios de incorporación. La conjugación posterior con avidina permite la unión de gran variedad de moléculas biotiniladas.

SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN

Los transductores son dispositivos que convierten la información correspondiente a las variaciones de las propiedades fisicoquímicas, inducidas como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, en magnitudes eléctricas cuantificables. Esta transformación permite que las señales puedan ser amplificadas, almacenadas y registradas.

Como se ha indicado anteriormente, existen varios tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores, como transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (másicos, gravimétricos, acústicos), termométricos, magnéticos y nanomecánicos. La utilización de un transductor u otro dependerá del propio elemento de reconocimiento empleado, de la naturaleza de la interacción entre éste y el analito y del mecanismo de señalización producido por el marcador utilizado si lo hubiere.

Transductores electroquímicos

Los transductores electroquímicos utilizan propiedades electroanalíticas que se producen o modifican por la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento, proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa. Para el adecuado funcionamiento del biosensor, el elemento de reconocimiento y el sistema de transducción deben estar en contacto directo.

Atendiendo a esta modalidad de transducción, existen cuatro tipos de biosensores: potenciométricos, amperométricos, conductimétricos e impedimétricos y de carga iónica o efecto de campo,⁸² dependiendo de que detecten cambios en el potencial de electrodo, en la corriente

eléctrica generada o consumida, la conductividad y resistencia eléctrica o en la densidad de carga en un transistor ISFET.

Se utilizan habitualmente con elementos de reconocimiento biocatalíticos como enzimas, ya que éstas pueden generar o consumir sustancias electroactivas que impliquen cambios en el pH, en el potencial, resistencia eléctrica, etc.

Biosensores amperométricos

Se basan en la medida de las corrientes *faradaicas* resultantes de los intercambios de electrones que se producen entre las enzimas que constituyen el sistema de biorreconocimiento y un electrodo mantenido a un potencial apropiado. La posibilidad de poder incorporar en el electrodo otros componentes, como mediadores redox, cofactores u otras biomoléculas, confiere a este tipo de biosensores una gran versatilidad de uso.

La mayor parte de los biosensores amperométricos utilizan las enzimas del grupo oxido-reductasas, dado que los productos consumidos o producidos durante el proceso de óxido-reducción, suelen ser fácilmente transducibles amperométricamente. La determinación de oxígeno mediante el electrodo de Clark, aplicando potenciales de -0,6 V (vs AgCl/Ag) a un electrodo de trabajo de platino, es una de las alternativas, aunque también puede recurrirse a la oxidación del peróxido de hidrógeno, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas que generen este producto, como las flavin-oxidasas del tipo glucosa oxidasa, a potenciales de +0,68 V vs AgCl/Ag.

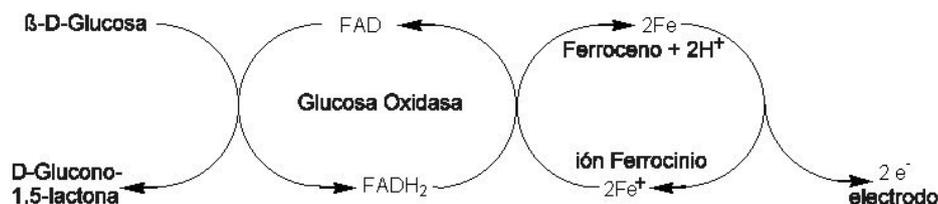


Figura 11. Transducción amperométrica en la determinación de glucosa a través de la enzima GOD mediada con ferroceno.

El principal problema, asociado a estos biosensores, es su acusada dependencia de la concentración de oxígeno disuelto. Este inconveniente

se puede solventar mediante la utilización de mediadores electroquímicos que transfieren los electrones directamente al electrodo, sin necesidad de reducir el oxígeno como cosustrato. El ferroceno representa el mediador más característico de este tipo. (Fig. 12)

En la actualidad se dispone también de biosensores amperométricos donde los electrones pueden transferirse directamente desde el centro activo reducido de la enzima, sin necesidad de utilizar mediadores. Estos biosensores utilizan sales orgánicas conductoras, como el ión N-metilfenazinio (NMP^+) con el radical tetracianoquinodimetano (TCNQ^-).

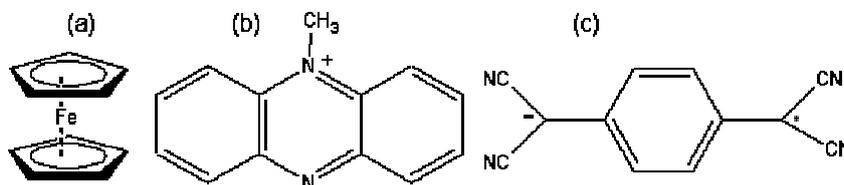


Figura 12. (a) Ferroceno (5-bis-ciclopentadienil férrico), compuesto que da origen a numerosos mediadores. (b) TMP^+ , parte catiónica de las sales orgánicas conductoras. (c) TCNQ^- parte aniónica de las sales orgánicas conductoras.

Por sus características, numerosas flavo-enzimas son fuertemente adsorbidas por estas sales mediante la formación de uniones salinas, dada la alternancia de cargas positivas y negativas dentro de un entorno hidrofóbico. Estos electrodos enzimáticos se pueden preparar simplemente mediante inmersión del propio electrodo en una disolución de la enzima y permanecer estables durante varios meses.

La progresiva reducción de los potenciales de trabajo necesarios que introduce este tipo de mediación, disminuye sustancialmente los problemas asociados con la interferencia de compuestos extraños, que se producen trabajando a potenciales elevados.

Estos tres tipos de electrodos constituyen las tres generaciones de biosensores amperométricos. (Fig. 13)

Biosensores potenciométricos

Basados en medidas potenciométricas, suelen emplearse electrodos selectivos a iones (*Ion Selective Electrode ISE*), con los que se determina la variación en la concentración de un ión, inducida mediante una

reacción catalizada por una enzima. Las variaciones en la medida de los potenciales vienen determinadas por la ecuación de Nerst y en el caso de los electrodos enzimáticos se encuentra afectada por el valor de la K_m de la enzima utilizada. La respuesta sólo será lineal a concentraciones de sustrato inferiores a la equivalente a la décima parte del valor de dicha K_m . Las configuraciones más empleadas en este tipo de biosensores utilizan el electrodo de vidrio, el electrodo de amoniaco, el de yoduro y el sensor de anhídrido carbónico, en combinación con diferentes enzimas inmovilizadas en la proximidad del electrodo, mediante membranas del tipo poliacrilamida.

Los electrodos selectivos a iones deben su respuesta a la diferencia de potencial que se genera a ambos lados de una membrana, con propiedades de unión selectiva para un determinado ión, que separa la disolución objeto de análisis y un electrolito interno de concentración invariable.

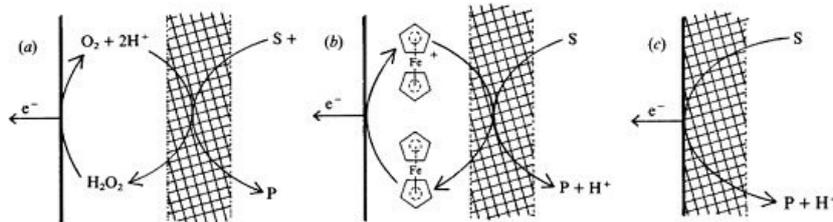


Figura 13. Biosensores amperométricos para enzimas flavin-oxidasas ilustrando las tres generaciones en su desarrollo. (a) Primera generación utilizando H_2O_2 producido en la reacción ($E_0 = +0.68$ V). (b) Segunda generación empleando ferroceno para favorecer la transferencia de los electrones hacia el electrodo producidos en la reacción ($E_0 = +0.19$ V). (c) Tercera generación utilizando directamente los electrodos producidos en la reacción. ($E_0 = +0.10$ V). Todos los potenciales (E_0) son relativos al electrodo de $AgCl, Ag$.

Biosensores conductimétricos e impedimétricos

Las variaciones en la conductividad de un medio, debidas a la transformación catalítica de un sustrato en sus productos correspondientes, pueden también detectarse mediante un sistema integrado de electrodos planos interdigitados, a través de la medida de su impedancia.

El ejemplo quizás más característico lo constituye el biosensor de urea, fabricado mediante la inmovilización de ureasa sobre la superficie del sistema de electrodos. Esta enzima en presencia de urea cataliza su transformación en el ión bicarbonato y amoníaco, con el consiguiente aumento en la conductividad del medio.

Biosensores de efecto de campo

Los ISFET (*Ion Sensitive Field Effect Transistors*) son una variación de los transistores MOSFET (*Metal Oxide Screen Field Effect Transistor*). Su principio de funcionamiento se basa en el control del flujo de cargas que se produce entre dos electrodos (fuente y drenaje, ambos semiconductores tipo n) situados sobre la superficie de un elemento semiconductor (tipo p). Un tercer electrodo de naturaleza metálica (puerta) situado entre los dos anteriores cierra el circuito eléctrico. El electrodo metálico está aislado de los electrodos semiconductores, mediante una fina capa de óxido de silicio (SiO_2), pero puede influir en la corriente eléctrica (I_{df}) existente entre la fuente y el drenaje, aunque sólo de manera electrostática. El campo eléctrico requerido para ello es proporcionado por un voltaje externo (V_{pf}) entre la puerta y la fuente. Dicho de otro modo, la corriente I_{df} está directamente relacionada con el voltaje V_{pf} .

En un ISFET, el electrodo metálico que constituye la puerta es remplazado por una capa de un material sensible a iones, como por ejemplo óxido de aluminio (Al_2O_3), el nitruro de silicio (Si_3N_4) o el óxido de tántalo (Ta_2O_5), sensibles todos ellos a protones. En presencia de estos iones se produce un cambio en el voltaje V_{pf} entre la puerta y la fuente que conlleva un cambio también en la corriente I_{df} entre el drenaje y la fuente, que estará directamente relacionada con el pH del medio. Los dispositivos ISFET pueden transformarse fácilmente en biosensores, inmovilizando una enzima sobre la superficie del sensor, como por ejemplo el biosensor para penicilina utilizando la enzima penicilinasas. Esta enzima transforma la penicilina en ácido peniciloico, que modificará la concentración de protones en el entorno y que por tanto influirá en la respuesta del dispositivo. (Fig. 14)

Los biosensores basados en la tecnología ISFET presentan la ventaja de que pueden miniaturizarse a los mismos niveles que se hace con los

circuitos impresos, lo que les confiere una elevada capacidad de integración y un gran potencial para su empleo en microarrays.⁸³

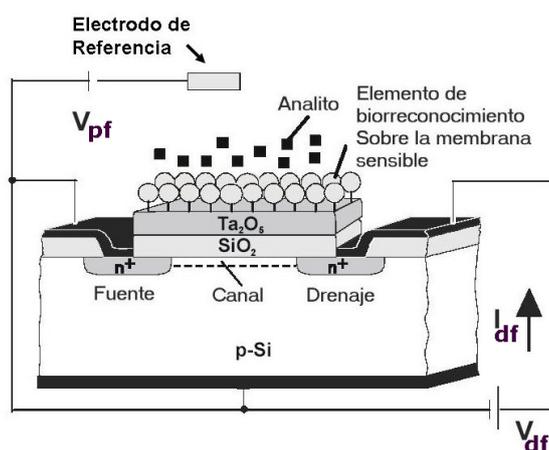


Figura 14. Biosensor basado en la utilización de transistores ISFET. La presencia del analito modifica la corriente eléctrica a través del canal entre la fuente y el drenaje, modificando la respuesta del dispositivo.

Transductores ópticos

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnética, como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento del biosensor. Dicha interacción puede inducir cambios en las características de absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión de la radiación, cuando ésta incide sobre la superficie donde se encuentra el elemento de reconocimiento.

Se utilizan tanto métodos de detección directa como métodos de detección indirecta, en la que es necesario utilizar marcadores, adaptándose igualmente a sistemas biocatalíticos como de bioafinidad.

Entre los transductores que utilizan propiedades ópticas se incluyen los sensores de fibra óptica (optrodos) y los sensores de onda evanescente.

Optrodo

Se trata de sensores construidos mediante fibras ópticas, de manera que en uno de sus extremos se inmoviliza el elemento de reconocimiento y en el otro el sistema de detección (Fig. 15). Normalmente, estos biosensores requieren sistemas de señalización mediante marcadores, como moléculas luminiscentes o colorantes, que sean sensibles a los cambios que se producen en el medio en el que se desarrolla la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, como variaciones de pH o de concentración de especies químicas implicadas. Los cambios en las propiedades ópticas se propagan a través de la fibra óptica hacia el sistema de detección, normalmente un fotodiodo o un fotomultiplicador. (Fig. 15)

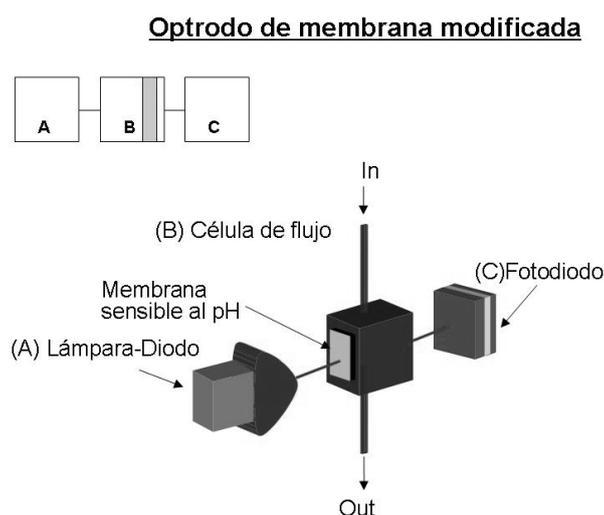


Figura 15. Optrodo de membrana sensible a cambios de pH. La presencia del analito modifica la transmitancia de la membrana y por tanto el rendimiento del fotodiodo

Otros transductores ópticos se basan en los cambios que experimentan las propiedades de un haz de luz reflejado sobre la superficie en la que se encuentra inmovilizado el elemento de biorreconocimiento, cuando se produce la interacción con el analito. Este tipo de biosensores explota la selectividad superficial asociada a la generación de una onda evanescente, que se produce en la inmediata vecindad de la interfase donde se lleva a cabo la reflexión del haz. Estrictamente hablando,

cuando un haz de luz se transmite en condiciones de reflexión interna total (TIR) en el interior de una guía de ondas, como una fibra óptica de dimensiones adecuadas, el campo electromagnético asociado a esta radiación no queda completamente confinado en el interior del núcleo de la misma, sino que se extiende a las zonas limítrofes, decayendo exponencialmente con la distancia y originando lo que se denomina un “campo evanescente”. Cualquier interacción molecular (analito-receptor) que se produzca dentro de este campo evanescente, producirá cambios en las características de la luz que se propaga por la guía de ondas. (Fig. 16)

Varios son los biosensores que se basan en este principio de transducción, como los sensores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), los transductores de resonancia de espejos, los interferómetros, los sensores de fibra óptica capilar y de guía de onda plana.

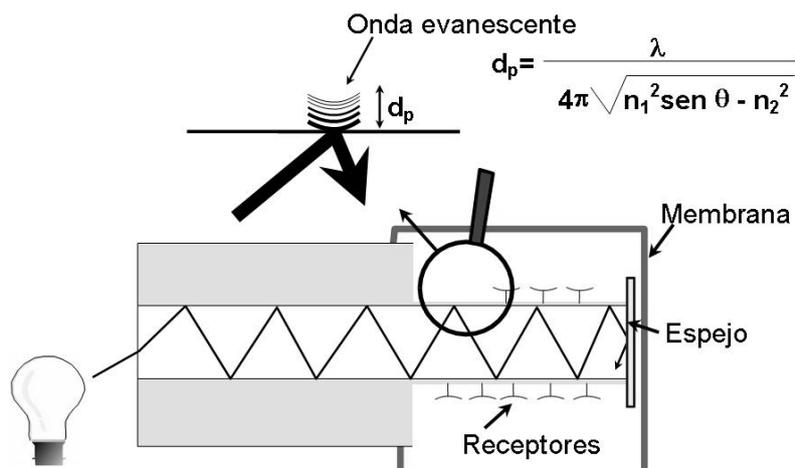


Figura 16. Biosensor de fibra óptica basado en el fenómeno de reflexión interna total (TIR) a través de la guía de ondas. Las modificaciones en el campo evanescente, que resulten de la interacción analito receptor, repercutirán en la respuesta del dispositivo.

Resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas que involucran al campo electromagnético y a los electrones de la banda de conducción de un metal. La resonancia de plasmones superficiales se produce cuando

un haz de luz polarizada, procedente de un medio de mayor índice de refracción (prisma), incide sobre la superficie de una capa metálica delgada (oro o plata) sobre la cual se encuentra depositada la muestra. Sólo a un determinado ángulo de incidencia, denominado ángulo de resonancia, se producirá la excitación de los plasmones del metal, registrándose la correspondiente pérdida de potencia del haz reflejado. Este ángulo de resonancia es poderosamente dependiente del índice de refracción del medio adyacente a la lámina metálica. Las variaciones que se produzcan en el índice de refracción del mismo serán registradas como desplazamientos en el ángulo de resonancia y a su vez relacionados con las variaciones de masa producidas en la superficie sensora. La interacción por tanto, entre el analito y el elemento de reconocimiento, podrá cuantificarse directamente sin necesidad de recurrir al empleo de marcadores ni de reactivos adicionales. (Fig. 17)

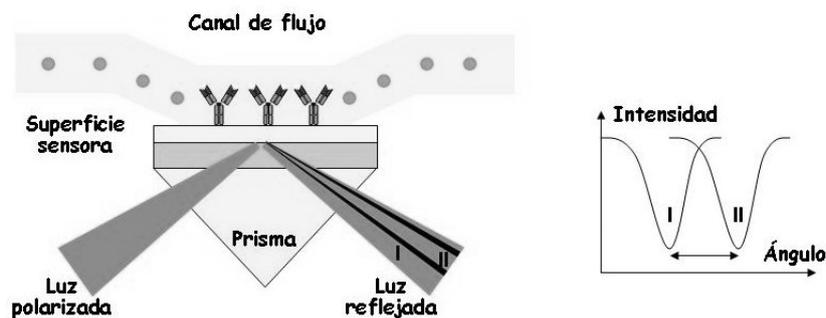


Figura 17. Biosensor de resonancia de plasmones superficiales. El ángulo de luz incidente que excita a los plasmones de superficie varía en función de la concentración de analito que interacciona con el elemento de reconocimiento.

Resonancia de espejos

Es una variación de la SPR, en la que se sustituye la capa de metal por una estructura resonante, constituida por un soporte, de elevado índice de refracción, sobre el que se depositan dos capas adicionales. Una capa delgada de óxido de silicio (SiO_2) y otra, más delgada, de óxido de titanio (TiO_2).

Experimentalmente, un haz de luz se dirige hacia la capa de silicio con un ángulo de incidencia determinado (ángulo de resonancia), para introducirse posteriormente en el medio de elevado índice de refracción de óxido de titanio. En esta capa la radiación experimentará una serie de reflexiones, generando un campo evanescente que se extiende hacia la zona donde se deposita la muestra. Como en la resonancia de plasmones superficiales, cualquier variación en el índice de refracción en la superficie de la zona sensora, debido a la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, conllevará un cambio en el ángulo de resonancia, que puede relacionarse con la concentración del analito. (Fig. 18)

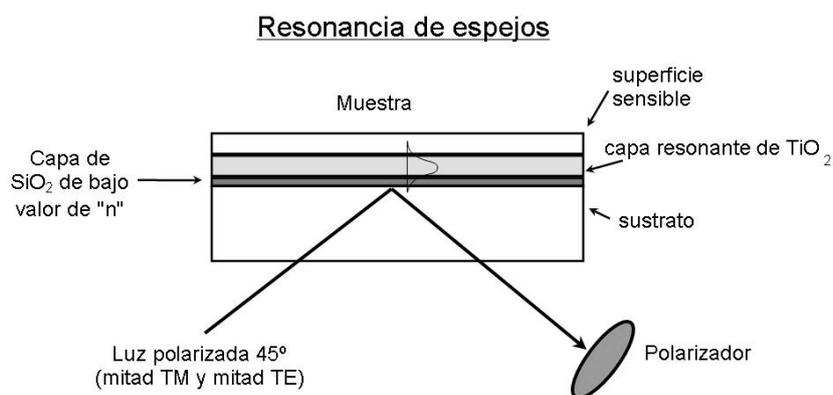


Figura 18. Biosensor de resonancia de espejos basado en la generación de un campo evanescente. (TM: Transverse Magnetic, TE: Transverse Electric).

Interferómetros

El interferómetro asociado a la generación de una onda evanescente se basa en el principio de Mach-Zender (MZ), mediante el cual, un haz de luz, que recorre una guía de onda plana, es dividido en dos haces que recorren idéntica distancia (L), en dos recorridos diferentes, para volverse a recombinar, posteriormente, al final de los mismos. Si el camino óptico recorrido por ambos haces no difiere significativamente, a una distancia establecida se observará una figura de interferencia, a cuyas franjas corresponderá una intensidad determinada.

Cualquier retardo, en el recorrido en uno de los brazos, producirá una reducción de esa intensidad, al modificarse el perfil interferencial. Esto ocurrirá en aquel sobre cuya superficie inmediata se ha depositado el elemento de biorreconocimiento correspondiente, debido a su vez, a los cambios producidos en el campo evanescente como consecuencia de la interacción con el analito de interés. El otro brazo servirá como referencia. (Fig. 19)

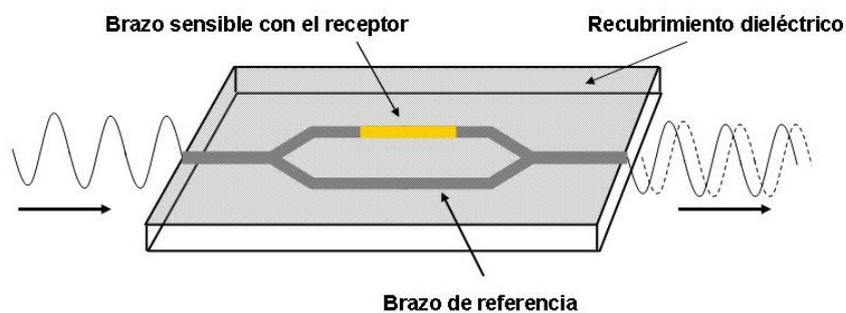


Figura 19. Interferómetro de Mach-Zender. El elemento de reconocimiento se deposita sobre el brazo sensible en la guía de onda.

Reflexión interna total de fluorescencia

Estos sensores utilizan la energía asociada a la onda evanescente para provocar la excitación de compuestos fluorescentes. Así, la radiación que se propaga en el interior de una guía de ondas, por reflexión interna total, crea un campo electromagnético evanescente, que penetra una distancia suficiente a través de la superficie de la guía, que depende del ángulo de incidencia en la interfase y de la longitud de onda de la radiación utilizada.

La excitación de los marcadores fluorescentes provocará la emisión de fotones luminiscentes que se podrá canalizar a través de la propia guía de ondas y detectarla posteriormente. Puede así relacionarse con la concentración del analito, tanto en formato directo como competitivo. (Fig. 20)

Excitación fluorescente mediada por ondas evanescentes

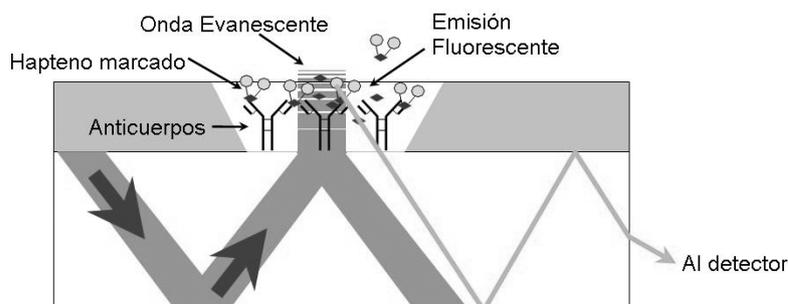


Figura 20. Biosensor de fibra óptica basado en el fenómeno de reflexión interna total (TIR) a través de la guía de ondas. La excitación del marcador fluorescente se limitará sólo a la zona de influencia de la onda evanescente.

Transductores másicos

Bajo esta denominación se incluyen los sistemas de transducción que detectan pequeños cambios de masa producidos sobre la superficie sensora, debidos a la interacción analito-sistema de reconocimiento. Se denominan también gravimétricos, piezoeléctricos o transductores acústicos, dado que en su diseño se utilizan cristales piezoeléctricos que entran en resonancia cuando se aplica una corriente eléctrica alterna. El acoplamiento de elementos de reconocimiento, sobre este tipo de cristales, permite la construcción de biosensores que pueden detectar directamente la unión con su correspondiente analito. Puesto que la frecuencia de oscilación del cristal viene determinada por su masa, de acuerdo con la ecuación de Sauerbrey,⁸⁴ esta frecuencia variará cuando se produzca la interacción, pudiendo relacionarla con la concentración del analito.

Los sensores piezoeléctricos pueden adoptar dos modos distintos de funcionamiento, según el tipo de onda acústica implicada. Unos son los denominados tipo SAW (*Surface Acoustic Wave*) donde la resonancia ocurre sólo en la superficie del cristal, al tratarse de ondas transversales superficiales cuya energía se encuentra confinada en una zona de la superficie equivalente a una longitud de onda. El otro modo corresponde a los tipo BAW (*Bulk Acoustic Wave*) que son ondas de volumen que atraviesan el cristal y por tanto la resonancia ocurre en toda la masa del

mismo. El dispositivo que utilizan estas últimas se conoce comúnmente como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

El aumento de masa que tiene lugar, como consecuencia de la reacción de afinidad, en el camino acústico entre dos pares de electrodos, implica un cambio en la velocidad de la onda y por tanto en la frecuencia de oscilación.

Las limitaciones de esta tecnología son la falta de selectividad y las interferencias producidas cuando se usa en un medio líquido. A pesar de ello, son numerosas las publicaciones existentes que utilizan este principio, dado que permite el análisis directo y prescinde de la utilización de marcadores adicionales.

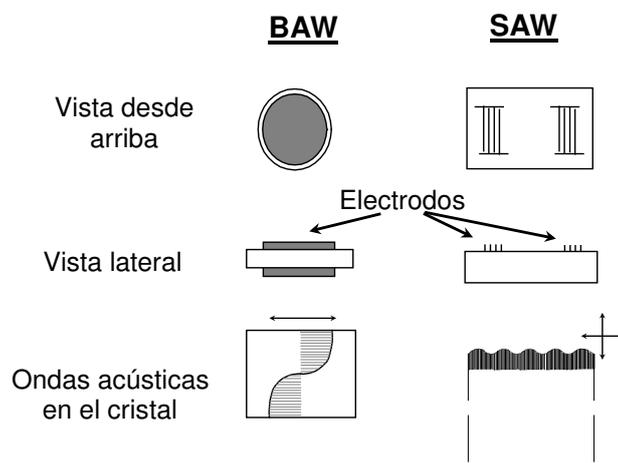


Figura 21. Sensores piezoeléctricos tipo BAW (*Bulk Acoustic Wave*) y tipo SAW (*Surface Acoustic Wave*). Localización de los electrodos y representación del recorrido de las ondas acústicas en ambos.

Transductores termométricos

Dado que la mayor parte de las reacciones bioquímicas son de naturaleza exotérmica en mayor o menor grado, la calorimetría ofrece un sistema de detección para numerosos analitos, especialmente en aquellos en que media una catálisis enzimática. Estas reacciones están asociadas con cambios relativamente elevados en la entalpía molar, en un intervalo entre 20 y 100 KJ mol⁻¹ (catalasa-peróxido de hidrógeno $-\Delta H = 100$ KJ mol⁻¹, glucosa oxidasa-glucosa $-\Delta H = 80$ KJ mol⁻¹). Presentan la ventaja

de que las medidas se pueden llevar a cabo sólo sobre la base de la catálisis enzimática y sin la necesidad del concurso de otras reacciones, como la adición de un segundo reactivo. En la actualidad existen calorímetros sencillos y de bajo coste que permiten su utilización rutinaria, especialmente en clínica.

La aproximación más sencilla, para su empleo como biosensores, utiliza enzimas directamente inmovilizadas sobre el transductor térmico (TEP: *Thermal Enzyme Probes*) o atrapadas en el interior de membranas. Se utilizan también sensores Peltier que permiten una considerable reducción del tamaño del dispositivo. No obstante, otros métodos mucho más eficaces para detectar la liberación del calor producido, consisten en el empleo de una pequeña columna con la enzima inmovilizada sobre un soporte adecuado, constituyendo lo que se denomina el termistor enzimático y el analizador entalpimétrico de flujo, que detectan cambios de temperatura de $0,01^{\circ}\text{C}$, con salidas de registro de 100 mV. Este tipo de biosensores ha evidenciado su utilidad en la determinación de metales pesados como el mercurio(II), basado en la inhibición que este metal provoca sobre la enzima invertasa, consiguiéndose límites de detección de 5 ppbs y sensibilidades equivalentes a los transductores amperométricos.⁸⁵

Transductor magnético

El empleo de partículas magnéticas representa una poderosa y versátil herramienta en el diagnóstico en biología y medicina. Como se indicó anteriormente, normalmente se preparan a partir de magnetita (Fe_3O_4), greigita (Fe_3S_4), magemita (Fe_2O_3) y varios tipos de ferritas. Estas partículas, unidas a biomoléculas o elementos de reconocimiento, se utilizan con fines separativos o como marcadores combinados a sistemas de detección magnéticos.

Dos instrumentos se utilizan fundamentalmente para este fin. Los magnetómetros y los microscopios basados en el dispositivo SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device* o dispositivo superconductor de interferencia cuántica). Un SQUID consiste, básicamente, en un toroide de material superconductor con una pequeña discontinuidad, que se conoce como “*unión Josephson*”. Mediante un proceso puramente cuántico puede usarse para medir variaciones casi infinitesimales en los campos magnéticos.

Luxton y colaboradores utilizan un magnetómetro, que se basa en determinar los cambios de frecuencia en la corriente inducida, cuando están presentes partículas paramagnéticas en el interior de una bobina de inducción. Estos cambios se producen en un intervalo de 29 a 62 Hz, en función de la diferente cantidad de transferrina capturada en la etapa de reconocimiento.⁸⁶

Apoyándose en el empleo de nanopartículas superparamagnéticas y un microscopio que utiliza un dispositivo SQUID de corriente directa, Chemla y colaboradores⁸⁷ se valen de una película Mylar sobre la que inmovilizan la muestra y que depositan en la superficie del microscopio. Sobre la película se adiciona una suspensión de anticuerpos marcados con las partículas magnéticas, a la vez que se aplican pulsos magnéticos paralelos al dispositivo SQUID. En presencia de este campo de alineación, las nanopartículas desarrollan una magnetización seguida de una relajación, cuando cesa el campo magnético. Existen dos tipos de relajación magnética, la relajación tipo browniano, donde las partículas giran en disolución debido a su energía térmica, y la relajación de Néel, en la que son los dipolos internos de las partículas los que giran. La primera es rápida mientras que la segunda es lenta. En esta situación, las partículas, que no se han unido a los receptores correspondientes, experimentan una rápida relajación por rotación browniana, por lo que no contribuyen a la señal. Sólo aquellas partículas que han sido capturadas al unirse los anticuerpos experimentan una relajación de Néel, produciendo un lento decaimiento en el flujo magnético, que es detectado por el dispositivo SQUID.

Transductor nanomecánico

Son estructuras fabricadas mediante nanotecnología, a partir de silicio o de nitruro de silicio y pueden ser de forma triangular o rectangular, simulando ménsulas o trampolines en miniatura. Dichas estructuras experimentan una deflexión en su extremo como consecuencia de la incorporación sobre el mismo del analito de interés. Su pequeño tamaño (1 μm de espesor, 500 μm de longitud y 100 μm de anchura) permite medidas de gran sensibilidad de menos de un ángstrom de variación en su curvatura con respecto a su posición inicial. La detección del analito puede llevarse a cabo por distintos mecanismos, como por ejemplo mediante un haz de luz láser dirigido hacia el extremo de la estructura y

que permite conocer el grado de deflexión del dispositivo a través del cambio en la reflexión del láser, que afectará, a su vez, al rendimiento de un fotodiodo alineado con él.⁸⁸ El cambio de masa (de 1 pg) puede también determinarse midiendo el cambio en la frecuencia de resonancia que experimenta el transductor o mediante detección eléctrica directa.⁸⁹ Se han utilizado para detectar pequeñas cantidades de microorganismos patógenos como la *Salmonella*, con un límite de detección de 25 células. También se ha empleado para detectar el polimorfismo de un solo nucleótido.

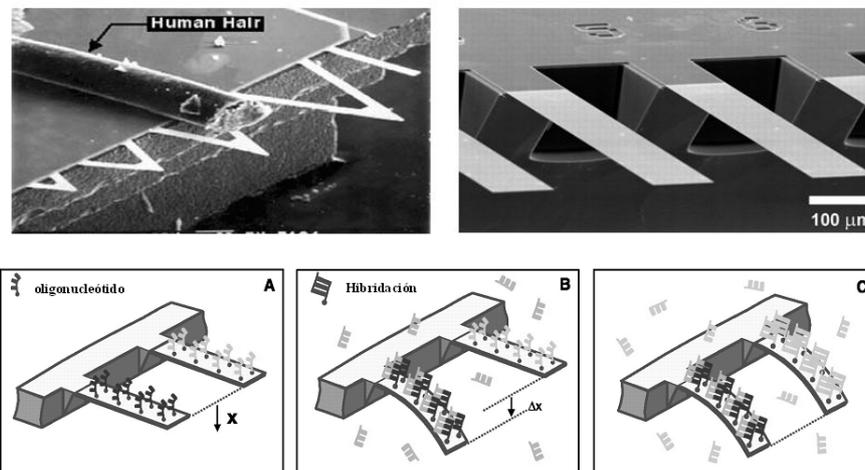


Figura 22. Micrografía de barrido electrónico de un dispositivo nanomecánico de silicio, en una configuración *array*, obtenido mediante microfabricación. (Micro and Nanomechanics Group, IBM Zurich Research Laboratory). Representación esquemática de un experimento de hibridación. A) Ajuste del dispositivo. B) Incorporación del primer oligonucleótido complementario C) Incorporación del segundo oligonucleótido complementario. Adaptada de Fritz, J., et al. (2000): Science 288, 316-318.

APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES

Como ya se ha indicado anteriormente, las principales aplicaciones de los biosensores en los últimos años se han desarrollado con especial relevancia en tres campos: el medioambiental, el agroalimentario y el clínico. Su utilización en **medioambiente** se extiende desde el análisis de

la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) hasta el control de detergentes, pesticidas y otros tóxicos.

La *demanda bioquímica de oxígeno* es considerado el parámetro analítico de mayor importancia para valorar la calidad de las aguas de desecho. Sin embargo, el método oficial para su análisis resulta tedioso ya que se requieren cinco días para conseguir los resultados.⁹⁰ En el año 1977 Karube desarrolló el primer sensor construido con un electrodo de oxígeno y una membrana impregnada con la levadura *T. cutaneum*.⁹¹ En el año 1990 este método se estableció como estándar de la industria japonesa. En la actualidad y basándose en el mismo principio que utilizó Karube, se emplean estos biosensores en todo el mundo y en numerosos campos, entre los que destacan el farmacéutico, el alimentario y el de la industria del papel.

Además de estos dispositivos, el grupo de Karube ha propuesto diferentes prototipos de biosensores que emplean transducción óptica, como los que utilizan bacterias luminiscentes y optrodos, o también transducción fotocatalítica combinada con un electrodo de oxígeno.⁹² Se han utilizado también otras bacterias como *Proteus vulgaris* combinadas con detección electroquímica y ferrocianuro potásico como mediador.⁹³

Otros biosensores con utilidad en medioambiente son los dispositivos analíticos para determinar los niveles de nitrificación y de inhibición de ésta, mediante bacterias nitrificantes. En la actualidad se dispone de biosensores desechables de un solo uso, útiles tanto para este fin como para determinar la DBO.⁹⁴

Existen también biosensores construidos con células completas que han demostrado su eficacia para la monitorización de alquil sulfonatos (LAS), utilizando cepas purificadas de microorganismos obtenidos a partir de aguas residuales.⁹⁵

Uno de los indicadores más importantes que determina el grado de eutrofización de un río, u otro tipo de agua, es la concentración del ión fosfato. Los valores límite permitidos oscilan en torno a 0,3-0,4 μM , por lo que su medida representa un dato importante para el control de la calidad de las aguas. Los métodos convencionales que utilizan molibdeno son tediosos y adolecen de falta de selectividad, a lo que hay que unir los inconvenientes ambientales asociados al empleo de metales pesados. Por ello se han desarrollado diferentes biosensores que se basan en la

inhibición de la enzima fosfatasa alcalina⁹⁶ o de la combinación de enzimas nucleósido fosfatasa y xantina oxidasa.⁹⁷ Otra opción más reciente utiliza la enzima piruvato oxidasa (PyrOx) y peroxidasa (HRP) en un sistema de inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente. Presenta la ventaja de que puede compactarse y ser incorporado en una boya de flotación para la monitorización permanente de los fosfatos en las aguas de los embalses, con un intervalo lineal entre 96 nM y 32 μ M.⁹⁸ Han sido empleados otros métodos con la combinación de tres enzimas, maltosa fosforilasa (MP), mutarrotasa (MUT) y glucosa oxidasa (GOD) con transducción electroquímica,⁹⁹ así como también las proteínas captadoras de fosfato (PBP) procedente de *Escherichia coli*.¹⁰⁰

Es bien conocido que los óxidos de nitrógeno y el azufre causan la llamada **lluvia ácida**. Recurriendo a la enzima nitrito reductasa (NIR) de *Alcaligenes fecalis* S-6, en combinación con una transducción amperométrica y el mediador 1-metoxi-5-metilfenacinio metil sulfato (1-metoxi) –PMS-, se ha propuesto un dispositivo que permite la determinación de nitritos en aguas naturales con un límite de detección de 0,010 mM.¹⁰¹ Para la medida del ión sulfato se ha descrito también un biosensor de células de *Thiobacillus ferrooxidans* combinadas a un electrodo potenciométrico.¹⁰²

Basándose en la inhibición que determinados tóxicos pueden producir en la respiración de microorganismos, se pueden utilizar sensores microbiológicos como sistemas de detección de la presencia de numerosas toxinas. Así, por ejemplo, el cianuro que produce una inhibición potente de la enzima citocromo oxidasa, que afecta a la cadena respiratoria de células aerobias, puede determinarse siguiendo este principio.¹⁰³ El mismo proceso es igualmente válido para la determinación de pesticidas y herbicidas.

Otros productos tóxicos, como el tricloroetileno, se han determinado mediante biosensores microbiológicos a través de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en combinación con un electrodo selectivo de cloruros adaptado a un sistema FIA.¹⁰⁴ Los PCBs también han sido determinados mediante inmunosensores electroquímicos, utilizando anticuerpos anti-PCB directamente inmovilizados sobre un electrodo de carbono serigrafado desechable.¹⁰⁵ Otros disruptores endocrinos como dioxinas y algunos pesticidas se han determinado mediante biosensores

ópticos, utilizando la técnica de resonancia de plasmones superficiales, con límites de detección 5 ng mL^{-1} para atrazina, de $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para PCBs y $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxinas (TCDD), con un tiempo de análisis de 15 minutos¹⁰⁶ y también mediante el empleo de anticuerpos con detección fluorimétrica, en un sistema FIA.¹⁰⁷ Una reciente revisión analiza el uso de estos dispositivos en el análisis de toxinas y otros agentes utilizados en bioterrorismo y en la guerra biológica.¹⁰⁸

La masiva utilización de pesticidas, como insecticidas y herbicidas, unido a su gran impacto medioambiental, ha conllevado un enorme desarrollo de métodos para su análisis, incluido los que recurren a los biosensores, dada su rapidez y simplicidad. Así, como ya se ha comentado con anterioridad, la inhibición que producen los insecticidas como carbamatos y derivados organofosforados en enzimas como la acetilcolinesterasa (AChE) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), se ha utilizado profusamente como principio en el diseño de los mismos. Sirvan de ejemplo los biosensores para *clorpirifos etil oxon* diseñados con acetilcolinesterasa inmovilizada sobre electrodos serigrafiados e incorporados en un sistema de análisis por inyección en flujo.¹⁰⁹ También se ha utilizado una acetilcolinesterasa de *Drosophila melanogaster*, genéticamente modificada e inmovilizada sobre un electrodo serigrafiado, para la detección multianalito de *paraoxon*, *carbofuran* y *malaixon*.¹¹⁰ Empleando la técnica SPR y con biosensores preparados con anticuerpos monoclonales anti-etofenprox inmovilizados sobre la superficie sensora, previamente recubierta con una película polimérica favorecida mediante plasma (PPF), se ha podido determinar también el plaguicida liposoluble *etofenprox*.¹¹¹ En el caso de la atrazina, se han utilizado numerosas aproximaciones empleando anticuerpos anti-atrazina inmovilizados en diferentes biosensores.¹¹² Una propuesta novedosa para determinar este pesticida es la que mide los niveles de P450-ARNm inducidos en *Sacharomyces cerevisiae* mediante SPR, con una sensibilidad y precisión superior a los métodos ELISA convencionales.¹¹³

Las "*narices electrónicas*" son sistemas sensoriales capaces de detectar e identificar determinadas sustancias químicas. Estos sensores se emplean desde hace varios años en las industrias de la alimentación, bebidas o perfumería. Sin embargo, son demasiado voluminosos, poseen una sensibilidad limitada y deben ser recalibrados frecuentemente. Los polímeros de impresión molecular se han utilizado para generar sensores

con una selectividad determinada para moléculas en fase gaseosa. Así, el 2-metil-isoborneol (MIB) ha sido detectado hasta un límite de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) y un recubrimiento de un polímero impreso de 2-metil-isoborneol, sobre una superficie de cristal previamente revestida con una delgada capa de nylon.¹¹⁴ Para alcoholes se ha empleado también la QCM con un corte AT de cristal de cuarzo a 10 Mhz recubierto con tres capas de nylon, carbono y fosfatidil-colina, con una sensibilidad pareja a la humana para 5 tipos de alcoholes distintos.¹¹⁵ La trimetilamina (hedor a pescado) se ha determinado mediante un biosensor, tipo electrodo enzimático, utilizando la enzima monooxigenasa (flavínica).¹¹⁶

La necesaria garantía de la calidad y seguridad de los alimentos ha llevado a una gran expansión de los métodos de análisis aplicados a la tecnología alimentaria. Numerosos biosensores se utilizan en el análisis rápido de la calidad de determinados parámetros en los alimentos, como la calidad de la carne y frescura del pescado, así como la presencia de diferentes componentes en los alimentos, como aditivos, tóxicos y medicamentos.¹¹⁷

El proceso de putrefacción de la carne puede monitorizarse electroquímicamente con el empleo de un biosensor, como el preparado mediante la inmovilización de la enzima putrescina oxidasa sobre un electrodo de platino, con el que se consigue un intervalo lineal de 5 a 60 nmol g^{-1} , para putrescina. El mismo dispositivo, pero con la enzima xantina oxidasa,¹¹⁸ permite determinar hipoxantina con un intervalo de linealidad de 0,05 y $1,0 \mu\text{mol g}^{-1}$

La frescura del pescado se puede cuantificar mediante el denominado índice de frescura, IK, que se corresponde con la fórmula $\text{IK} = \frac{(\text{HxR}) + (\text{Hx})}{(\text{IMP}) + (\text{HxR}) + (\text{Hx})} \times 100$, donde IMP y HxR son las concentraciones de inosina, 5'-monofosfato, e inosina, respectivamente y Hx la de hipoxantina, todas ellas presentes en la carne de pescado. Su medida puede realizarse mediante un biosensor con transducción óptica quimioluminiscente, utilizando un sistema con dos reactores en una configuración dual. Uno de los sistemas se emplearía para determinar $(\text{HxR}) + (\text{Hx}) + (\text{IMP})$ y el otro para $(\text{HxR}) + (\text{Hx})$. Para ello se utiliza una combinación de enzimas inmovilizadas formada por fosfatasa alcalina, purina nucleósido fosforilasa y xantina oxidasa. La medida del índice de

frescura se realiza en menos de 1 minuto y puede llevarse a cabo en tiempo real.¹¹⁹

Diferentes *componentes de los alimentos* pueden cuantificarse mediante biosensores. Tal es el caso del ácido láctico, el acetaldehído, azúcares, compuesto fenólicos y especialmente los aditivos. El d-lactato, por ejemplo, se ha determinado en vino utilizando un electrodo serigrafiado de carbono modificado con la enzima d-lactato deshidrogenasa inmovilizada en presencia de NAD, utilizando una membrana de Nafion-polietilenimina para minimizar las interferencias.¹²⁰ Igualmente se han determinado en cerveza compuestos fenólicos, también con electrodos de carbono serigrafiados,¹²¹ y diferentes dextrinas, en este caso empleando un reactor enzimático con amiloglucosidasa, glucosa deshidrogenasa y mutarrotasa inmovilizadas sobre CPG.¹²²

Los aditivos alimentarios, sujetos a una estricta regulación en la UE, tienen una importancia fundamental ya que suelen ser objeto de fraude, además de que pueden originar problemas de intolerancia en determinados grupos de población. Existen varios dispositivos que permiten determinar la presencia de los aditivos, más utilizados, como el aspartamo, el sorbitol y el ácido benzoico.

No menos importante resulta la determinación de fármacos residuales en los productos alimenticios, existiendo también numerosos dispositivos de medida que recurren al empleo de biosensores.¹¹⁷

Pero no cabe duda que el campo de los *análisis clínicos* es la parcela en la que los biosensores han experimentado un mayor desarrollo y muy especialmente en lo referente a los análisis de glucosa y los ácidos nucleicos.

La Federación Internacional para la Diabetes estima que esta enfermedad afecta a más de 150 millones de personas en todo el mundo y sus complicaciones derivan en trastornos renales, ceguera y un marcado incremento de padecer riesgo de enfermedades cardíacas. El mercado anual de los test de glucosa supera los 3.000 millones de euros, con una tasa de incremento entre el 12 y el 18 por ciento.

La medida de glucosa en sangre es uno de los parámetros clínicos determinantes en el control de la diabetes. En el año 1962 un médico americano, consciente de la incomodidad y sufrimiento que suponía para

los enfermos diabéticos someterse a continuos análisis de sangre, sugirió la idea de un dispositivo que permitiera realizar dichos análisis con tan sólo unas gotas de sangre y que fuera capaz de responder en pocos minutos. Surgió así el primer concepto de dispositivo biosensor.

En la actualidad este análisis se ha convertido en una práctica rutinaria para millones de diabéticos en todo el mundo, gracias al empleo de biosensores. Se han fabricado diferentes prototipos que emplean la enzima glucosa oxidasa procedente del *Aspergillus niger* y detección electroquímica de oxígeno o peróxido de hidrógeno, con y sin mediación electroquímica (Tabla III). No obstante, esta enzima no sólo se utiliza para la determinación de glucosa sino, dada su gran estabilidad y bajo coste, ha sido también muy empleada en numerosos estudios de viabilidad en el desarrollo de biosensores en general. De hecho se han diseñado numerosos prototipos ensayando diferentes opciones, como el empleo de bicapas de películas electropolimerizadas, matrices de alginato biotinizadas, técnicas de microfabricación utilizando películas polimerizadas favorecidas mediante plasma, para evitar la incómoda interferencia del ácido ascórbico por exclusión estérica, y también electrodos enzimáticos fabricados con capa hidrofílica entrecruzada de polipirrol mediante electropolimerización.¹²³

Dado que la concentración de glucosa en sangre puede experimentar cambios bruscos, la responsabilidad de este control debe recaer en el propio interesado. Por este motivo el método de análisis tiene que ser rápido, sencillo y portátil. Estos dispositivos de automedición de la glucosa que permiten su análisis en tiempo real, se dividen en tres tipos, denominados de 3ª, 4ª y 5ª generación. Los dos primeros utilizan muestras reales, mientras que los llamados de 5ª generación son métodos no invasivos que determinan la concentración de glucosa mediante una radiación infrarroja dirigida hacia la piel. Esta última alternativa elimina la toma de sangre previa, pero su interpretación necesita apoyo quimiométrico.

Los biosensores de glucosa de 3ª generación requieren tres pasos para llevar a cabo el análisis. En primer lugar el ajuste del dispositivo, en segundo la toma de muestra mediante una pequeña lanceta que perfora mínimamente la piel (normalmente del dedo) para liberar una gotita de sangre y finalmente la incorporación de la muestra al biosensor para llevar a cabo la medida de manera automática.

TABLA III. Características de los biosensores de glucosa disponibles, que lideran el mercado.

	One touch Ultra (LifeScan) ^a	Accu-chek Avive ^b (Roche diagnostics)	Elite XL ^c (Bayer diagnostics)	FreeStyle ^d (Therasense, Abbot)	Precision Xtra ^c (MediSense, Abbot)
Zona de muestreo	Alternativa	Alternativa	Única	Alternativa	Alternativa
Tamaño muestra (μl)	1	0,6	2	0,3	0,6
Tiempo medida (s)	5	5	30	7	5
Sangre capilar	Si	Si	Si	Si	Si
Intervalo temperatura	5-44° C	6-44	10-39	5-40	10-50
Memoria	150	500	120	250	450
Intervalo concentración	20-600 mg/dl	10-600	20-600	20-500	20-500
Transducción	electroquímica	electroquímica	electroquímica	electroquímica	Electroquímica

Adaptada de ¹²⁴

^a <http://www.lifescan.com>

^b <http://www.accu-chek.com>

^c <http://www.ascensia.com>

^{d y e} <http://www.abbottpointofcare.com>

Los de 4ª generación requieren únicamente dos pasos, ya que aúnan en uno sólo la toma de muestra y el análisis.

Con el paso de los años, el volumen de muestra necesario se ha reducido desde 10 a 0,3 µL y el tiempo de análisis de 30 a 5 segundos.

Existen numerosos dispositivos comercialmente disponibles que utilizan tanto la glucosa oxidasa, como la glucosa deshidrogenasa, con detección tanto electroquímica como óptica. Algunos como el *Glucowatch*, producido por la compañía Animas Technologies, LLC, permite una monitorización constante de los niveles de glucemia, ya que realiza mediciones de la glucosa cada 10 minutos y de manera no invasiva. El paciente lo lleva como un reloj de pulsera y la toma de muestra se consigue mediante una corriente eléctrica, muy débil, que impulsa el fluido intersticial a través de la piel hacia unos discos de gel en el que se sitúan los electrodos del sistema. Los electrodos tienen una vida útil de 13 horas sin ser sustituidos. Además, el biosensor incorpora una alarma que puede ser programada para alertar al paciente cuando los resultados que se están obteniendo se encuentran en unos niveles demasiado altos o demasiado bajos.

El uso de este dispositivo fue aprobado por la FDA, si bien está destinado a ser utilizado junto con los medidores tradicionales de glucemia, no a sustituirlos.

Existen, también, numerosos dispositivos útiles para analitos de interés clínico, entre los que se encuentran los sistemas de detección basados en el uso de biosensores de tirosinasa para la determinación de medicamentos de naturaleza fenólica¹²⁵ o de neurotransmisores como la dopamina,¹²⁶ sensores de lactato utilizando lactato oxidasa, sensores de piruvato mediante piruvato oxidasa, ácido úrico empleando ureasa, histidina e histamina mediante Cu-monoamino oxidasa, colesterol y un largo etcétera.¹²⁷

Los sensores de ácidos nucleicos se utilizan también para determinar la presencia de virus y bacterias patógenas. Así, se han diseñado biosensores electroquímicos desechables de ADN útiles para este fin.¹²⁸

En la tabla IV se reseñan algunos biosensores útiles para la detección de microorganismos.

TABLA IV. Ejemplos de biosensores utilizados en la detección de microorganismos patógenos

Transducción	Elemento de reconocimiento	Microorganismo
Electroquímica	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7 <i>Campylobacter</i> , <i>S. aureus</i>
(LAPS) Light-Addressable	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7
Potentiometric Sensor		<i>B. subtilis</i> , <i>Y. Pestis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Brucella melitensis</i>
Impedimétrico		<i>Salmonella</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Piezoeléctrico tipo QCM	Anticuerpos	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>S. enteritidis</i> ,
	Receptores	<i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ,
	Proteína A	<i>Candida albicans</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> ,
		<i>Yersinia pestis</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
Piezoeléctrico tipo SAW	Anticuerpos	<i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i>
Nanoelectromecánico	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7
SPR	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ,
		<i>B. subtilis</i>
Resonancia de espejos	Anticuerpos	<i>S. aureus</i>
Bioluminiscencia		<i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>
FIA (Fluoroimmunoanálisis)	Anticuerpos	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>V cholerae</i> , <i>E. coli</i>
Interferometría óptica	Anticuerpos	<i>Salmonella typhimurium</i>
Fibra óptica	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>S. aureus</i>

Adaptada de⁷⁰

Composición y biocompatibilidad

Cuando los biosensores se utilizan con fines clínicos en un medio biológico, son numerosos los factores pueden afectar a su funcionamiento, dada la complejidad del entorno en el que actúan.

El más importante quizás sea la interacción de proteínas y células con la superficie del sensor.¹²⁹ Por ello, aunque los biosensores presenten un enorme potencial para su empleo en aplicaciones clínicas de monitorización en tiempo real, estos problemas conducen a que su estabilidad operativa se reduzca a unas pocas horas o como mucho a unos días. Obviamente, la biocompatibilidad del material juega un papel determinante. Los materiales utilizados en su preparación suelen cubrirse con una membrana delgada cuya misión puede ser la reducción de interferencias o el control de la difusión de diferentes moléculas. Para ello se pueden utilizar diferentes tipos de polímeros, como el cloruro de polivinilo (PVC), polietileno, polimetacrilato y poliuretano, por sus óptimas propiedades físicas y químicas.

Se han realizado intentos para mejorar la compatibilidad de este tipo de membranas artificiales mediante la unión de anticoagulantes, como sulfato de heparina, para aumentar la hemocompatibilidad reduciendo la adsorción de trombina, aunque se han observado problemas de cesión de la heparina al entorno.

Quizás los materiales cuyas propiedades son más biocompatibles sean los hidrogeles poliméricos. El agua presente en estos polímeros hidrofílicos impide la adsorción de proteínas, debido a la compresión que experimenta el polímero en presencia de éstas por el desplazamiento del agua asociada al mismo. Fenómeno que ha sido explicado en términos de repulsión estérica, atracción por fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas.

Estos polímeros hidrosolubles pueden incorporarse a la superficie del sensor mediante diferentes técnicas de incrustado, como la polimerización in situ por química húmeda o mediada fotoquímicamente y la deposición mediante descarga eléctrica de radiofrecuencia.

Como alternativa al método de incrustado, puede recurrirse a la adsorción de moléculas anfifílicas sobre la superficie de polímeros hidrofóbicos o inmovilizarlas covalentemente sobre la superficie, para

crear una capa de adsorción permanente con la densidad requerida. El polietilenglicol (PEG) ha sido muy utilizado para modificar este tipo de superficies, consiguiendo reducir significativamente la adsorción inespecífica de proteínas y plaquetas.

La membrana celular de una célula natural es un sistema auto ensamblado en el que la capa más externa es una nanoestructura. Basándose en esta observación, multicapas anfifílicas multi ensambladas y sistemas de superficie nanoestructurada se han utilizado en la preparación de liposomas modificados con PEG. Estas superficies experimentan una adsorción inespecífica para proteínas significativamente inferior. Mediante adsorción química se han obtenido también monocapas autoensambladas sobre metales y compuestos cerámicos.

La característica más sencilla y común de las membranas celulares, así como de los prototipos de membranas no reactivas, radica en su elevado contenido en fosfolípidos con grupos en su extremo de fosforil-colina eléctricamente neutros. En consecuencia el copolímero sintético poli(MPC-co-BMA) que contiene grupos de 2-metacrilatoiloxietil-fosforilcolina (MPC) copolimerizado con metacrilato de n-butilo (MBA), presenta propiedades favorables de hemocompatibilidad.¹³⁰ Las superficies son muy hidrofílicas y contienen por ello elevadas cantidades de agua. Durante la construcción de la membrana, mediante evaporación del líquido, todas las moléculas de fosfolípido, que incluye dos cadenas de ácido graso, experimentan una rotación significativa para minimizar la energía en la interfase, lo que da lugar a que el extremo del grupo de fosforilcolina se oriente hacia el lado de la membrana que se encuentra expuesta al aire. La molécula de MPC tiene también una elevada afinidad por los fosfolípidos plasmáticos, por lo que en contacto con el plasma tenderá a producir una capa lipídica natural, con estructura de biomembrana en su superficie. En comparación con otras membranas, el uso de estos copolímeros de poli (MPC-co-BMA) para el revestimiento de los biosensores, mejora sustancialmente su funcionalidad cuando son utilizados en aplicaciones médicas.¹³¹

LOS BIOCHIPS

Los *Biochips* representan una de las herramientas más recientes, actualmente disponible, para hacer frente a los nuevos desafíos a los que se enfrentan los análisis clínicos modernos y que se caracterizan por la obtención masiva de información analítica, en un tiempo reducido y al menor coste posible.

Estrictamente hablando, los biochips son dispositivos miniaturizados capaces de incorporar material biológico con una elevada densidad de integración, como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos etc. Surgen como una adaptación de los microprocesadores electrónicos en los que se sustituyen los circuitos impresos por muestras de naturaleza biológica. El espectacular desarrollo de estos dispositivos ha venido de la mano de la posibilidad de gestionar y almacenar grandes cantidades de información, debido también al gran empuje de la investigación en bioinformática.

La bioinformática, como su nombre indica, aplica las tecnologías de la informática a la resolución de problemas de orden biológico. De este modo trabaja en la investigación y desarrollo de herramientas útiles para llegar a comprender el enorme flujo de información biológica que se origina en los genes, estructuras moleculares, la función bioquímica, la conducta biológica y por último la influencia en las enfermedades y la salud.

A estos dispositivos también se les conoce como micromatrices de material biológico, *Microarrays* y atendiendo al tipo de material inmovilizado también como *DNA arrays* o *Chips* genéticos, *Protein Chips* o *Tissue Chips*. Estos dispositivos están constituidos por un soporte sobre el que se sitúa el material biológico formando una matriz ordenada, de manera que se conoce que es lo que se ha depositado en cada punto de la matriz, permitiendo el análisis, la identificación y su posterior interpretación.

El origen de los biochips se remonta a la miniaturización de las técnicas de afinidad que se han venido empleando desde hace años, como instrumentos analíticos, en el campo de la biología molecular. Los primeros ensayos de afinidad con muestras inmovilizadas sobre soportes sólidos se realizaron en los años 60, en los que bien antígenos o anticuerpos se inmovilizaban sobre una superficie sólida para su

detección. El siguiente paso en el desarrollo de estos dispositivos se produjo una década después, cuando Edwin Southern¹³² empleó filtros de nitrocelulosa como soporte para la fijación de moléculas de ADN. Con ello consiguió que el ADN, así inmovilizado, no interaccionara con las otras moléculas de ADN, también inmovilizadas, pero preservaba su capacidad de hibridar con moléculas complementarias en disolución. La detección de estas hibridaciones se realizaba a través de un marcador radiactivo mediante un revelado por autorradiografía. Este tipo de técnica se designó con el nombre de *Southern blot*, que después se extendió al campo de la inmovilización de ARN y proteínas.

El primer *microarray* comercialmente disponible fue producido por la empresa Affymetrix en el año 1994. Tenía una capacidad de 16.000 sondas y permitía analizar simultáneamente la expresión de miles de genes. Los dispositivos actuales pueden llegar a incorporar alrededor de 1,3 millones de sondas, por lo que pueden determinar la expresión de la totalidad del código genético humano conocido. Además, con estos dispositivos es posible determinar cientos de miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), facilitando el estudio de la compleja asociación de enfermedades genéticas y la respuesta a los medicamentos. Las generaciones más recientes de SNP-*microarrays* permiten el genotipado de más de 500.000 marcadores de polimorfismo de secuencia. Estos nuevos *biochips* de alta densidad para el estudio del mapeo de enfermedades genéticas, ha permitido determinar con precisión, por ejemplo, los genes relacionados con el síndrome de la muerte súbita del bebé,¹³³ la diabetes neonatal,¹³⁴ el desorden bipolar¹³⁵ y la degeneración macular relacionada con la edad.¹³⁶

En sólo una década, los *microarrays* han revolucionado la investigación científica básica, redefiniendo nuestra visión del genoma y su complejidad. En los próximos años esta espectacular revolución se extenderá al campo de la clínica y de éste al cuidado de los pacientes. La información relativa a la expresión completa del genoma y la variación en su secuencia se está ya aplicando en la clasificación y el diagnóstico de enfermedades y promete resultar una herramienta indispensable en los tratamientos terapéuticos personalizados de determinados grupos de pacientes. Con estos dispositivos los investigadores pueden identificar diferencias genéticas entre los estados de salud y de enfermedad y evidenciar los cambios experimentados durante la evolución de la enfermedad o por su tratamiento.

Nomenclatura y clasificación

Los criterios de clasificación son muy variados y contemplan varias opciones, como la forma de fabricación, el tipo de molécula inmovilizada, el diseño de la matriz o los materiales soporte empleados.

El desarrollo de numerosas técnicas de inmovilización ha permitido que se pueda preparar casi cualquier tipo de muestra biológica inmovilizada. Ello nos proporciona una primera clasificación de estos dispositivos, en función de que se inmovilicen oligonucleótidos (*GeneChips*), cadenas complementarias de ADN (*cDNA Arrays*), proteínas (*ProteinChips*) o tejidos (*TissueChips*).

GeneChips, es el nombre comercial que utiliza la empresa Affymetrix y que se aplica a los chips que llevan sobre su superficie cadenas cortas de 20 a 80 nucleótidos. Para su fabricación pueden emplearse métodos de síntesis “in situ” de las cadenas de nucleótidos o métodos de impresión.

cDNA Arrays, *chips* en los que se inmovilizan cadenas complementarias de ADN (ADNc) por lo general sintetizadas previamente y depositadas sobre la superficie para su inmovilización.

ProteinChips, utilizan proteínas inmovilizadas con diversas características de bioafinidad sobre la superficie de un soporte.

TissueChips, sobre la superficie de estos *chips* lo que se inmovilizan son pequeños fragmentos de tejidos para permitir el posterior análisis en paralelo de varias muestras o la realización de diferentes ensayos sobre una misma muestra.

El diseño del *biochip* permite establecer otro criterio de clasificación y distinguir entre dos orientaciones claramente diferenciadas, una comercial y otra más personalizada

Los ***Biochips comerciales*** son aquellos que proporciona la industria del sector, donde el material biológico se halla ya inmovilizado sobre el sustrato y listo para su empleo. El diseño de los elementos del chip varía de una empresa a otra y normalmente para conseguir una mayor rentabilidad de su fabricación suelen inmovilizar conjuntos de material biológico, que no siempre son de utilidad para el usuario. Por ello la opción de personalizar su diseño, por parte del comprador, suele ser gravosa para éste. Su principal ventaja es que se adquieren listos para su uso y pueden resultar de gran utilidad para determinadas aplicaciones. El

más claro ejemplo de este tipo de aproximación es la seguida por la empresa Affymetrix.

Los Biochips individualizados “Home Made”, son una segunda opción para la tecnología de biochips y cuyo diseño y fabricación se lleva a cabo por laboratorios de investigación. Para este fin se utilizan unos robots capaces de depositar cantidades microscópicas de material biológico sobre la superficie del *chip*. Dentro de esta categoría se puede hacer una subdivisión en función del tipo del dispositivo empleado, distinguiéndose la corriente de la Universidad de Stanford y P. Brown, que aboga por la fabricación por parte de los grupos de sus propios robots, y otra corriente liderada por las empresas dedicadas a la fabricación de robots comerciales para la fabricación de los *chips*.

La forma de fabricación proporciona otro criterio para la clasificación de los *biochips*, dadas las grandes diferencias de concepto existentes. Los dos criterios principales se basan en el tamaño de los puntos que constituyen la matriz y en el lugar en el que se sintetiza u obtienen los elementos biológicos que se vayan a inmovilizar, comúnmente conocidos como sondas:

Los Microarrays o micromatrices, incorporan una gran densidad de sondas en su superficie. Se trata de un concepto íntimamente ligado a los biochips, de hecho el término *microarray* de material biológico es equivalente al de *Biochip*.

Los Macroarrays o macromatrices, no están incluidos dentro de los *biochips* debido al gran tamaño de los puntos. Son matrices de baja densidad de integración. Por lo general se han desarrollado sobre superficies porosas.

La Fabricación in situ se refiere a los *chips* en los que se hacen crecer las cadenas, no muy largas y en general de ADN o PNA, sobre la superficie del *chip*.

La Fabricación por impresión, se refiere a la forma de fabricar *chips* en la que el material inmovilizado ha sido previamente sintetizado y es depositado sobre la superficie de la matriz.

El soporte y el tipo de unión están íntimamente unidos, ya que los métodos y el tipo de inmovilización que se practica dependerán en gran

medida del sustrato sobre el cual se vayan a realizar los ensayos. Dentro de este apartado se pueden distinguir tres peculiaridades.

Los chips “glass-based” son *chips* en los que el material se encuentra covalentemente inmovilizado sobre superficie de una lámina sólida y rígida que le sirve de soporte y que puede ser cristal, silicio, plástico o un metal como el oro.

Los chips “electronic-based” son *chips* contruidos sobre electrodos en los que se producen directamente el reconocimiento y la transducción. La inmovilización del material biológico sobre el electrodo se puede realizar utilizando diferentes métodos, como ya se ha expuesto con anterioridad.

Los chips “gel-based” se construyen de modo que el material biológico se inmoviliza sobre el soporte mediante interacciones no covalentes. Los soportes más comúnmente empleados son geles de pequeñas dimensiones o membranas porosas de nylon o nitrocelulosa previamente extendidas sobre la matriz.

Métodos de fabricación

Los procesos de fabricación y generación de las matrices se han diversificado mucho desde su origen y permiten establecer grandes diferencias entre los distintos dispositivos y plataformas existentes en el mercado.

El material soporte de la matriz es un componente muy importante en el proceso, puesto que su resistencia y otras características del mismo condicionarán el modo en el que se puedan llevar a cabo determinados procedimientos y toma de decisiones, como el tipo de lavado y eliminación de uniones inespecíficas, si se podrán reutilizar, el modo de revelado y por supuesto el coste que conlleva la fabricación del mismo.

En la fabricación de las matrices se pueden distinguir dos procesos claramente diferenciados.

En el primero de ellos, el material genético es sintetizado con anterioridad a su incorporación sobre la superficie de la matriz. La fabricación se consigue a través de unos robots mecanizados que, mediante un brazo con una serie de cabezales, recogen la muestra desde

su ubicación para posteriormente llevarla y depositarla sobre la superficie de la matriz, a modo de pequeños puntos o insertos.

La otra posibilidad es la fabricación mediante unión química a la matriz, lo que posibilita, además, la síntesis *in situ* del material genético.

Los métodos de fabricación son muy variados aunque quizás los más utilizados son los que recurren a las técnicas de fotolitografía (ver más adelante).

Otros dispositivos como los **Robots piezoeléctricos** y los sistemas “*Ping and Ring*” también se pueden utilizar.

El principio de funcionamiento de los Robots piezoeléctricos es el mismo que el utilizado por las impresoras de inyección de tinta. Los reactivos son depositados en los puntos seleccionados mediante el movimiento de los cabezales que contienen los inyectores, bajo el control de un robot. Es determinante que los inyectores depositen la misma cantidad de reactivo en todas las celdas de la matriz y que el brazo del robot se desplace con movimientos muy precisos.

El sistema *Ping and Ring* fue desarrollado por la empresa Genetic Microsystems y utiliza un sencillo mecanismo, fácil de reproducir en el laboratorio, cuyo principio de operación recuerda al juego de las pompas de jabón. Se trata de un *arrayer* provisto de una serie de cabezales, cuyas partes principales son un anillo y una aguja, con los que se consigue la impresión. El proceso comienza al introducir el anillo en la muestra, que quedará impregnado con ella debido a las fuerzas de tensión superficial del líquido. A continuación, la aguja pasará a través del anillo arrastrando el material retenido en el centro de éste, para a continuación ser depositado sobre la superficie del *biochip*. Puesto que el material con las sondas tiene que estar preparado previamente, este método de fabricación no permite la síntesis *in situ*.

Chips de ADN

Podemos clasificar estos *Biochips* en función de la utilidad perseguida con su utilización. Así, hablaremos de *chips de secuenciación*, *chips de expresión* y *chips de hibridación comparativa*. Los primeros son los más antiguos y en ellos se inmovilizan segmentos de ADN de 20 unidades de nucleótidos (*mer*). Estos *chips* están diseñados de tal manera que cubren todas las posibilidades de combinación de bases, en un esquema que se

denomina secuenciación por hibridación (SBH). La muestra se deposita sobre el *chip* y se hibrida con sondas que poseen una secuencia complementaria.

La segunda variedad de estos *chips* está ideada para determinar el grado de expresión de una secuencia genética, midiendo la cantidad de ARNm que está produciendo un gen determinado.

Los *chips de hibridación comparativa* detectan cambios en la expresión génica en un grupo específico de pares de bases. Los resultados se obtienen determinando el grado de cambio cuando se compara con una referencia o control, mediante hibridación competitiva. Este tipo de *chips* es útil en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades vinculadas a la expresión de genes, como ciertos casos de cáncer.

Gene chip de Affimetrix

Fue el primer *chip* de ADN desarrollado. Consiste en un *microarray* de oligonucleótidos de secuencias conocidas sobre una superficie de silicio. Su síntesis se realiza in situ mediante la elongación de las cadenas aplicando técnicas de química combinatoria y fotolitografía. La ubicación de las cadenas en lugares específicos del *chip* posibilita la localización de las zonas hibridadas mediante detección fluorescente, a través de un escáner.

La síntesis se realiza sobre un soporte mediante la incorporación sucesiva de las diferentes bases, hasta conformar la secuencia adecuada. Cada nucleótido contiene un grupo reactivo al que puede unirse otro nucleótido sólo activable por acción de la luz ultravioleta.¹³⁷ Por ello, para realizar la síntesis in situ se utilizan una serie de máscaras que, gracias a su forma y tamaño, permiten que la luz incida sobre las posiciones y regiones donde sea necesaria la construcción de las diferentes cadenas de material genético. Esta máscara, previamente diseñada, será transparente para una determinada longitud de onda y opaca en las zonas a proteger del proceso fotolitográfico. En el primer paso, las secuencias apropiadas de las bases (A, T, G y C) se unirán a los grupos reactivos en el cristal mediante enlace covalente. Este proceso se repetirá una y otra vez con sus correspondientes lavados, hasta generar los oligonucleótidos con las secuencias previstas. (Fig. 23)

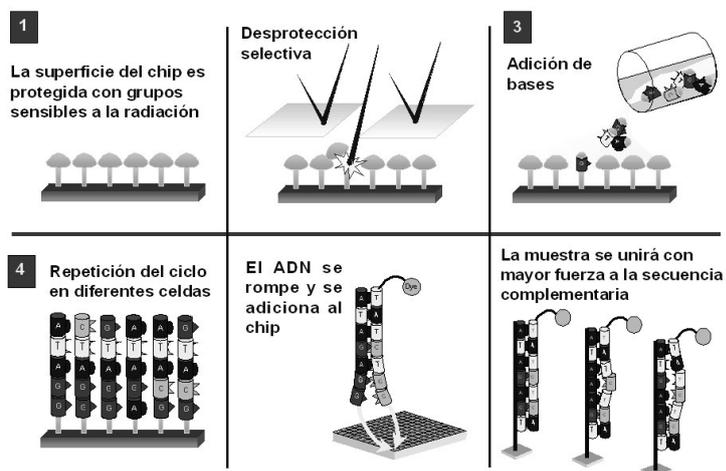


Figura 23. Método de Affymetrix para la construcción de chips de ADN. 1) Los puntos reactivos de la superficie del chip se protegen con grupos sensibles a la radiación. 2) Se realiza la activación de cada punto por la acción de luz, sólo en los sitios que lo permite una máscara. 3) Se añade una base nitrogenada (deoxinucleósido con un grupo protector fotolábil en posición 5') que se inmoviliza en los sitios activados de la superficie. 4) El proceso de inmovilización de las bases nitrogenadas continúa, modificando el patrón de la máscara, activando diferentes sitios y acoplado diferentes bases para conseguir la construcción de sondas de ADN con una secuencia diferente. 5) El chip es puesto en contacto con el analito que se hibrida en aquellos sitios donde encuentra la secuencia de bases complementaria. 6) Se lava para eliminar el sobrante que no ha hibridado, se revela y analiza mediante el patrón de fluorescencia obtenido con un software apropiado.

Cada desarrollo horizontal de la síntesis requiere de cuatro máscaras, una por cada base. Por tanto, un chip que contenga cadenas de 25 nucleótidos requerirá del apoyo de 100 máscaras. En la actualidad existe una nueva metodología de fabricación, en la que para conseguir la activación selectiva se sustituye la máscara por un sistema integrado por cientos de miles de microespejos que, controlados mediante un ordenador, permiten reflejar la radiación necesaria para la desprotección, de una manera dirigida hacia una localización exacta en una región del chip.

Se trata de la misma tecnología DLP (*Digital Light Processor*) utilizada en el cine digital y en la televisión de alta definición originalmente desarrollada por Texas Instruments Inc. Este método de fabricación introducido por NimbleGen System Inc y conocido como la tecnología MAS (*Maskless Array Synthesizer*) permite la obtención de biochips de

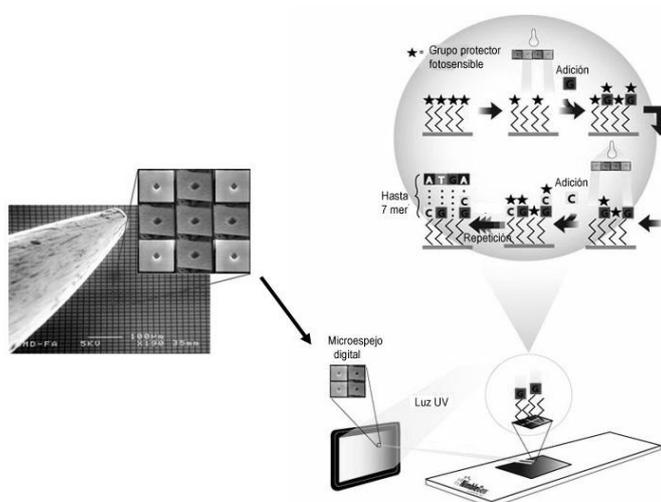


Figura 24. Síntesis de cadenas de oligonucleótidos en microarrays utilizando el sistema de “NimbleGen System's MAS Technology”. El método es similar a la síntesis tradicional con algunas modificaciones. La desprotección se realiza mediante un patrón de reflexión de radiación UV dirigido mediante una matriz compuesta por 786.000 microespejos (Digital Micromirror Device's –DMD–), cuya orientación se controla mediante un microprocesador, por lo que no se requiere recurrir a la combinación de máscaras.

alta densidad, pudiendo llegar a sintetizar hasta 10^8 puntos/cm² en la matriz soporte. (Fig. 24)

HyChip® de Hyseq Inc.

El *Chip* producido por Hyseq (en colaboración con Perkin Elmer) es un *biochip* que utiliza el concepto de secuenciación por hibridación (SBH). La secuenciación se lleva a cabo en un *chip* que contiene inmovilizados

las 1.024 combinaciones posibles de secuencias de oligonucleótidos de 5 bases, que actúan como sondas de captura. El *chip* se incuba con el analito (ADN), con un conjunto de sondas marcadas también de 5 nucleótidos con las 1.024 combinaciones posibles y con la enzima ADN ligasa. La sonda de captura se hibridará con la secuencia complementaria del ADN analito y a su vez una sonda marcada se hibridará con la secuencia inmediata del ADN analito adyacente a la sonda de captura. En este punto intervendrá la ADN ligasa enlazando covalentemente las sondas de captura y la sonda marcada. Por último, un lavado a altas temperaturas eliminará las sondas marcadas que no se han unido a las sondas de captura y al ADN analito. (Fig. 25)

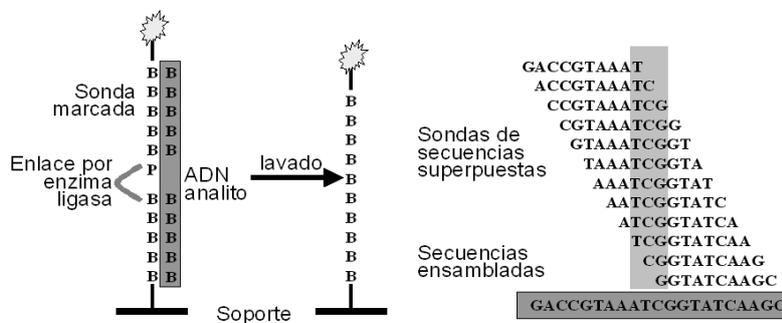


Figura 25. Estrategia de SBH utilizada en los chips secuenciadores de HiSeq.

Las secuencias de las sondas se diseñan de modo que presenten regiones superpuestas, según la estrategia de SBH. La secuencia del ADN analito se ensambla mediante un software apropiado. Debido a que el chip contiene todos los posibles oligonucleótidos de 5 bases, en principio se puede secuenciar cualquier gen. La combinación de las 1.024 secuencias pentámeras, en combinación con las 1.024 sondas marcadas en disolución, permite generar 1.048.754 combinaciones posibles de 10 bases, sin la necesidad de sintetizar o inmovilizar 1 millón de sondas.

Incyte Pharmaceuticals Inc (Synteni)

Estos *chips* son de hibridación comparativa y se utilizan en la investigación de la expresión génica de células mediante el análisis de su ARN mensajero, recurriendo a una hibridación competitiva y dos marcadores fluorescentes de diferente longitud de onda de emisión.

Como muestra la Figura 26, la muestra inicial consiste en dos grupos de células que pueden ser, por ejemplo, tejidos enfermos y sanos o células sometidas a diferentes tratamientos farmacológicos, etc. De estas células se extrae el ARN mensajero, a partir del cual se obtendrá el ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa simple. Este ADN de cada grupo de células se somete a un proceso de marcado con marcadores fluorescentes (tipo Amersham) de dos colores diferentes (Cy3 rojo y Cy5 verde). El ADNc resultante se hibrida con el *chip* siguiendo un proceso competitivo. El *chip* hibridado es sometido a un lavado y posteriormente es escaneado, obteniéndose dos imágenes monocromáticas que son coloreadas por ordenador y superpuestas. La posición y la intensidad de las manchas, así como la relación de las intensidades (Cy3/Cy5) y su desviación del valor unidad, generan la información que se procesará con un software apropiado. Una relación igual a 1 representa que no hay diferencias, valores >1 ó <1 , indicarán, respectivamente, un aumento o disminución de los niveles de expresión relativos frente a la muestra de referencia.

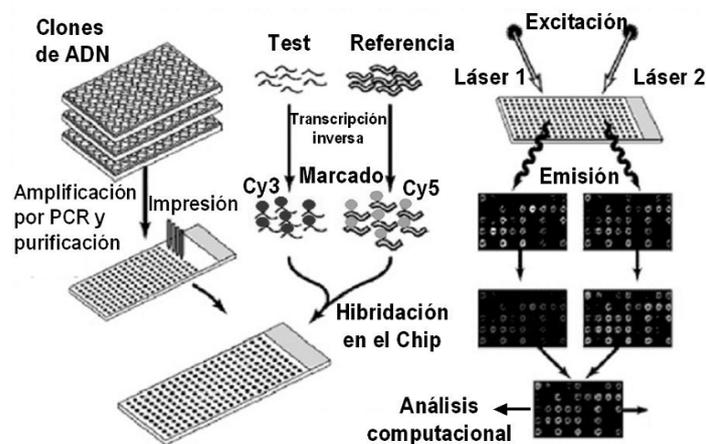


Figura 26. Esquema de la estrategia seguida por Incyte Pharmaceuticals Inc (Synteni) Palo Alto, CA, para la monitorización de la expresión génica. El chip de ADN se prepara por impresión de hasta 10.000 sondas de ADN, de 500 a 5.000 bases, sobre un soporte de vidrio utilizando un robot.

Los datos de expresión génica comparativa tienen múltiples utilidades como identificar y valorar los genes clave para el desarrollo de nuevos medicamentos, establecer la influencia genética en el riesgo de presentar

enfermedades, entender el comportamiento y las interacciones de los genes en células enfermas y sanas o valorar, con carácter previo, la eficacia y la toxicidad de compuestos en un eventual tratamiento farmacológico.

Microarrays de proteínas

Dado que la mayoría de las dianas a las que se dirigen los medicamentos son proteínas, la industria farmacéutica tiene un interés especial en emplear métodos de cribado de alto rendimiento para conocer el perfil de expresión de proteínas. Mientras que los *microarrays* de ADN determinan con gran eficacia los niveles del ARNm expresados en una célula, no pueden medir directamente la cantidad o la función de las proteínas que las diferentes cadenas de ARNm han codificado.

Esto sólo puede conseguirse utilizando los *microarrays* de proteínas. Una vez conocido el perfil de la expresión de proteínas podremos descifrar las bases moleculares de la propia enfermedad.

Los *microarrays* de proteínas también se pueden utilizar para estudiar la susceptibilidad a la enfermedad, para realizar el diagnóstico, monitorizar su progresión y para descubrir puntos potenciales para interferir la enfermedad terapéuticamente, con una mayor precisión y rapidez que con los métodos tradicionales. Por ejemplo, la medida cuantitativa de la combinación de las proteínas del suero en paralelo, será, sin duda, más descriptiva de una enfermedad que la utilización de un único biomarcador, además de que permitirá identificar nuevos biomarcadores (o patrones de éstos) para el diagnóstico y/o el pronóstico.

El desarrollo de los *chips* de proteínas supone un desafío mucho más complejo que los *microarrays* de ADN, dado que la funcionalidad de la proteína depende de numerosas variables, como la posibilidad de modificaciones post-translacionales, su asociación con otras proteínas, su localización subcelular y posibles modificaciones estructurales (Ej. fosforilación).

Otro factor importante es que la dinámica de generación de proteínas no es lineal, ya que no existe una correlación fiable entre la actividad de un gen y la cantidad de proteínas generada.

Su automatización es también muy complicada, en primer lugar porque no existe un método sencillo de amplificación de proteínas equivalente a

la técnica PCR de amplificación del ADN. En segundo lugar, a diferencia del ADN, las proteínas son objeto de modificaciones múltiples desde que son sintetizadas en el ribosoma hasta que asumen su papel en la actividad celular, como rupturas o adición de grupos químicos sencillos (como acetilo, metilo y grupos fosforilo) o también moléculas más complejas como azúcares o lípidos.

Se han descrito cientos de tipos de modificaciones post-translacionales y la complejidad debida a todas ellas se dificulta además por la posibilidad de encadenamientos a diferentes niveles. Por ejemplo, las proteínas pueden ser procesadas de modos diferentes bajo condiciones distintas, lo cual parece ser de importancia crítica en enfermedades como el Alzheimer o la fibrosis quística. En ésta última, por ejemplo, la enfermedad es causada por la mutación de un único gen que codifica el receptor transmembrana de la fibrosis quística -CTFR-. Se trata de un canal iónico de cloro que ve afectada sus funciones reguladoras en la permeabilidad de la membrana celular. Además, la expresión de este receptor varía dentro del propio pulmón, en función del tipo de célula y su localización anatómica. Esta complejidad de funciones asociadas al defecto en un único gen complica la determinación de la proteína CTFR en la enfermedad, así como la identificación de una diana terapéutica apropiada.

Las proteínas pueden también entrecruzarse interna o externamente a través de enlaces bisulfuro. Puesto que las modificaciones estructurales de una proteína y cualquier cambio cuantitativo no son controlados por el mismo gen, la forma activa de una proteína no puede determinarse por referencia a un único gen. Por tanto, establecida la totalidad de los genes del genoma y trasladada a las proteínas correspondientes, todavía queda pendiente el inmenso trabajo de identificar y caracterizar las diferentes formas funcionales de cada una de ellas, en un tipo de célula particular y bajo determinadas condiciones.

Otro factor de complejidad que debe tenerse en cuenta es el número de polimorfismos de su secuencia. El número de diferentes moléculas de proteínas expresadas por el genoma humano puede que se acerque al millón, más que a las cien mil que barajaban los investigadores en genómica.

Para entender toda esta complejidad basta con indicar que el 21 de marzo de 2006 el número de entradas en la base de datos

UniProtKB/Swiss-Prot¹³⁸ (release 49,3) sobre descripción y función de proteínas, era de 13.633 secuencias humanas asociadas con 36.806 modificaciones post-translacionales probadas experimentalmente, 25.465 polimorfismos, 7.213 variantes proteicas encadenadas, con un total de 61.972 referencias.

Los polimorfismos a nivel de la secuencia de la proteína se conocen comúnmente como cSNP (polimorfismo codificado de un único nucleótido) o también por las siglas SAP (polimorfismo de un único aminoácido). Mientras que algunos de estos polimorfismos se relacionan con estados de enfermedad, la mayor parte no lo está, aunque sí influyen en mayor o menor medida en la actividad de la proteína. Por ello un mayor conocimiento sobre la actividad de éstas redundará en un diagnóstico más certero. Un estudio comparativo de las diferentes proteínas y sus combinaciones posibles en tejidos sanos y enfermos ayudará también a identificar las proteínas relacionadas con una determinada enfermedad.

Por todo ello, para poder emplearlas en la fabricación de *microarrays*, es vital que las proteínas mantengan sus propiedades, por lo que el sistema de fabricación se debe además garantizar que el *chip* posea una elevada densidad, que los métodos de deposición/impresión de la proteína sobre el soporte permitan que ésta se encuentre en un ambiente apropiado, en el que la humedad juega un papel determinante.

Materiales blandos como el poliestireno, el polifluoruro de vinilideno o las membranas de nitrocelulosa, que se han venido utilizando para unir proteínas en los análisis bioquímicos convencionales, no son muy apropiados para este fin, ya que no permiten obtener una adecuada densidad, además de que los materiales tienden a dispersarse en su superficie, produciendo una inadecuada relación señal/ruido. Por estas razones, la mayor parte de estos dispositivos utilizan láminas de cristal (portaobjetos para microscopia) u otros materiales compatibles modificados químicamente en su superficie, para poder inmovilizar las proteínas con una densidad elevada.

Se han diseñado numerosos tipos de *chips*, que incluyen estructuras superficiales en tres dimensiones, nanopozos y láminas de cristal completamente planas. Las estructuras tridimensionales se han preparado a partir de paquetes de geles de poli(acrilamida) y delgadas películas de recubrimiento de agarosa,¹³⁹ con la ventaja de que ambos pueden formar

matrices porosas de carácter hidrofílico que favorece la difusión de moléculas como el ADN, proteínas o anticuerpos, que pueden inmovilizarse con rapidez mediante reactivos de entrecruzamiento en la superficie modificada de la matriz. Dada la estructura tridimensional de las matrices en la superficie del cristal, la capacidad de inmovilización es muy superior que en superficies bidimensionales, además de que un entorno acuoso homogéneo minimiza la desnaturalización de la proteína, por lo que ésta permanecerá activa.

En contraste con los *microarrays* tridimensionales, también se han utilizado pocillos nanométricos fabricados a partir de polidimetilxilosano sobre láminas de cristal.¹⁴⁰ El uso de los nanopozos reduce significativamente la evaporación y minimiza el ruido y la contaminación cruzada. Dado que los pozos son estructuras abiertas, se pueden añadir diferentes componentes y disoluciones tampón, facilitando el multianálisis. Además las moléculas capturadas se pueden recuperar de los pocillos con facilidad. También, cubriendo los pozos con oro, se pueden realizar análisis complementarios mediante espectrometría de masas (MS) y resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Son numerosos los grupos de investigación que utilizan chips donde inmovilizan las proteínas o los anticuerpos directamente sobre la superficie plana del cristal. No obstante, para conseguir un ambiente húmedo, durante el proceso de impresión, se utiliza un alto porcentaje de glicerol (30-40%) en la disolución tampón, en un ambiente, también, de humedad elevada.

Para poder unir la proteína sobre un sustrato sólido, la superficie de éste deberá modificarse para conseguir la máxima capacidad de enlace. Una práctica conveniente es recubrir la superficie del cristal con una membrana de nitrocelulosa o de poli-L-lisina, de manera que las proteínas sean adsorbidas sin que no medie ninguna interacción selectiva. No obstante, esta alternativa tiene el inconveniente de que las proteínas quedan depositadas sobre la superficie sin ninguna orientación específica y además pueden desprenderse con facilidad durante la etapa de lavado.

La otra alternativa es recurrir a una interacción más vigorosa mediante enlace covalente. Para ello, y en general, se utiliza un reactivo de entrecruzamiento para formar una capa auto-ensamblada con grupos reactivos, que por uno de sus lados reaccione con los grupos hidroxilo del cristal, dejando el otro lado libre para interactuar con los grupos amino

primario de las proteínas (a través por ejemplo de grupos aldehído o epoxi) o bien poder modificarlos químicamente para conseguir la máxima especificidad.

Otra posibilidad es recubrir la superficie con una capa de oro. Para formar una monocapa sobre la superficie del oro se utiliza el reactivo bifuncional tio-alquileo, de manera que sus grupos SH reaccionarán por un lado con el oro, dejando el otro extremo libre para interactuar con otras moléculas. Puesto que la proteína posee cadenas reactivas que pueden interactuar con la superficie del sustrato, es posible que la inmovilización pueda conducir a una desnaturalización de la proteína que la inactive o simplemente hacerla inaccesible a las sondas utilizadas. Por ello, quizás el mejor medio para la inmovilización de la proteína sea a través de moléculas que reaccionen, con elevada afinidad, con los grupos amino o carboxilo terminales y que se hallen enlazadas a la superficie del cristal. De este modo se consigue también que todas las proteínas se encuentren orientadas sobre la superficie de manera apropiada, permaneciendo activas o con sus centros activos accesibles. Esta opción fue inicialmente utilizada uniendo 5.800 proteínas que contenían una molécula de histidina sobre una lámina de cristal recubierta de níquel.¹⁴¹

Clases de microarrays de proteínas

Existen dos clases de *microarrays*. Los analíticos, que se utilizan para medir la presencia y concentración de proteínas en una muestra compleja, para lo cual se inmovilizan anticuerpos, anticuerpos miméticos u otras proteínas en una matriz, y los *microarrays* funcionales, en los que colecciones de proteínas, o incluso el proteoma entero, son preparados ordenadamente y de modo integrado para utilizarlos en una extensa gama de actividades bioquímicas.

Los *microarrays* analíticos requieren una elevada densidad de reactivos de afinidad y poseen un enorme potencial para monitorizar el perfil de expresión de proteínas a gran escala.

Los *microarrays* de anticuerpos son probablemente los más comunes y se utilizan para la determinación de los antígenos correspondientes, obtenidos a partir del lisado de la muestra. Para su análisis posterior, éstos requieren ser marcados o bien se puede recurrir al empleo de un segundo anticuerpo que también reconoce al antígeno de interés.

El mayor desafío de este tipo de métodos es conseguir un número elevado de reactivos con selectividad suficiente para reconocer la proteína a la velocidad que requieren los métodos de alta capacidad de análisis. Los anticuerpos policlonales quizás no posean la especificidad suficiente y los anticuerpos monoclonales son de laboriosa elaboración, ya que la producción de los hibridomas consume mucho tiempo. En la actualidad se puede recurrir a otras alternativas para producir anticuerpos como las tecnologías de despliegue en fago (*Phage display*), en ribosoma y de ARNm, y también la mencionada técnica SELEX. Todas estas opciones representan la construcción de grandes librerías de regiones viables con actividad enlazante potencial seleccionadas después de múltiples pasos de purificación. La afinidad enlazante de los clones candidatos resultantes puede mejorarse posteriormente utilizando estrategias de maduración. No obstante, el método de selección ideal que sea rápido, sensible, robusto, de bajo coste y automatizado está aún por desarrollarse.

El problema fundamental de los *microarrays* de anticuerpos es la especificidad. Las proteínas se encuentran a menudo dentro de un intervalo de concentración muy amplio (10^6). Por esta razón, las sustancias reactivas que pueden presentar una afinidad elevada para una proteína determinada y baja para otra, podrán detectar esta última si su presencia es mucho más prevalente. Para evitar este problema, muchos grupos de investigación utilizan ensayos tipo sándwich, en los que el anticuerpo primario es previamente colocado sobre la superficie soporte, después se adiciona el antígeno (proteína) y finalmente se añade un segundo anticuerpo, de manera que éste identifique una parte diferente de la proteína. Esta opción incrementa la especificidad de manera considerable, pero requiere de dos anticuerpos de elevada selectividad para cada antígeno que se quiera detectar.

DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICA

Dependiendo de una enorme variedad de circunstancias, incluyendo las enfermedades, los genes pueden encontrarse activados o desactivados. Esto supone que el ARNm, encargado a su vez de activar la producción de una proteína, se produzca o no. Por tanto la presencia de una molécula de ARNm determinada indicará qué tipo de proteína está tratando la célula de expresar.

La respuesta de la célula a una enfermedad o al efecto de un agente externo, como por ejemplo un medicamento, no es normalmente un acontecimiento que afecte a un único gen. Así, por ejemplo, se han identificado 158 genes asociados al cáncer de páncreas que se expresan de un modo diferente a como normalmente lo hacen en personas sanas.¹⁴² En otras enfermedades como el *Alzheimer*, la diferente expresión de 5 genes característicos en los enfermos que la padecen, abre la posibilidad para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico.¹⁴³ Los *microarrays* nos permiten identificar estas situaciones y por tanto son una herramienta diagnóstica de primera magnitud.

Son numerosas las posibilidades que ofrecen estos *biochips* en este campo. A continuación se analizan algunas de las situaciones actuales.

Diagnóstico a través del perfil de expresión genética.

El cáncer representa un claro ejemplo de enfermedad para la que se requiere un tratamiento individualizado. Se trata de una enfermedad que sólo en los Estados Unidos de Norteamérica se diagnostica cada año a 1,4 millones de personas y mueren 600.000 por su causa.¹⁴⁴ Aunque tradicionalmente esta dolencia ha sido considerada como una enfermedad única, existen más de 200 tipos de cáncer, que se producen con diferente frecuencia en todos los órganos y tejidos, siendo el responsable del 12,6% de las muertes anuales a escala mundial.¹⁴⁵ (Tabla V). Cada uno de ellos presenta diferentes variantes, algunas son agresivas otras manejables, algunas fácilmente tratables y otras ineludiblemente fatales. Las tasas de supervivencia de los pacientes diagnosticados de forma tardía no han experimentado prácticamente mejora en los últimos 30 años. Solamente algunas dianas terapéuticas, como los receptores HER-2 de células cancerosas en tumores de mama, se han utilizado con éxito empleando medicamentos específicos como la Herceptina (Trastuzumab). No obstante, como sucedía décadas atrás, la mayor parte de los tratamientos utilizan citostáticos inespecíficos con éxito relativo. La detección temprana del cáncer cervical es un ejemplo alentador que revela la importancia de la utilización de métodos de diagnóstico no invasivos. La generalización de las citologías mediante los programas nacionales, desarrollados durante la segunda mitad del siglo XX, lo pone de manifiesto.

El diagnóstico en etapas curables, el tratamiento y el seguimiento de la enfermedad son por tanto vitales para la supervivencia de los enfermos. La mayor parte de los ensayos utilizados actualmente para este fin adolecen de la capacidad de anticipación necesaria y se basan en la identificación de biomarcadores únicos, con una tasa quizás demasiado alta de falsos resultados (positivos y negativos). Los enormes progresos que la biología molecular ha experimentado en las dos últimas décadas, especialmente la secuenciación del genoma humano completo, abre un abanico para la identificación de nuevos biomarcadores y su utilización en clínica.

La expresión del perfil genético de enfermedades como el cáncer de mama, la leucemia y el cáncer de próstata que tumores similares presentan destacadas diferencias moleculares.¹⁴⁶ Éste es el motivo por el que durante muchos años los especialistas se mostraban desconcertados cuando, por ejemplo, en dos tumores que parecían idénticos, la respuesta y el resultado en pacientes con el mismo tratamiento eran radicalmente contrarios. En realidad los pacientes tenían diferentes enfermedades y por tanto necesitaban distintos tratamientos.

Sólo en oncología se han realizado cientos de estudios de expresión génica ofreciendo una nueva esperanza para el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento de esta enfermedad, incluyendo tanto los tumores conocidos como los raros o poco frecuentes. Estudios sobre el cáncer de pulmón,¹⁴⁷ de mama¹⁴⁸ o de próstata,¹⁴⁹ son algunos de los ejemplos válidos de ello. El desarrollo de nuevos ensayos moleculares permitirá conseguir nuevos métodos de detección temprana lo que redundará en una mejora de los tratamientos y de los resultados a largo plazo.

La leucemia es el cáncer más estudiado mediante el análisis con *microarrays*. En el año 1999, Golub y colaboradores fueron uno de los primeros grupos en utilizar los perfiles de expresión génica para distinguir la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL).¹⁵⁰ Demostraron que tumores diferentes presentaban también distintos perfiles de expresión génica y que éstos podían utilizarse para clasificar las enfermedades en sus respectivos subtipos clínicos. Y lo más importante, es que también demostraron que los perfiles de expresión podían utilizarse para definir nuevos subtipos de

TABLA V. Localizaciones principales de nuevos casos de cáncer y muertes por esta enfermedad en los Estados Unidos.

Nuevos casos estimados				Muertes estimadas			
Hombres		Mujeres		Hombres		Mujeres	
Próstata	33 %	Mama	32 %	Pulmón y Bronquios	31 %	Pulmón y Bronquios	25 %
Pulmón y Bronquios	14 %	Pulmón y Bronquios	12 %	Próstata	10 %	Mama	15 %
Colon y Recto	11 %	Colon y Recto	11 %	Colon y Recto	10 %	Colon y recto	11 %
Vejiga urinaria	6 %	Útero	6 %	Páncreas	5 %	Páncreas	6 %
Melanoma de la piel	4 %	Ovario	4 %	Linfoma (no Hodgkin)	4 %	Ovario	5 %
Linfoma (no Hodgkin)	4 %	Linfoma (no Hodgkin)	4 %	Leucemia	4 %	Linfoma (no Hodgkin)	4 %
Riñón	3 %	Melanoma de la piel	3 %	Esófago	4 %	Leucemia	4 %
Cavidad oral	3 %	Tiroides	3 %	Hígado	3 %	Útero	3 %
Leucemia	3 %	Páncreas	2 %	Vejiga urinaria	3 %	Cerebro	2 %
Páncreas	2 %	Vejiga urinaria	2 %	Riñón	3 %	Mieloma múltiple	2 %
Todos	675.300	Todos	658.800	Todos	285.900	Todos	270.600

Estimado para 2003. Excluidos cáncer de células de tejido basal y escamoso y carcinoma in situ, excepto vejiga urinaria.

Adaptada de¹⁵¹

leucemia. Estudios posteriores con microarrays han permitido discriminar hasta siete subtipos básicos de ALL.¹⁵²

Los trabajos del grupo de Haferlach son un buen ejemplo del valor diagnóstico de la firma de expresión génica, obtenida a través de una amplia gama de leucemias y de los desórdenes relacionados con éstas, incluyendo ALL,¹⁵³ AML¹⁵⁴ y la leucemia aguda promielocítica.¹⁵⁵

Utilizando un *array* de expresión de alta densidad, Spira y colaboradores analizaron células epiteliales de la vía aérea, obtenidas mediante broncoscopia, para obtener patrones de expresión asociados a personas con hábito de fumar. Así, encontraron un patrón formado por 97 genes que distinguen con exactitud fumadores de no fumadores.¹⁵⁶ Curiosamente estos investigadores demostraron que algunos de los cambios experimentados en el perfil de expresión génica eran reversibles a los dos años de abandonar el consumo del tabaco, mientras que otros permanecen invariables. Concretamente encontraron que 13 genes nunca recuperaban los niveles normales de expresión, incluyendo numerosos genes potencialmente supresores (TSGs) que permanecen *subexpresados* (TU3A y CX3CL1) y un número de posibles oncogenes que permanecen *sobreexpresados* (CEACAM6 y HN1). Las mutaciones genéticas, que se producen por efecto del tabaco, pueden explicar estos cambios irreversibles y pueden también explicar por qué algunos individuos permanecen en riesgo de contraer *cáncer de pulmón* a pesar de haber dejado el hábito muchos años atrás.¹⁵⁷

En los Estados Unidos, *el cáncer de boca y garganta* es detectado anualmente en unas 30.000 personas, de las que mueren alrededor de 7.000. El grupo de Wong en UCLA ha desarrollado un *microarray* para identificar de la saliva de pacientes, con carcinoma oral de células escamosas (OSCC), el ARN asociado al tumor.¹⁵⁸ Este grupo de investigación descubrió, a través del perfil de expresión del ARNm de la saliva, que 1.679 genes presentaban diferente expresión comparada con la correspondiente a individuos sanos. Muchos de estos genes en la firma de expresión no tienen una relación directa con la etiología del cáncer, pero son válidos como marcadores indirectos de la existencia de un carcinoma oral.¹⁵⁹ El equipo de investigadores se centró en 7 de los biomarcadores expresados regularmente, incluidas las copias de IL8 (Interleuquina 8), IL1B (Interleuquina 1 beta), DUSP1 (Fosfatasa dual específica 1) OAZ1 (Ornitina descarboxilasa, antienzima 1), S100P

(Proteína P enlazante del calcio) y SAT (Espermidina/espermina 1 acetil transferasa). La combinación de estos marcadores probó su eficacia en el 91 por ciento de los casos, correspondientes a 32 pacientes con la enfermedad, frente a 32 controles sanos. No cabe duda que puede representar un método de diagnóstico temprano frente a los complejos procedimientos quirúrgicos actualmente empleados.

A través de los perfiles de expresión se puede también conocer la etapa en el desarrollo en el *cáncer de ovario*, diferenciando la etapa temprana (I) de etapas avanzadas (II-IV), con una exactitud en el test del 100%, además de poder catalogar las enfermedades *platino resistentes* de las enfermedades sensibles a este medicamento, con una exactitud del 76,9%, como se deduce de los trabajos de De Smet y colaboradores.¹⁶⁰

Los laboratorios Wyeth descubrieron, en el curso de la investigación de un ensayo clínico en fase II, que el perfil de expresión de determinados genes de células mononucleares de sangre periférica se podía relacionar, con exactitud, con el *carcinoma de células renales*, respecto a los pacientes control.¹⁶¹ Es más, Brooks y col¹⁶² identificaron 259 genes de cuya expresión puede predecirse el grado de supervivencia de los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica en este tipo de cáncer. Estos descubrimientos tienen un gran poder tanto diagnóstico como terapéutico, ya que el método de detección del tumor de riñón se realiza fundamentalmente mediante técnicas de imagen y además el 30% de los pacientes, sin metástasis aparente, recaen en la enfermedad y con el tiempo fallecen de ésta. Por ello, la necesidad de un método diagnóstico no invasivo que permita monitorizar a estos pacientes es crucial.

El volumen de datos relativos a los perfiles de expresión génica se ha multiplicado en poco tiempo, lo que en ocasiones hace difícil una adecuada interpretación de su verdadero significado. Como ayuda a esta interpretación la Universidad de Washington, Seattle, ha creado recientemente una página web¹⁶³ llamada “L2L” a través de la cual es posible comparar la lista de los resultados de un test de un *microarray* de expresión con los disponibles en una base de datos con más de 350 listas, correspondientes a los datos compilados de publicaciones con diferentes microarrays.

Diagnóstico a través del análisis del genotipo.

El diagnóstico del cáncer también se puede realizar mediante el análisis del genotipo determinando las mutaciones habidas en el ADN y que causan malignidad celular. El cáncer en muchos casos se produce como consecuencia de aberraciones genéticas, como segmentos con desequilibrio alélico, que se manifiesta con una pérdida de heterocigosidad (LOH) al comparar los enfermos con una población control. Este desequilibrio se puede medir mediante *microarrays* a través del genotipado de SNPs múltiple de regiones que albergan genes supresores.¹⁶⁴ Igualmente, los *arrays* pueden también detectar amplificaciones y deleciones cromosómicas utilizando un método denominado “*Chromosomal Copy Number analysis*” (CCN).¹⁶⁵

Mediante el genotipado de 10.000 a 500.000 SNPs, se puede conseguir un mayor detalle de los cambios cromosómicos, comparativamente con otros métodos de hibridación convencionales, proporcionando un mayor número de marcadores útiles para la detección de distintos tipos de cánceres, como el cáncer de mama, de vejiga, próstata, huesos, boca y de pulmón.

El grupo de Meyerson utilizando un *microarray* capaz de analizar 10.000 SNPs (*Genechip mapping 10K array*) pudo determinar simultáneamente cambios numéricos en la copia de ADN e identificar pérdidas de heterocigosidad en líneas celulares de **cáncer de mama y pulmón**, causadas tanto por deleciones en el ADN como por mutaciones genéticas.¹⁶⁶⁻¹⁶⁷

Seller, en colaboración con Meyerson, trabaja en la caracterización de anomalías genéticas específicas del cáncer, utilizando el nuevo *chip* de 100.000 SNPs-*array*, y recientemente ha reportado un gen crítico MITF, que se encuentra 20 veces amplificado en pacientes con **melanoma metastático** y que además es necesario para la transformación de los melanocitos humanos.¹⁶⁸

David Wong utilizando un *microarray* de 10.000-SNP identificó cambios en el cromosoma 3, tanto en lo correspondiente a la amplificación de su ADN como a deleciones mutacionales, compartidas tanto en células premalignas como cancerosas, en **cánceres de boca**.

Además de su relación con el cáncer, la amplificación y las deleciones genéticas son causas directas en el desarrollo de enfermedades cromosómicas asociadas a la propia evolución, como por ejemplo el síndrome de Down. En 2004 investigadores de la Universidad Friedrich-Alexander, del centro de investigación Max-Delbruck y la empresa Affimetrix, utilizando un *microarray* 10.000-SNP, relacionaron la amplificación y la deleción del ADN con una variedad de síndromes de retraso mental.¹⁶⁹

Diagnóstico a través del perfil proteómico

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas son la llave de todos los procesos fisiológicos y patológicos. El ADN indica qué podría ocurrir, el ARN qué debería ocurrir y las proteínas lo que realmente sucede. Consecuentemente, el progreso real en el diagnóstico y en las estrategias terapéuticas dependerá de los nuevos logros en la identificación de proteínas, su concentración local, su estructura, función e interacción.

El número de proteínas humanas es muy superior al número de genes codificantes estimado en seres humanos. Aunque sólo una fracción de estas proteínas está presente en un momento determinado en una célula en particular, catalogar su estructura y función representa un desafío muy superior al que supuso descifrar la secuencia completa del genoma humano. La búsqueda de biomarcadores específicos para el cáncer no puede esperar a que este megaproyecto haya finalizado. Además, dado que el conjunto de patrones de proteínas para un determinado tejido y grupo de individuos afines es muy similar (más aún si se trata de individuos del mismo sexo, edad y estado fisiológico), quizás resulte más prometedor encontrar las diferencias entre estos patrones de proteínas, que obtener el mapa de proteínas completo de todos los componentes. Un mayor conocimiento sobre qué proteínas son exclusivas de determinados estados fisiológicos permitirá ensayar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas. Quizás para este fin el *chip* de proteínas del tipo *ProteinChip Biomarker System*, desarrollado por Cyphergen Biosystem, Inc.¹⁷⁰ represente una de las mejores alternativas que puede satisfacer esta demanda.

Basado en el proceso bajo patente SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization*), combina dos métodos bien establecidos, como la

cromatografía y la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS), y una aplicación basada en un sistema de fácil manejo de mapeo de diferencias de expresión (*Expression Difference Mapping*TM), integrado todo en una única plataforma.¹⁷¹

El funcionamiento básico de este dispositivo es muy sencillo. Virtualmente cualquier disolución que contenga una proteína puede ser aplicada sobre la superficie de la matriz del chip de proteínas. Esta superficie puede poseer propiedades cromatográficas de diferente naturaleza (hidrofóbicas, hidrofílicas, iónicas o de afinidad metálica) o pueden ser preactivadas con moléculas receptoras (proteínas, ADN o ARN). Las cantidades de muestra necesarias son muy pequeñas (1-10 µg de proteína por aplicación) y el volumen de muestra puede seleccionarse entre 0,5 µL hasta 400 µL. Después de un breve periodo de incubación, las proteínas y cualquier otro contaminante no unido a la superficie del chip se eliminan mediante lavado. Previamente al análisis mediante desorción por láser-TOF, se adiciona una disolución que favorece la absorción de energía por parte de las moléculas, a cada una de las aplicaciones en la matriz del chip. Los resultados son visualizados en un gráfico en el que la relación masa/carga de los componentes de la muestra se representa en el eje de abscisas (“x”) y la intensidad correspondiente para cada uno de ellos en el eje de ordenadas (“y”). Finalmente el software del *ProteinChip* posibilita al usuario establecer las diferencias de expresión mediante un análisis comparativo. El sistema permite procesar 100 muestras al día en modo manual y 400 muestras en modo automático, con sensibilidades del orden femtomolar. (Fig. 27)

El *screening* mediante SELDI de muestras procedentes de biopsias de tejidos cancerosos ha demostrado su eficacia en tumores de pulmón, riñón y melanoma. No obstante, para una mayor aceptación por parte de los pacientes y por razones de coste, sería preferible realizar los ensayos utilizando fluidos biológicos cuya toma de muestra utilice métodos menos invasivos. Así, Adam y colaboradores evaluaron el método para el diagnóstico de cáncer de próstata, analizando muestras séricas de 167 pacientes con este tipo de cáncer, 77 pacientes con hiperplasia benigna de próstata y 82 voluntarios sanos de edades parejas. Se compararon los perfiles seleccionando los picos con mayor poder discriminante, utilizando un algoritmo apropiado. Los ensayos posteriores con muestras ciegas de pacientes revelaron una sensibilidad en el diagnóstico del 83%, con una especificidad del 97%.¹⁷²

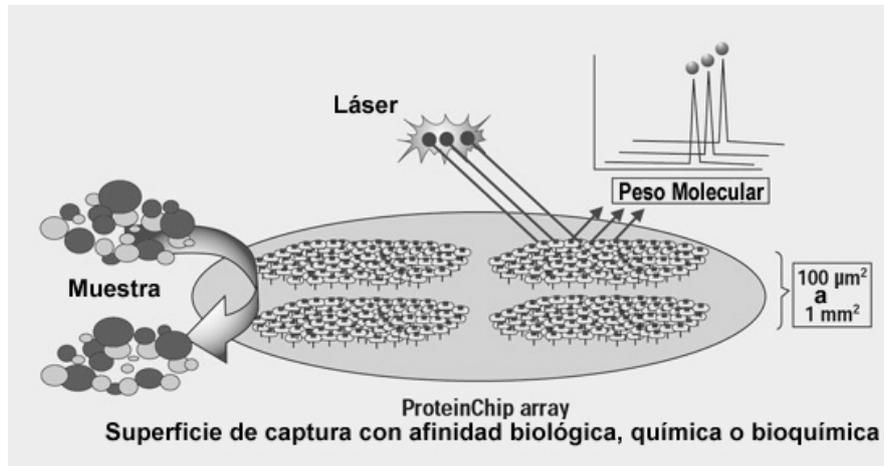


Figura 27. Proceso seguido en el análisis mediante el *microarray* ProteinChip. 1) La muestra de proteínas se adiciona sobre el chip. 2) Se lava para eliminar las especies que no son capturadas 3) Se adiciona la molécula captadora de energía (EAM-Energy Adsorbing Molecule) 4) Lectura del perfil de retención de proteínas mediante Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization y TOF-MS .

La orina se ha utilizado también para la detección de marcadores de cáncer de vejiga y aunque se trata de un fluido biológico que presenta una mayor fluctuación de sus constituyentes en comparación con el suero, la combinación de marcadores ha revelado una sensibilidad del 87% y una especificidad del 66%. Además, se demostró una sensibilidad del 78% para tumores de vejiga de grado bajo, frente al 33% de los métodos citológicos convencionales. Durante este estudio, uno de los marcadores identificados fue el péptido defensiva.¹⁷³

Como ocurre con el cáncer de próstata, la eliminación de biopsias innecesarias resulta fundamental en el cáncer de mama. Los bajos requerimientos de volumen de muestra que caracterizan el uso del *ProteinChip*, permiten la utilización de mínimas cantidades del orden de 1 μL de fluido mamario, aspiradas a través del pezón.¹⁷⁴

Estudios similares se han realizado con muestras séricas para la identificación de cáncer de ovario, con sensibilidades del 100% y especificidades del 95%.¹⁷⁵ También, se han realizado ensayos que permiten diferenciar pacientes con carcinoma hepático de aquellos que padecen enfermedad hepática crónica.¹⁷⁶

Más allá del progreso tecnológico, es de una importancia fundamental diseñar bien estos estudios, de manera que el descubrimiento de nuevos biomarcadores no adolezca de las incertidumbres que, a menudo, han acompañado a estudios pasados. Se necesita, por tanto, la aceptación generalizada de una serie de normas que garanticen los mejores resultados posibles en cada uno de los numerosos proyectos de investigación que actualmente se están desarrollando. La red de investigación de detección temprana (*Early Detection Research Network* –EDRN–) puede servir como ejemplo del establecimiento de redes de investigación establecidas a nivel mundial, con el ánimo de afrontar este desafío. Desde el año 2000 el primer objetivo de la red EDRN (<http://www3.cancer.gov/prevention/cbrg/edrn/>) fue desarrollar unas líneas maestras para la detección y validación de biomarcadores del cáncer en apoyo del intercambio científico internacional, que incluyen la estandarización de reactivos y ensayos, la validación de la metodología estadística y de las herramientas computacionales, la unificación de los informes de los resultados y la mejora de los recursos informáticos y del flujo de información en general. Hoy la constituyen más de 30 instituciones y sus equipos de investigación proceden de distintos ámbitos, como el académico, el sector privado e instituciones gubernamentales. Su objetivo es trasladar los avances en la investigación molecular a la práctica clínica, de manera que permitan identificar el cáncer en sus etapas tempranas de transformación celular e identificar también, poblaciones de riesgo que puedan desarrollarlo, para tratar así de conseguir el reto que se ha marcado el *National Cancer Institute*, de eliminar el sufrimiento y muerte debidos al cáncer en el año 2015.¹⁷⁷

Información genética y utilidad terapéutica

Existen más de 40 ejemplos de *arrays* utilizados en investigación clínica para clasificar marcadores de enfermedades y permitir predicciones en la eficacia de los tratamientos.

Identificar las variaciones genéticas asociadas con la respuesta a medicamentos, su eficacia y su seguridad, representa una de las aplicaciones más prometedoras del análisis completo del genoma. Los *microarrays* con capacidad para determinar por encima de 100.000 polimorfismos de un solo nucleótido, distribuidos a lo largo del genoma, permiten a los investigadores determinar de una manera rápida los grupos

de población que podrán responder o no a un determinado medicamento, en virtud de sus fenotipos, así como su eficacia y su toxicidad. No cabe duda de que este tipo de estudios ayudará a elucidar los genes que contribuyen a la variabilidad de respuesta a los medicamentos.

En las etapas finales de los ensayos clínicos, por ejemplo, los *microarrays* pueden ser útiles para estratificar poblaciones de pacientes y descartar aquellos, con una respuesta terapéutica pobre o toxicológica inadecuada, en la planificación de los ensayos en fase III. Esta estratificación ayudaría a asegurar la máxima efectividad mediante una clara diferenciación estadística entre la respuesta al medicamento y al placebo y reduciría el número de pacientes y el coste del ensayo, aumentando las posibilidades de su aprobación por parte de las Autoridades Sanitarias. Además, una vez que el medicamento se ha comercializado, la estratificación de los pacientes podría utilizarse para acelerar la expansión del medicamento hacia nuevas indicaciones, a través de ensayos clínicos en fase IV, de modo más rápido y con muestras de menor tamaño.

La multinacional farmacéutica Novartis, por ejemplo, utilizó, en un reciente ensayo clínico en fase III, perfiles de expresión génica para predecir el éxito o el fracaso de tratamientos sobre la leucemia mielógena crónica.¹⁷⁸ Analizaron patrones de expresión procedentes de pacientes, previamente a los tratamientos, y encontraron un conjunto de 31 genes de “no respuesta” que predice que poseen una probabilidad 200 veces superior de que la terapia fracase.

Similarmente en un ensayo clínico en fase II, llevado a cabo por investigadores del Instituto para la Investigación del Cáncer Dana Farber, para el fármaco Velcade, de Millenium Pharmaceutical, obtuvieron datos farmacogenómicos, mediante *microarrays*, de enfermos de mieloma tratados con el medicamento,¹⁷⁹ que permiten utilizar 30 genes que se relacionan con la respuesta o falta de respuesta a la terapia. Su utilidad clínica como biomarcadores fue posteriormente evaluada en la fase III del ensayo clínico.

El empleo de *microarrays* para identificar marcadores predictivos de enfermedades puede, en último término, proporcionar un tratamiento mejor, personalizado, eficaz y seguro a los enfermos y ayudar a evitar las más de 100.000 muertes anuales, sólo en Estados Unidos, debidas a reacciones adversas a medicamentos.¹⁸⁰

Más allá de los esfuerzos por descubrir genes, los *microarrays* pueden también utilizarse como una herramienta diagnóstica para cribar pacientes con una variación genética en particular que puede afectar a la respuesta a un determinado medicamento. Por ejemplo el *microarray* de Roche *AmpliChip CYP450*¹⁸¹ se utiliza en Europa y en Estados Unidos para identificar ciertas variaciones que ocurren en la metabolización de medicamentos, debidas a alteraciones de los genes metabolizadores del tipo CYP2D6 y CYP2C19. Las variaciones de estos genes afectan a la velocidad con la que un determinado individuo metaboliza muchos de los medicamentos más comúnmente utilizados en el tratamiento de las enfermedades más frecuentes, como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, depresión y trastornos por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). Conociendo estas variaciones puede el médico seleccionar el mejor medicamento y ajustar la dosis con anticipación para un determinado paciente, minimizando también los efectos secundarios del mismo.

Existen alrededor de 10 millones de SNPs que varían en los humanos. Actualmente el proyecto Hapmap¹⁸² pretende catalogar estos patrones de variación genética en muestras de poblaciones de cuatro regiones diferentes del mundo, con la intención de crear un recurso que permita acelerar la identificación de los factores genéticos que puedan afectar a las peculiaridades observadas en la Medicina. La meta principal de este proyecto internacional es comparar las secuencias genéticas de diversos individuos para identificar las regiones cromosómicas donde se comparten las variaciones genéticas. En una primera fase se han evaluado cerca de un millón de lugares diferentes en el genoma humano, para la que se emplearon 269 muestras de ADN que provinieron de personas de raza blanca que vivían en Utah, miembros de la tribu Yoruba de Nigeria, japoneses de la ciudad de Tokio y chinos de la raza han” de Pekín. Los resultados de esta primera fase del proyecto aparecen en la edición del 27 de octubre de 2005 de la revista Nature.¹⁸³ En la siguiente fase se analizarán otros dos millones de posiciones.

Integración y estandarización de los datos

No cabe duda que los *microarrays* se presentan como una herramienta muy prometedora en la medicina personalizada, sin embargo, para conseguirlo plenamente, se necesita la integración de los datos genéticos

con los registros médicos existentes y hacerlos accesibles a la práctica médica. Adicionalmente, la información genética utilizada por los médicos debería generarse y estandarizarse empleando métodos para que la información de un paciente pueda ser fácilmente comparada con la de otro, como un ejercicio pleno de medicina basada en la evidencia.

Affymetrix trabaja en equipo con IBM para proporcionar una solución que integre, de manera ordenada y en un formato centralizado, la investigación en genómica con datos clínicos de pacientes procedentes de bases de datos dispares. Esta infraestructura permitirá a médicos e investigadores aplicar el conocimiento del genoma humano al diagnóstico y tratamientos de enfermedades, mejorando el cuidado del paciente y reduciendo los costes.

La información obtenida mediante el uso de los *microarrays*, y su comparación entre los diferentes laboratorios y hospitales, requiere la estandarización de los datos, tanto en su metodología de obtención como en los criterios utilizados para la elaboración de los informes correspondientes.

La sociedad conocida como *Microarray Gene Expression Society* (MGED) dio el primer paso para el desarrollo de una guía de recomendaciones para la presentación de los datos,¹⁸⁴ permitiendo a los investigadores comparar adecuadamente los resultados de distintos experimentos.

La reproducibilidad de los resultados, entre las diferentes plataformas que utilizan *microarrays*, es por tanto determinante para la correcta interpretación de los mismos. Recientemente Gavin Sherlock analiza esta problemática en un artículo en el apartado News and Views de la revista *Nature methods*,¹⁸⁵ en el que advierte cierta falta de comparabilidad, basándose en el análisis de tres estudios que se publican en el mismo número de la revista, y se pregunta si las discrepancias se podrán solventar o si son inherentes a la propia tecnología.

EPÍLOGO

Los avances futuros en el diagnóstico vendrán de la fusión entre la biología y la nanotecnología, lo que se conoce como la nanobiotecnología. La posibilidad de utilizar nanocables en una configuración integrada abre las puertas para nuevos diagnósticos de

biomarcadores a nivel fentomolar, sin necesidad de utilizar moléculas fluorescentes para su detección. Recientemente Lieber y colaboradores han publicado el uso de un dispositivo FET, a partir de nanocables de silicio, que permite detectar eléctricamente mínimas variaciones de ciertas proteínas en suero sobreexpresadas por células cancerosas.¹⁸⁶ El dispositivo consiste básicamente en una serie de nanotubos que soportan una serie de anticuerpos específicos para las proteínas. Cuando éstas se unen a los anticuerpos, las cargas eléctricas de las proteínas modifican la conductividad de los nanotubos, registrándose en forma de señal. Los dispositivos diseñados por Lieber detectan 5 proteínas marcadoras tumorales, PSA (*prostate-specific antigen*), alfa 1-antiquimiotripsina, antígeno carcinoembriónico, mucina-1 y telomerasa.

Estos dispositivos permiten integrar 200 transistores, lo que abre las puertas a la utilización de métodos de *screening* para diferentes cánceres, sólo con una gota de sangre.

Un dispositivo similar ha sido diseñado por científicos de la NASA Ames Research Center en California. Hua Chen y sus colaboradores utilizan un *array* de nanoelectrodos capaz de detectar eléctricamente simples mutaciones del gen *BRCA1*, asociado con la predisposición a contraer varios tipos de cáncer. Para ello los investigadores utilizan cadenas de ADN complementarias al ADN *BRCA1* que inmovilizan sobre electrodos fabricados a partir de nanotubos de carbono. Una vez producida la hibridación, la oxidación de los nucleótidos sobre el nanoelectrodo provocará cambios cuantificables en la conductividad de los nanotubos, cuyas variaciones se relacionarán con la presencia de alteraciones en el gen.

Los avances en la detección de células cancerosas se han extendido también a la posibilidad de visualizar los tejidos utilizando *Quantum dots*. Así, el grupo de Fangioni del Beth Israel Deaconess Medical Center de Boston, en colaboración con expertos del Mounji Bawendi del Massachusetts Institute of Technology en Cambridge, fabricó una nanoestructura, inspirada en la forma de una cebolla, compuesta por un núcleo interior de cadmio-teluro rodeado de una capa de cadmio-selenio y a su vez todo encapsulado con un compuesto orgánico, para hacerla soluble en agua. Estas nanopartículas absorben y emiten fuertemente en la región infrarroja del espectro. Cuando pequeñas cantidades de éstas se inyectan en los animales de experimentación, las células linfáticas las

aclaran con rapidez hacia los nódulos linfáticos, donde su emisión puede visualizarse a simple vista aproximando la luz de una lámpara halógena a unos centímetros de la piel.¹⁸⁷ Si esta misma situación se diera en los humanos se podría conseguir fácilmente una manera de localizar los nódulos para llevar a cabo las biopsias. No obstante, habrá que esperar a disponer de materiales semejantes, aunque menos tóxicos, para realizar las pruebas en humanos. En la actualidad se están realizando ensayos, con resultados prometedores, utilizando indio como material semiconductor.

Estas nanopartículas emisoras de luz resultan eficaces para detectar tumores próximos a la piel. Sin embargo, para la localización de tejidos más profundos, se investiga con la utilización de nanopartículas magnéticas que pueden ser utilizadas como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética. Así, se han utilizado nanopartículas de óxido de hierro capaces de revelar la presencia de células de cáncer de mama en ratas. Para ello las nanopartículas fueron dirigidas hacia las células tumorales, utilizando un pequeño péptido inmovilizado sobre ellas, llamado LHRH, que localiza y se une a ciertos receptores sobreexpresados en una gran variedad de células tumorales. Los responsables de la investigación reportaron haber obtenido imágenes de tumores de sólo medio milímetro de diámetro. Un tamaño muy inferior al que puede detectarse utilizando la mamografía convencional.

No obstante, la localización de los tumores es sólo el primer paso. Los nanobiotecnólogos están diseñando una serie de partículas para poder también eliminarlos. Muchas de éstas utilizan moléculas guías, como el LHRH, para dirigir los compuestos tóxicos hacia las células tumorales. Científicos de la Universidad Northeastern, en Boston, utilizan nanopartículas que contienen el agente citostático y un anticuerpo, llamado 2C5, que se dirige hacia la superficie de las células cancerígenas humanas. Han podido comprobar que su utilización ralentiza sustancialmente el crecimiento de una variedad de tumores, en parte debido al mayor aporte del medicamento sobre el tumor.

El 8 de febrero de 2005, Abraxis Oncology introdujo el primer producto basado en nanopartículas, dando origen a la nanoterapéutica, en la que el fármaco bien se une a una nanopartícula o bien se encapsula en un contenedor de tamaño nanométrico. Se trataba del *Abraxane*, una nueva forma de *Paclitaxel* encapsulado en albúmina, que ha sido el

primer tratamiento médico diseñado para tratar el cáncer de mama que utiliza realmente esta tecnología. Cada molécula de *Abraxane* (ABI-007) tiene 130 nm de diámetro, lo que le permite traspasar las membranas de vasos sanguíneos, pasar por el intersticio (la zona entre el vaso sanguíneo y el tejido canceroso) y, finalmente, ser captado más eficientemente por el tumor que el *Paclitaxel*.

Una de las grandes ventajas que representa la nanobiotecnología sobre las terapias convencionales es su capacidad de poder combinar más de una función. A pesar de que las nanopartículas son muy pequeñas, éstas son comparativamente grandes en relación con determinadas moléculas que se utilizan habitualmente en terapéutica. Por ello pueden contener otros elementos que lleven a cabo una multiplicidad de funciones. Investigadores de la Universidad de Michigan han diseñado un dispositivo a partir de nanopartículas con tres componentes, que permite localizar, visualizar y destruir los tumores en el cerebro de ratas. Las partículas contienen un núcleo central de óxido de hierro que sirve de agente de contraste MRI (imagen de resonancia magnética) sobre el que se une una copia de un péptido guía (vector molecular) llamado F3 y un compuesto fotosensibilizante llamado *fotofrin* que destruye las células cuando recibe una radiación electromagnética. La supervivencia de las ratas tratadas duplicó a la de los animales control.

Los métodos de secuenciación también se han visto favorecidos con la llegada de la nanotecnología. Los laboratorios **Roche**, empleando la tecnología de **454 Life Sciences**, recurren a la nanotecnología para la secuenciación del ADN, en su “*Genome Sequencer 20 System*”. El método utiliza volúmenes de picolitro lo que permite producir, con un solo instrumento, más de 20 millones de bases en un ciclo analítico de cuatro horas. Esta técnica mejora con holgura la capacidad de los instrumentos basados en las técnicas a macro escala actuales.

El instrumento incorpora un soporte de alta capacidad fabricado a partir de un bloque compuesto por un conjunto de fibras ópticas, que es cortado transversalmente repetidas veces y los cortes sucesivos alineados y fusionados para crear una estructura de 1,6 millones de pocillos de unos 44 μm de diámetro y 55 μm de profundidad, con una distancia entre ellos, de centro a centro, de 50 μm . El resultado es una matriz con una densidad de 480 pocillos por mm^2 , con una capacidad de albergar 75 pL cada uno de ellos.¹⁸⁸ Todo ello facilita una secuenciación alrededor

de 100 veces más rápida que los métodos convencionales y entre 10 y 50 veces más barata. (Fig. 28)

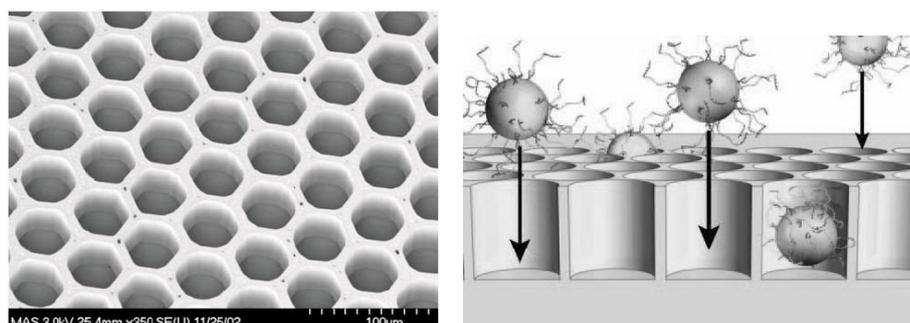


Figura 28. Micrografía de la matriz utilizada en la secuenciación del ADN con “*Genome Sequencer 20 System*”. Adaptada de Margulies, M., et al (2005) Nature 437, 376-380.

El sistema de secuenciación encadenado se basa en el principio de pirosecuenciación desarrollado por Biotaje (Uppsala, Suecia) que utiliza cuatro enzimas, la ADN-polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, así como los sustratos APS (adenosina-5-fosfosulfato) y luciferina.

La primera enzima, en presencia de un cebador, fabrica la cadena de ADN a partir de la hebra complementaria y los nucleótidos correspondientes, la segunda enzima utiliza los productos de la reacción anterior para generar ATP, que es utilizado inmediatamente por la luciferasa para generar un pulso de luz mediante una reacción quimioluminiscente, mientras que la cuarta enzima elimina los nucleótidos sobrantes en cada paso. La intensidad de la señal luminiscente será proporcional al número de nucleótidos incorporados secuencialmente y detectada mediante una cámara CCD acoplada a la base de la matriz de pozos.

A pesar de todos estos progresos, los productos basados en nanotecnología tienen que salvar una serie de impedimentos para que su uso pueda generalizarse en clínica. En primer lugar, los investigadores tienen que encontrar la manera de que las nanopartículas puedan salvar el sistema inmunitario antes de llegar a su lugar de acción y también vencer la capacidad de las células tumorales de expulsarlas una vez hayan conseguido penetrar en su interior. Otro aspecto importante es el nuevo desafío al que se enfrentan los promotores, a la hora de diseñar ensayos

clínicos para partículas que realizan más de una función, dado que los requerimientos para un agente de contraste de imágenes no son los mismos que los que se exigen a un medicamento convencional. Además, la toxicidad potencial de las nanopartículas es algo que todavía no se conoce bien. De hecho, existe una gran preocupación por parte de las agencias de seguridad y salud ambiental, que demandan una regulación sobre el uso de estos materiales.

En cualquier caso si las expectativas para la nanotecnología se cumplen, su repercusión superará el impacto de la revolución industrial, con una proyección de llegar a mover un mercado de 1 trillón de dólares en el año 2015. Su desarrollo prevé cuatro fases.¹⁸⁹ La fase actual es la que las nanoestructuras tienen un sentido pasivo dirigido a llevar a cabo un solo trabajo. La segunda fase es la que se introducirán nanoestructuras para tareas múltiples como por ejemplo activadores, dispositivos de liberación de medicamentos y sensores. En la tercera generación, que se espera emergerá hacia el 2010, incorporarán nanosistemas con miles de componentes interactivos. Algunos años después el primer nanosistema integrado funcionará, en gran medida, como la célula de un mamífero, con sistemas jerarquizados dentro de otros sistemas.

Soy consciente de que he escogido una temática para la elaboración de este discurso, que por su candente actualidad puede que su contenido resulte obsoleto el mismo día que decida interrumpirlo. A punto de finalizarlo, recibí información de que la empresa biotecnológica Affimetrix había lanzado una tecnología de *microarrays*, denominada *GeneChip Human Mitochondrial Resequencing Array 2.0*, que permitirá a la comunidad científica analizar la secuencia completa del genoma mitocondrial en un único experimento de 24 horas de duración.

El *biochip* es capaz de estudiar las 16.500 bases del genoma mitocondrial humano con sólo tres reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), ofreciendo a los investigadores la posibilidad de detectar variantes genéticas relacionadas con enfermedades. También, tiene utilidad en técnicas forenses, estudios poblacionales o investigación con células madre.

El nuevo método permite obtener resultados con una rapidez diez veces superior que con otros métodos convencionales.

Los científicos, no obstante, debemos acostumbrarnos a la abrumadora velocidad con que se hacen y deshacen las cosas relacionadas con la ciencia. La novedad está reñida con el tiempo y la necesaria reflexión que requiere planificar y escribir un discurso de esta naturaleza.

Particularmente considero que la Universidad debería incorporar estos avances a sus aulas y laboratorios docentes con la misma velocidad que se producen, con el fin de garantizar la formación competitiva de sus alumnos. Sé que puede resultar utópico, dado el enorme coste económico que ello supone, aunque iniciativas como la puesta en marcha por el *Genome Consortium for Active Teaching* (GCAT)¹⁹⁰ permiten albergar ciertas esperanzas. Se trata de una asociación que a través de programas colaborativos con universidades y empresas del sector, favorece el empleo de las tecnologías basadas en *microarrays* a un precio razonable, poniéndolas a disposición de los estudiantes en diferentes *campus* de los Estados Unidos.

Y para finalizar, quiero que mis últimas palabras sean para expresar mi firme compromiso de lealtad y dedicación a esta Real Academia, con la esperanza de que, poco a poco, pueda llegar a ser merecedor del inmenso honor que hoy se me hace, admitiéndome como uno más de sus miembros.

He dicho.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN
POR
EL EXCMO. SR. D. VICENTE VILAS SÁNCHEZ
Académico de Número

“Si quieres comprender la función, estudia la estructura”

F.H. Compton CRICK

Excelentísimo Sr. Presidente

Excelentísimas Señoras y Señores Académicos

Ilustres Autoridades, Distinguida Familia, Amigos, Señoras y Señores

Reconozco y agradezco el honor que me ha prodigado la Junta de Gobierno de esta Academia al encomendarme la contestación al discurso de presentación del recipiendario, en un amplio sentido, pues aquí concurren excepcionales circunstancias, al presentar al Ilustre profesor Dr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Decano de la Facultad de Farmacia de Alcalá, y además gran investigador en el terreno de las Técnicas Instrumentales Analíticas como luego comentaremos. No está más lejos de mí deseo presentarles aquí un ramillete de alabanzas, sino la personalidad científica y humana, que le acreditan para pertenecer a esta Docta Institución.

Ha decantado su vida en dos vertientes, la familiar y la de la actividad científica, siguiendo la saga de sus maestros, dentro de la temática de la Técnicas Instrumentales Analíticas, en su enfoque más actualizado y novedoso, siguiendo los pasos de su progenitor el Dr. Manuel Ortega y de nuestro querido amigo el Prof. Dr. Benito del Castillo. A la sazón también Decano de la Facultad de Farmacia de la U CM. Todos nosotros siempre estuvimos imbuidos de la filosofía de la precisión y exactitud, como lema básico.

Voy a reseñar un breve recorrido histórico, para marcar el hilo conductor que nos llevan a las modernas técnicas que el Dr. Ortega, nos acaba de presentar.

En este sentido comentaré, para justificar el introducirnos en esta materia, que hace algunos años, leía mi discurso como Académico Correspondiente, con el tema "Metrología Técnica y Biológica" en el que glosé la problemática filosófico-científica de la Metrología, porque en aquellas fechas era miembro de la Comisión Permanente de Metrología, en donde sustituí al Excmo. Sr. Juan Manuel López de Azcona, Académico Numerario que fue de esta Corporación.

Como ya es sabido, desde lejanos tiempos se plantearon problemas de Metrología en las medidas tanto ponderales como de capacidad, originados por la dispersión de las aplicaciones en los diversos lugares geográficos, los distintos idiomas, e incluso los criterios de aplicación. Todos éstos acontecimientos fueron la causa de encontradas diatribas entre los diversos elaboradores de las formas galénicas al uso.

Hasta la presencia de Hipócrates, no se nos presentan las prescripciones médicas con una dosificación cuantitativa aplicando sistemas de pesos de un remoto origen y de cuya garantía de permanencia y conservación ya nos cita el Deuteronomio (Cap. 25, vers.13-16): *“No tendrás distintos pesos mayor ni menor, ni tendrás en tu casa celemín mayor; tendrás peso justo y verdadero; y celemín igual y verdadero, para que vivas muchos años sobre la tierra que tu Dios y Señor te hubiere señalado, porque el Señor abomina y aborrece a quién hace cosas semejantes, por ser contrario a todo lo que sea injusticia.”*

Tan profundamente arraigó en España este sistema instaurado durante la dominación romana, que subsistió a la invasión bárbara, y estas mismas medidas continuaron usándose en el comercio durante el período de los reyes godos, hasta el desastre de Don Rodrigo. A partir de éste, y a causa de las invasiones africanas, se perdió el control y buena administración de las mismas, aconteciendo en poco tiempo el estado más caótico que se ha conocido, llegándose al extremo de no poderse entender comercialmente unos pueblos con otros.

Mariana en sus obras *“Juannis Mariana septem tractatus”* publicadas en Colonia en 1609, que junto con su tratado de la moneda de vellón, desencadenó tanto revuelo político y social en Europa y especialmente en

España, así como la *“De monetae mutatione”*, donde introduce el concepto de la devaluación fraudulenta de la moneda. En el Cap. 4º de su aportación *“Ponderibus et mesuria”*, cita que los hebreos tenían unas pesas llamadas *“del Santorum”* que constituían los patrones a guardar en el Templo con idéntica finalidad de hacer respetar sus condiciones de invariabilidad, a resguardo de cualquier vicio o modificación.

En las posteriores vicisitudes que la Historia nos deparó, y aunque se volvió a recuperar nuevamente el solar patrio, quedó introducido el desconcierto. Por tal motivo, al entorpecer las relaciones comerciales entre las diversas ciudades y regiones, es por lo que en las Cortes celebradas en Alcalá de Henares (1349) por Don Alfonso XI, se acordó instaurar nuevamente las pesas romanas. Para lo cual, a falta de patrones que habían desaparecido en el largo período de guerras, se mandaron traer dos "Marcos", uno de la ciudad de Colonia (Alemania) y otro de Troyers (Francia), que aún conservaban las antiguas pesas romanas sin ninguna alteración. Ambos *“Marcos”* pesaron igual, pero tenían algunas diferencias en cuanto a su fraccionamiento.

En cuanto a la Farmacia, el sistema utilizado fue el Romano, hasta la aparición de Nicolás de Salerno, que abandonó el sistema de pesas medicinales introducido y hecho universal por Galeno. Con éstas pesas resultaban falseadas las recetas que llenaban los antidotarios de la época.

La escuela de Salerno alcanzó tal preponderancia que, al apartarse de la verdadera doctrina de los antiguos en el empleo de sus pesas, su error se extendió por los países latinos y otros reinos, de tal modo que en Italia y en España no se usaron durante algún tiempo otras pesas que las referidas.

El mismo Emperador Carlos I facultó a don Juan de Ayala como Mercader Mayor de Castilla, en 1553, para que hiciera oficial en España el empleo de las pesas de Salerno en las boticas.

Hasta que, reinando Felipe II, el Protomédico General de todos los reinos y señoríos de Castilla don Francisco de Vallés (El Divino Vallés) las combatió en el: *“Tratado de las aguas destiladas, pesos y medidas de que los Boticarios deuen usar, por nueva ordenança, y mandato de su Mageftad, y su Real Confejo”*, publicado en Madrid en 1592, a la vez que hizo certera apología de las medidas antiguas (consignadas por Galeno), rehabilitando para la Medicina y la Farmacia el verdadero peso romano

que había servido a través de los siglos en el arte de la dosificación y composición de medicamentos.

No todos los boticarios parece ser que siguieran la Pragmática dada por don Felipe II, ordenando la rehabilitación de las pesas romanas a la práctica farmacéutica, como ya expusimos anteriormente, pues la fracción de boticarios que se regían por la "*Pharmacopea Cathalana*" utilizaban un sistema totalmente semejante al Salernitano, diferenciándose del resto de los farmacéuticos del reino, que acataron las órdenes dadas a este respecto y utilizaron en sus oficinas las pesas romanas, como nos indica la "*Pharmacopoeia Matritensis*", de 1739, y la "*Officina Medicamentorum*", Zaragoza, 1698. Ambas que regían como códigos oficiales en Castilla y Aragón, respectivamente. Estas pesas fueron conservadas a través de los años sin ninguna modificación, tal como exigía el "rigorismo científico de la profesión" sin duda alguna estimulado por las normas ordenadas en las sucesivas Farmacopeas que fueron apareciendo en el transcurso de los años.

Con la aparición de la quinta edición de la Farmacopea Española en 1865, dando paso en forma oficial al Sistema Métrico Decimal, termina la utilísima colaboración prestada a la Medicina y la Farmacia durante algo más de veinte siglos de las pesas romanas incorporadas por Galeno.

Con el transcurso del tiempo ha ido evolucionando el contenido de la disciplina de la Técnica Física, (de cuya materia tantos elogios me hizo, hace años, el Prof. Juan Cabrera y Felipe, catedrático de Electricidad y Magnetismo de la Facultad de Ciencias de Zaragoza), hasta la novedosa presentación de las actuales técnicas, que nos ha expuesto el recipiendario.

Una armónica configuración muy imaginativa de los componentes que constituyen el núcleo básico del discurso que acabamos de escuchar, constituye un alarde de estructuración moderna de estas técnicas, que tienen su cimiento en la delicada Metrología de las diversas variables físicas, físico-químicas y biológicas.

Tal progreso ha ido paralelo a la introducción de los avances de la electrónica y la automática en la instrumentación, comenzando por la aplicación de relés de contacto, válvulas, transistores, circuitos integrados, chips, biochips, fibras ópticas, nanoelectrodos, transductores y memorias diversas, tanto de la electrónica analógica como de la digital.

Todos estos adelantos han de permitir que se cumplan los conceptos básicos de “Exactitud”, “Fidelidad” y “Precisión” que deben prevalecer en toda técnica analítica.

Lo que nos hace reflexionar con Michel Faraday, *“Que la gran belleza de nuestra ciencia, es que su avance, lejos de agotar el campo de investigación, de alguna manera abre las puertas a un conocimiento más amplio y diverso, desbordante de hermosura y utilidad”*.

Como nos ha mostrado el Profesor D. Fidel Ortega, en su discurso, nos introduce en el concepto de una nueva practica la "teranostica" en la que la utilización de biomarcadores jugará un importante papel en la calidad de vida, con una monitorización de la aplicación personalizada de los medicamentos.

Nuestro recipiendario posee una innata facultad para la docencia, viniéndome a la memoria una frase de D. Gregorio Marañón en consonancia con esta actividad, que dice *“Ninguna actividad sistematizada y repetida, influye en la sicología y luego en la vida entera tan profundamente como la enseñanza”*. Así, en este discurso nos alecciona coherentemente de los novedosos conceptos de los Biosensores, de su clasificación y capacidades operativas, añadiendo también las técnicas para su construcción. Hace especial mención de la utilización las fibras ópticas, como canales que recogen y transmiten la información luminosa emitida por un marcador fluorescente, o poseyendo en la propia matriz de la fibra el elemento singular de reconocimiento. También hace hincapié en los electrodos específicos, su clasificación y construcción.

Dedica una atención al análisis estructural de los “Nanotubos” y “Nanocables”, originados por la hibridación alotrópica de los átomos de carbono entre los orbitales sp^2 y sp^3 formando una estructura denominada fullereno, de tal forma que los átomos de carbono pueden combinarse originando hexágonos y pentágonos de estructuras tridimensionales cerradas. El fullereno más común es de 60 átomos de carbono, con una estructura estérica parecida a una esfera.

Los nanotubos presentan también estas hibridaciones y se les puede considerar como láminas de grafito enrolladas en forma de tubos, abiertos o cerrados. En estos últimos la terminación es la mitad de un fullereno, éstas estructuras pueden ser de una o varias capas.

También, con esta forma alotrópica del carbono, están “las nanoespumas de carbono” con una curvatura inversa a los fullerenos.

De todos ellos se analizan las sorprendentes propiedades tanto mecánicas como eléctricas. Se comportan como verdaderos conductores de señales eléctricas, lo que facilita construir sensores capaces de detectar la unión entre un soporte específico, con una molécula o una partícula de virus, de ahí que se empleen en la fabricación de biochips.

En su afán docente tan marcado como ya he comentado, nos explica los diversos métodos de fabricación, que yo estimo deben estar reservados a laboratorios altamente especializados y protegidos por patentes de fabricación.

En cuanto a los transductores para aplicación a los biosensores, analiza los muy variados tipos, como los electroquímicos. Sus efectos son determinados por medidas potenciométricas, ya que producen potenciales de contacto, y se concluyen en medidas microvoltamétricas. Por variaciones de la intensidad de corriente. También en las alteraciones de resistencia eléctrica, parejo a la conductividad, o por la densidad de carga detectada en un transistor tipo ISFET.

Los transductores ópticos, analizan las variaciones que sufre el rayo luminoso al contactar con el analito, que puede interferir en la absorción, difracción, polarización, refracción, etc.

Estudia las propiedades de los transductores piezoeléctricos, termométricos, magnéticos y nanomecánicos, con sus peculiaridades y singularidades específicas.

No obstante, para detectar cualquier alteración biológica, siempre hace falta ponerla en evidencia a través de un marcador, que puede ser una molécula que cambia de color, o que emite fluorescencia, o una estructura que induce una señal eléctrica. Esta última forma de detección de cualquier estímulo nos tiene habituados en conocimiento la Fisiología, pues los fotorreceptores de la retina son verdaderos microtransductores óptico-eléctricos. La manifestación de cualquier estímulo que perciben los sentidos desde el medio externo, también se transducen en impulsos bioeléctricos y así toda la conducción nerviosa, tanto aferente como la de retorno.

La aplicación de los biosensores es muy importante en áreas como la medioambiental, alimentaria y clínica, abarcando la detección de pesticidas, herbicidas, derivados halogenados, metales pesados, demanda de oxígeno, detección de la lluvia ácida, toxinas muy diversas, así como los más variados parámetros bioclínicos.

Recientemente, ha aparecido una pléyade de nuevas herramientas para apoyar los retos de los análisis clínicos, estos son los "Biochips." Verdaderas matrices bidimensionales de material biológico, generalmente genético, que permite la automatización simultánea de miles de ensayos, encaminados a conocer con detenimiento la estructura y funcionamiento de nuestra dotación genética, tanto en estados normales como patológicos del paciente.

Su origen está en la miniaturización de las técnicas de afinidad, sobre antígenos y anticuerpos o con moléculas de ADN. Los últimos modelos, permiten el genotipado de más de 500.000 marcadores de polimorfismo de secuencia. En el presente se están mapeando enfermedades genéticas muy variadas y diagnosticando tumores precoces de procesos cancerígenos. Como les llama Javier Sampedro en una nota periodística, "chips de Barbacid".

Los microarrays descritos a fines de los años ochenta, se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato de plástico, cristal, membranas, etc. en posiciones conocidas para la identificación de marcadores predictivos de enfermedades. Estas técnicas están en las primeras páginas de las más prestigiosas revistas de medicina y biotecnología. Pues, como bien dice el recipiendario, estamos ante una plétora de investigación y lo que en este momento es novedad mañana será obsoleto. El progreso científico siempre avanza, lento pero en escalones, en el que uno se apoya en el anterior.

El compromiso de la relación entre la Ciencia y la Universidad, constituye una de las bases decisivas de la humana convivencia y del desarrollo, por más que se desdeñe. Lo cierto es que sin ello no es posible un funcionamiento de la sociedad en general y de la ciencia en particular.

En este momento comentaremos las características profesionales y humanas del Dr. Fidel Ortega, que estudió bachillerato en el colegio Miguel de Cervantes, en Madrid. Obtuvo el título de Licenciado en Farmacia en junio del año 1980 por la Universidad Complutense y el

título de Licenciado con grado con la calificación de Sobresaliente, en el año 1983,

Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense en julio de 1985 con calificación de APTO “cum laude” y premio Extraordinario. Se encuentra en posesión del Título Oficial de “Farmacéutico Especialista en Análisis y Control de Medicamentos y Drogas.”

Inicia su andadura investigadora como becario del Plan de Formación del Personal Investigador en enero de 1981 hasta finales del año 1983, cuando se incorpora al Departamento de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Alcalá como Profesor Ayudante de clases prácticas accediendo, por oposición, a una plaza de Profesor Titular de Universidad el 7 de junio de 1987, en la Universidad de Alcalá. Acogido siempre a la situación administrativa de dedicación exclusiva en su ejercicio docente, que siempre ha coordinado con la Investigación. En el año 1991 disfrutó de una beca del Ministerio de Asuntos Exteriores, que le permitió integrarse en el grupo del Profesor Lo Gorton, en el Departamento de “Analytical Chemistry” en el “Chemical Center” de la Universidad de Lund (Suecia), grupo puntero en la investigación con biosensores electroquímicos.

Ha impartido docencia en las Licenciaturas de Farmacia, Biología y Ciencias Ambientales, en materias de naturaleza analítica, si bien su mayor actividad se ha centrado en el campo del Análisis y Control de Medicamentos, materia que lleva desarrollando desde el año 1986, en la Licenciatura de Farmacia.

La madurez exige preparación para aceptar la realidad de cada día, como indica Amelot de la Houssaye, “El mejor consejo es la experiencia”. De ahí que en sus líneas de trabajo exista la curiosidad noble y sana, no la que Martin Heidegger denunciara en 1942 como peligrosa por predominar sobre la prudencia.

En todo momento ha sido consciente de la medida y el rigor. Su trayectoria investigadora se ha desarrollado en el ámbito del análisis farmacéutico y medio ambiental, muy especialmente en el campo de la Biotecnología y los Biosensores, asistiendo a más de una treintena de congresos y seminarios de distinta naturaleza.

Su contribución científica se plasma en numerosos trabajos publicados en revistas tanto de índole nacional como internacional. Ha participado

en 12 proyectos subvencionados, dos de ellos Europeos, siendo el Investigador principal en 7 de ellos.

También en redes de docencia internacionales bajo el auspicio de la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI), impartiendo cursos y conferencias en diferentes países, Argentina, Universidad de Córdoba (1999). Bolivia, Universidad Mayor de San Andrés (1998) y Cuba, Universidades de Santa Clara y Camagüey (1996).

Ha coordinado numerosas tareas de gestión académica como el del programa SOCRATES/ERASMUS en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá, donde ha formalizado más de un centenar intercambios de estudiantes.

Es actualmente miembro de la Comisión Nacional de la especialidad de Análisis y Control de Medicamentos y Drogas y Evaluador especializado de actividades docentes de formación continuada de la Comunidad de Madrid.

Lleva vinculado al Decanato de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá desde el año 1990, como Secretario de la misma, cuando quién les habla tenía la responsabilidad del Decanato, en donde le reconocí sus excelentes cualidades de organización. Le aconsejé una advertencia evangélica (San Mateo, 10-16) *“Sed prudente como las serpientes y sencillos como las palomas, pues hay que actuar en conciencia, firmeza y coherencia.”*

Posteriormente fue Vicedecano, tiempo en que acrisoló facultades para la gobernabilidad, que luego tendría que aplicar a lo que ahora le corresponde como Decano de la Facultad. Como citaba el presbítero L. Dominique Lacordeire *“Para gobernar se necesita sin duda, la firmeza, pero también mucha flexibilidad, paciencia y comprensión”* así como *“el carácter que es la energía sorda y constante de la voluntad”*, virtudes que le adornan, sobremanera.

Siguiendo en esta misma línea, se pregunta el mismo Lacordaire *“Qué es una familia, sino él más admirable de los gobiernos”*. Por eso también cogobierna una modélica familia con su ínclita esposa, la Excma. Sra. Dña. Celia Baraibar, también Farmacéutica e importante funcionaria de la administración sanitaria, junto con sus dos encantadoras hijas Celia y Sara. A las que saludo con todo respeto y que yo afablemente llamaba “las secretarias”, por las muchas veces que me cogían el teléfono al

irrumpirles la paz e intimidad de su hogar, en horas verdaderamente intempestivas, solicitando una ayuda de mi amigo Fidel, cuando yo empezaba a naufragar en mi ordenador.

Estas admirables señoritas son ahora unas brillantes y prometedoras estudiantes, a las que invito que sigan el ejemplo de sus padres y abuelos y no desfallezcan en el proyecto. A ellas les dedico una frase muy aleccionadora de Albert Einstein *“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica, esta es la voluntad”*.

Todo el hacer de nuestro protagonista de hoy ha supuesto esfuerzos grandes y continuos. Quiero antes de terminar rendir una reflexión justa y necesaria, dirigiéndome a su familia aquí presente, que gracias a su sacrificio personal y afectivo por el mucho tiempo que les ha sustraído, al dedicarse a cultivar su vocación universitaria e investigadora, y que su familia en un acto de grandeza y generosidad le ha ofrecido este sacrificio en el altar de la Ciencia, para que él, hoy pueda ya estar entre nosotros, y ello se enmarca en el pensamiento que manifestó Juan Ruiz de Alarcon **“NUNCA MUCHO COSTÓ POCO”**

Excmo. Sr. Presidente. Excmas. Señoras y Señores Académicos. Distinguidos amigos. Señoras y Señores

Con estas palabras he intentado despojarme a conciencia de toda vanagloria fútil y afectada, ceñirme a lo sustancial y escueto de la personalidad del beneficiario. Cumpliendo un gozoso encargo emotivamente no delegable de recibirle como Académico e invitarle a entrar bajo las bóvedas de este templo de la Ciencia, ungido por el sagrado carisma de la aquiescencia de los que componemos ésta Corporación, que lo recibimos con los brazos abiertos, recordando con Francis Bacon que **“LA SOBERANÍA DEL HOMBRE ESTÁ OCULTA EN SUS CONOCIMIENTOS”**.

REFERENCIAS

1. CASCALES, M., GÓMEZ-LECHON, M.J. O'CONNOR, J.E. (Eds), (2005): Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Modernas Tecnologías Para el Desarrollo de Fármacos. Monografía XVII, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia.
2. Cancer sharpshooters rely on DNA test for a better aim. *Science* (2004):305, 1222.
3. SERVICE, R.F. (2005): Pharmacogenomics: Going from genome to pill. *Science* 308, 1858-1860.
4. RIEDER, M.J., REINER, A.P., GAGE, B.F., NICKERSON, D.A., EBY, C.S., MCLEOD, H.L., BLOUGH, D.K., THUMMEL, K.E., VEENSTRA, D.L., RETTIE, A.E. (2005): Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Eng. J. Med.* 352, 2285-2293.
5. EHLERS, M. (2005): *Drug Discovery & Development. Aug vol. 8 Issue 8, p.12.*
6. JIANRONG, C., YUQUING, M., NONGYUE, H., XIAOHUA, W., SIJIAO, L. (2004): Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances* 22, 505-518.
7. TURNER, A.P.F. (2005): Biosensors & Bioelectronics 20 years on. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2387.
8. TURNER, A.P.F., KARUBE, I., WILSON, G.S. (1987): Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford. 770p.
9. CLARK, L.C. Jnr. (1956): Monitor and control of blood and tissue O₂ tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 2, 41-48.
10. CLARK, L.C., LYONS, C. (1962): Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45.
11. UPDIKE, S.J., HICKS, G.P. (1967): The enzyme electrode. *Nature* 214:986-988.

12. DIVIS, C. (1975): *Annals of Microbiology* 126A, 175-186.
13. GERARD, M., CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D. (2002): Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17, 345-359.
14. LIU, B., YANG, Y.H., WU, Z.Y., WANG, H., SHEN, G.L., YUA, R.O. (2005): Potentiometric acetylcholinesterase biosensor based on plasma-polymerized film. *Sens. Actuators B* 104, 186-190.
15. YAKABE, Y., MATSUNAGA, T. (2005): Development of a novel method for screening of estrogenic compounds using nano-sized bacterial magnetic particles displaying estrogen receptor. *Anal. Chim. Acta.* 532, 105-111.
16. CESPEDES, F., ALEGRET, S. (1996): New materials for electrochemical sensing: glucose biosensors based on rigid carbon-polymer bio-composites. *Food Technol. Biotechnol.* 34, 143-146.
17. ÖNNERFJORD, P., EMNÉUS, J., MARKO-VARGA, G., GORTON, L. ORTEGA, F., DOMÍNGUEZ, E. (1995): Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols. *Biosens. Bioelectron.* 10, 607-619.
18. KANAZAWA, K.K., DIAZ, A.F., GEISS, R.H., GILL, W.D., KWAK, J.F., LOGAN, J.A., RABOLT, J.F., STREET, G.B. (1979): "Organic Metals": polypyrrole, a stable synthetic metallic polymer. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 19, 854-855.
19. GERARD, M., CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D. (2002): Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17, 345-359.
20. ZHANG, S., WRIGHT, G., YANG, Y. (2000): Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* 15, 273-282.
21. CUI, Y., WEI, Q., PARK, H., LIEBER, C.M. (2001): Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science* 293, 1289-1292.

22. KLEMIC, J.F., STERN, E., REED, M.A. (2001): Nanowire sensors decorated with specific capture molecules can detect minute quantities of biological and chemical species. *Nat. Biotechnol.* *19*, 924-925.
23. PATOLSKY, F., ZHENG, G., HAYDEN O., LAKADAMYALI, M., ZHUANG, X., LIEBER, C.M. (2004): Electrical detection of single viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 14017-14022.
24. DAVIS, J.J., COLEMAN, K.S., AZAMIAN, B.R., BAGSHAW, C.B., GREEN, M.L.H. (2003): Chemical and biochemical sensing with modified single walled carbon nanotubes. *Chem. Eur. J.* *9*, 3732–3739.
25. AZAMIAN, B.R., DAVIS, J.J., COLEMAN, K.S., BAGSHAW, C., GREEN, M.L.H. (2002): Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 12664-12665.
26. SOTIROPOULOU, S., GAVALAS, V., VAMVAKAKI, V., CHANIOTAKIS, NA. (2003): Novel carbon materials in biosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* *18*, 211–215.
27. KHAN, G.F. (1996): Organic charge transfer complex based printable biosensor. *Biosens. Bioelectron.* *11*, 1221–1227.
28. LORENZO, E., PARIENTE, F., HERNÁNDEZ, L. (1998): Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* *13*, 319–332.
29. LIU, J., MU, S. (1999): The electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue. *Synthetic Metals* *107*, 159-165.
30. CHO, H. PARK, Z.T., KIM, J.G., BOO, J.H. (2003): Physical and optical properties of plasma polymerized thin films deposited by PECVD method. *Surface and Coatings Technology* *174–175*, 1111–1115.
31. MUGURUMA, H., HIRATSUKA, A., KARUBE, I. (2000): Thin-film glucose biosensor based on plasma-polymerized film: Simple design for mass production. *Anal. Chem.* *72*, 2671-2675.

32. KRANZ, C., WOHLSCHLAGER, H., SCHMIDT, H.L., SCHUHMANN, W. (1998): Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensors based on conducting polymer multilayers. *Electroanalysis* 10, 546–552.
33. ALIVISATOS, P. (2004): The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* 22, 47-52.
34. SEYDACK, M. (2005): Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2454-2469.
35. HAES, A.J., ZOU, S., SCHATZ, G.C., RICHARD, D.R.P. (2004): Nanoscale optical biosensor: short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 108, 6961-6968.
36. WERST, M.H.V., WOUDEBERG, R.H., EMMERINK, P.G., VAN GASSEL, R., HOFSTRAAT, J.W., VERHOEVEN, J.W. (2000): A near-infrared luminescent label based on YbIII ions and its application in a fluoroimmunoassay. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 4542-4544.
37. ASHOORI, R.C. (1996): Electrons in artificial atoms. *Nature* 379, 413-419.
38. WILLARD, D.M. (2003): Nanoparticles in bioanalytics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 284-286.
39. MATSUNAGA, T., KAWASAKI, M., XIE, Y., TUJIMURA, N., NAKAMURA, N. (1996): Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* 68, 3551-3554.
40. WILLNER, I., KATZ, E. (2003): Magnetic control of electrocatalytic and bioelectrocatalytic processes. *Chem. Int. Ed.* 42, 4576-4588.
41. MEDINTZ, I.L., CLAPP, A.R., MATTOUSSI, H., GOLDMAN, E.R., FISHER, B., MAURO, J.M. (2003): Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat. Mater.* 2, 630–638.
42. GAYLORD, B.S., HEEGER, A.J., BAZAN, G.C. (2002): DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10954–10957.

43. TYAGI, S., MARRAS, S.A., KRAMER, F.R. (2000): Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat. Biotechnol.* 18, 1191–1196.
44. ADAMS, D.M.; BRUS, L.; CHIDSEY, C.E.D.; CREAGER, S.; CREUTZ, C.; KAGAN, C.R.; KAMAT, P.V.; LIEBERMAN, M.; LINDSAY, S.; MARCUS, R.A.; METZGER, R.M.; MICHEL-BEYERLE, M.E.; MILLER, J.R.; NEWTON, M.D.; ROLISON, D.R.; SANKEY O.; SCHANZE, K.S.; YARDLEY, J.; ZHU, X. (2003): Charge transfer on the nanoscale: current status. *J. Phys. Chem.–B*, 107, 6668–6697.
45. BENSON, D.E., CONRAD, D.W., DE LORIMIER R.M., TRAMMELL, S.A., HELLINGA, H.W. (2001): Design of bioelectronic interfaces by exploiting hinge-bending motions in proteins. *Science* 293, 1641–1644.
46. FAN, C., PLAXCO, K.W., HEEGER, A.J. (2003): Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9134–9137.
47. VAKUROV, A., SIMPSON, C.E., DALY, C.L., GIBSON, T.D., MILLNER, P.A. (2004): Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1118–1125.
48. DURRIEU, C., TRAN-MINH, C. (2002): Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 206-209.
49. KOJIMA, K., WITARTO, AB., SODE, K. (2000): The production of soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by *Klebsiella pneumoniae*, the alternative host of PQQ enzymes *Biotechnol. Lett.* 22, 1343 .1347.
50. SODE, K. OOTERA, T., SHIRAHANE, M., WITARTO, AB., IGARASHI, S., YOSHIDA, H. (2000): Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by single amino acid replacement. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 491-496.

51. SAKAGUCHI, T., AMARI, S., NAGASHIO, N., MURAKAMI, Y., YOKOYAMA, K., TAMIYA, E. (1998): Genetic transformation of *Trichosporon cutaneum* with a plasmid, pAN 7-1, from filamentous fungi *Biotechnology Letters* 20, 851-855.
52. WATANABE, A., YANO, K., IKEBUKURO, K., KARUBE, I. (1998): Investigation of the potential active site of a cyanide dihydratase using site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 1-4.
53. D'SOUZA, S.F. (2001): Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16, 337-353.
54. LI, B., ZHANG, Z., JIN, Y. (2002): Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling, *Biosens. Bioelectron.* 17, 585-589.
55. GAO, Z., FANG, Y., REN, J., NING, B., ZHU, H., HE, Y. (2004): Studies on biotin-avidin indirect conjugated technology for a piezoelectric DNA sensor. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 84,599 – 606.
56. WOLFBEIS O.S. (2004): Fiber-Optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* 76, 3269-3284.
57. LÓPEZ, M.A., ORTEGA, F. (2002): Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia* 1, 52-60.
58. LÓPEZ, M.A., ORTEGA, F., DOMÍNGUEZ, E., KATAKIS, I. (1998): Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine. *J. Mol. Recogn.* 11, 178-181.
59. CORNELL, B.A., BRAACH-MAKSVYTIS, V.L.B., KING, L.G., OSMAN, PDJ., RAGUSE, B., WIECZOREK, L., PACE, R.J. (1997): Tethered-bilayer lipid membranes as a support for membrane-active peptides. *Nature* 387, 580-583.
60. BRAHA O., GU, L.Q., ZHOU, L., LU, X., CHELEY, S., BAYLEY, H. (2000): Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nature Biotechnol.* 18, 1005-1007.

61. PICKUP, J.C., HUSSAIN, F., EVANS, N.D., ROLINSKI O.J., BIRCH, D.J.S. (2005): Fluorescence-based glucose sensors. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2555-2565.
62. CHEUN, B.S., LOUGHRAN, M., HAYASHI, T., NAGASHIMA, Y., WATANABE, E. (1998): Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins. *Toxicom* 36, 1371-1381.
63. JAYASENA, S.D. (1999): Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 45,1628-1650.
64. JHAVERI, S., RAJENDRAN, M., ELLINGTON, A.D. (2000): In vitro selection of signaling aptamers. *Nature. Biotechnol.* 18, 1293-1297.
65. TOMBELLI, S., MINUNNI, M., MASCINI, M. (2005): Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2424–2434.
66. WANG, J. (1998): DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review. *Biosens. Bioelectron.* 13, 757–762.
67. KINDSCHY, L.M., ALOCILJA, E.C. (2004): A review of molecularly imprinted polymers for biosensor development for food and agricultural applications. *ASAE.* 47, 1375-1382.
68. MOSBACH, K. (2001): Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding of compounds with biological activity (biomimetics): *Anal. Chim. Acta* 435, 3–8.
69. JI, H.S., MCNIVEN, S., LEE, K.H., SAITO, T., IKEBUKURO, K., KARUBE. I. (2000): Increasing the sensitivity of piezoelectric odour sensors based on molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.* 15, 403–409.
70. GONZÁLEZ-RUMAYOR, V., GARCÍA-IGLESIA, E., RUIZ-GALÁN, O., GAGO-CABEZAS, L. (2005): Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación.
71. ULBRICH, R., GOLBI, R., SCHELLENBERGER, A. (1991): Protein adsorption and leakage in a carrier-enzyme system. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 280-287.

72. ANDERSON, G.P., LINGERFELT, B.M., TAITT, C.R. (2004): Eight analyte detection using a four-channel optical biosensor. *Sens. Lett.* 2, 1-7.
73. SELLER, M.J. (2002): DNA microarrays technology: devices, systems, and applications. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 4, 129-153.
74. MATSUMOTO, N.; CHEN, X.; WILSON, G.S. (2002): Fundamental studies of glucose oxidase deposition on a Pt electrode. *Anal. Chem.* 74, 362-367.
75. REISFELD, R., SARAI DAROV, T. (2004): Innovative materials based on sol-gel technology. *Optical Materials* 28, 64-70.
76. NIVENS, D.A., CONRAD, D.W. (2002): Photoactive poly(ethylene glycol) organosilane films for site-specific protein immobilization. *Langmuir* 18, 499-504.
77. HEUBERGER, M., DROBEK, T., SPENCER, N.D. (2005): Interaction forces and morphology of a protein-resistant Poly(ethylene glycol) layer. *Biophys. J.* 88, 495-504.
78. ANDERSON, G.P., JACOBY, A.A., LIGLER, F.S., KING, K.D. (1997): Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 12, 329-336.
79. DONALSON, K.A., KRAMER, M.F., LIM, D.V. (2004): A rapid detection method for Vaccinia virus, the surrogate for smallpox virus. *Biosens. Bioelectron.* 20, 322-327.
80. ZHANG, S., WRIGHT, G., YANG, Y. (2000): Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* 15, 273-282.
81. COSNIER, S. (2005): Affinity biosensors based on electropolymerized films. *Electroanalysis* 17, 1701-1715.
82. THÉVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S. (2001): Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* 16, 121-131.
83. WHANG, D., JIN, S., WU, Y., LIEBER, C.M. (2003): Large-scale hierarchical organization of nanowire arrays for integrated nanosystems. *Nanoletters* 3, 1255-1259.

84. SAUERBREY, G. (1959): The use of quartz crystal oscillator for weighing thin layers and for microweighing applications. *Z. Phys. Chem.* 155, 206.
85. PIRVUTOIU, S., SURUGIU, I., DEY, E. S., CIUCU, A., MAGEARU, V., DANIELSSON, B. (2001): Flow injection analysis of mercury(II) based on enzyme inhibition and thermometric detection. *Analyst* 126, 1612–1616.
86. RICHARDSON, J., HAWKINS, P., LUXTON, R. (2001): The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 16, 989–993.
87. CHEMLA, Y.R., GROSSMAN, H.L., POON, Y., MCDERMOTT, R., STEVENS, R., ALPERT, M.D., CLARKE, J. (2000): Ultrasensitive magnetic biosensors for homogeneous immunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14268-14272.
88. FRITZ, J., BALLER, M.K., LANG H.P., ROTHUIZEN, H., VETTIGER, P., MEYER, E., GÜNTHERODT, H.J., GERBER, CH., GIMZEWSKI, J.K. (2000): Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science* 288, 316-318.
89. WEE, K.W., KANG, G.Y., PARK, J., KANG, J.Y., YOON, D.S., PARK, J.H., KIM, T.S. (2005): Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1932–1938.
90. Norma Española de calidad del agua (1998) UNE-EN 1899-1.
91. KARUBE, I., MATSUNAGA, T., MITSUDA, S., SUZUKI, S. (1977): Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol. Bioeng.* 10, 1535–1547.
92. NAKAMURA, H., KARUBE, I. (2003): Current research activity in biosensors. *Anal. Bional. Chem.* 377, 446-468.
93. PASCO, N., BARONIAN, K., JEFFRIES, C., WEBBER, J., HAY, J. (2004): MICREDOX[®] development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilised *Proteus vulgaris* biocomponent. *Biosens. Bioelectron.* 20, 524–532.

94. KOENIG, A., BACHMANN, T.T., METZGER, J.W., SCHMID, R.D. (1999): Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 112-117.
95. NOMURA, Y., IKEBUKURO, K., YOKOYAMA, K., TAKEUCHI, T., ARIKAWA, Y., OHNO, S., KARUBE, I. (1998): Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 13, 1047-1053.
96. GUILBALT, G.G., NANJO, M. (1975): Phosphate Ion-selective electrode using immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta* 78, 69-74.
97. D'URSO, E.M., COULET, P.R. (1990): Phosphate-sensitive enzyme electrode: a potential sensor for environment control. *Anal. Chim. Acta* 239, 1-5.
98. NAKAMURA, H., TANAKA, H., HASEGAWA, M., MASUDA, Y., ARIKAWA, Y., IKEBUKURO, K., KARUBE, I. (1999): An automatic flow-injection analysis system for determining phosphate ion in river water using pyruvate oxidase G (from *Aerococcus viridans*). *Talanta* 50, 799-807.
99. MOUSTY, C., COSNIER, S., SHAN, D., MU, S. (2001): Trienzymatic biosensor for the determination of inorganic phosphate. *Anal. Chim. Acta.* 443, 1-8.
100. KUBO, I. (2002): Potentiometric phosphate-sensing system utilizing phosphate-binding protein. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 273-275.
101. SASAKI, S., KARUBE, I., HIROTA, N., ARIKAWA, Y., NISHIYAMA, M., KUKIMOTO, M., HORINOCHI, S., BEPPU, T. (1998): Application of nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6 for nitrite measurement. *Biosens. Bioelectron.* 13, 1-5.
102. SASAKI, S., YOKOYAMA, K., TAMIYA, E., KARUBE, I., HAYASHI, C., ARIKAWA, Y., NUMATA, M. (1997): Sulfate sensor using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Anal. Chim. Acta* 347, 275-280.

103. IKEBUKURO, K., MIYATA, A., CHO, S.J., NOMURA, Y., CHANG, S.M., YAMAUCHI, Y., HASEBE, Y., UCHIYAMA, S., KARUBE, I. (1996): Microbial cyanide sensor for monitoring river water. *J. Biotechnol.* 48, 73-80.
104. HAN, T.S., SASAKI, S., YANO, K., IKEBUKURO, K., KITAYAMA, A., NAGAMUNE, T., KARUBE, I. (2002): Flow injection microbial trichloroethylene sensor. *Talanta* 57, 271-276.
105. LASCHI, S., MASCINI, M. (2002): Disposable electrochemical immunosensor for environmental applications. *Ann. Chim.* 92, 425-433.
106. SHIMOMURA, M., NOMURA, Y., ZHANG, W., SAKINO, M., LEE, K.H., IKEBUKURO, K., KARUBE, I. (2001): Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenylx and atrazine. *Anal. Chim. Acta* 434, 223-230.
107. LÓPEZ, M.A., DOMÍNGUEZ, E., ORTEGA, F. (1999): Flow based immunoassay for pesticide analysis, using fluorimetric detection. *Biomedical Chromatography* 13, 1-2.
108. LIM, D.V., SIMPSON, J.M., KEARNS, E.A., KRAMER, M.F. (2005): Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 583-607.
109. JEANTY, G., WOJCIECHOWSKA, A., MARTY, J.L., TROJANOWICZ, M. (2002): Flow-injection amperometric determination of pesticides on the basis of their inhibition of immobilized acetylcholinesterases of different origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 8, 691-695.
110. BACHMANN, T.T., LECA, B., VILATTE, F., MARTY, J.L., FOURNIER, D., SCHMID, R.D. (2000): Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosens. Bioelectron.* 15, 193-201.

111. SASAKI, S., KAI, E., MIYACHI, H., MUGURUMA, H., IKEBUKURO, K., OHKAWA, H., KARUBE, I. (1998): Direct determination of etofenprox using surface plasmon resonance. *Anal. Chim. Acta* 363, 229-233.
112. LÓPEZ, M.A., DOMÍNGUEZ, E., ORTEGA, F. (1999): Inmunoanálisis por inyección en flujo para la detección de atrazina. *Anal. Real. Acad. Farm.* 65, 305-325.
113. OYAMA, M., IKEDA, T., LIM, T.K., IKEBUKURO, K., MASUDA, Y., KARUBE, I. (2001): Detection of toxic chemicals with high sensitivity by measuring the quantity of induced P450 mRNAs based on surface plasmon resonance. *Biotechnol. Bioeng.* 71, 217-222.
114. JI, H.S., MCNIVEN, S., LEE, K.H., SAITO, T., IKEBUKURO, K., KARUBE, I. (2000): Increasing the sensitivity of piezoelectric odour sensors based on molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.* 15, 403-409.
115. JI, H.S., MCNIVEN, S., YANO, K., IKEBUKURO, K., BORNSCHEUER, U.T., SCHMID, R.D., KARUBE, I. (1999): Highly sensitive trilayer piezoelectric odor sensor. *Anal. Chim. Acta* 387, 39-45.
116. MITSUBAYASHI, K., HASHIMOTO, Y. (200): Development of a gas-phase biosensor for trimethylamine using a flavin-containing monooxygenase 3. *Electrochemistry* 68, 901-903.
117. GONZÁLEZ-RUMAYOR, V., GARCÍA-IGLESIA, E., RUIZ-GALÁN, O., GAGO-CABEZAS, L. (2005): Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación.
118. YANO, Y., YOKOHAMA, K., TAMIYA, E., KARUBE, I. (1996): Direct evaluation of meat spoilage and the progress of aging using biosensors. *Anal. Chim. Acta* 320, 269-276.
119. HAYASHI, K., OKUGAWA, T., KOZUKA, Y., SASAKI, S., IKEBUKURO, K., KARUBE, I. (1996): Development of a dual channel chemiluminescence FIA system for rapid measurement of fish freshness. *Anal. Lett.* 29, 2499-2513.

120. AVRAMESCU, A., NOGUER, T., MAGEARU, V., MARTY, J.L. (2001): Chronoamperometric determination of d-lactate using screen-printed enzyme electrodes. *Anal. Chim. Acta* 433, 81-88.
121. CUMMINGS, E.A., LINQUETTE-MAILLEY, S., MAILLEY, P., COSNIER, S., EGGINS, B.R., MCADAMS, E.T. (2001): A comparison of amperometric screen-printed carbon electrodes and their application to the analysis of phenolic compounds present in beers. *Talanta* 55, 1015-1027.
122. ORTEGA, F. (1992): Selective determination of dextrans by liquid chromatography with postcolumn enzymic reaction, using co-immobilized enzymes. *Anal. Chim. Acta* 257, 79-87.
123. NAKAMURA, H., KARUBE, I. (2003) Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 446-468.
124. NEWMAN, J.D., TURNER, A.P.F. (2005): Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2435-2453.
125. ORTEGA, F., CENTENERA J.I., CUEVAS, J.L., DOMINGUEZ, E. (1992): Liquid chromatographic separation of phenolic related drugs using catalytic detection: comparison of an enzyme reactor and enzyme electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 789-796.
126. ORTEGA, F., DOMÍNGUEZ, E. (1996): Selective catalytic detection of dopamine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, 1157-1162.
127. NAKAMURA, H., KARUBE, I. (2003): Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 446-468.
128. MASCINI, M., PALCHETTI, I., MARRAZZA, G. (2001): DNA electrochemical biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 15-22.
129. DONALD, L.E., JEFFREY, A.H. (1996): Surface treatment of polymers for biocompatibility. *Ann. Rev. Mater. Sci.* 26, 365-394.
130. HO, SP., NAKABAYASHI, N., IWASAKI, Y., BOLAND, T., LABERGE, M. (2003): Frictional properties of poly(MPC-co-BMA) phospholipid polymer for catheter applications. *Biomaterials* 24, 5121-5129.

131. ZHANG, S.F., ROLFE, P., WRIGHT, G., LIAN, W., MILLING, A.J., TANAKA, S., ISHIHARA, K. (1998): Physical and biological properties of compound membrane incorporating a copolymer with a phosphoryl-choline head group. *Biomaterials* 19, 691–700.
132. SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
133. PUFFENBERGER, E.G., HU-LINCE, D., PAROD, J.M., CRAIG, D.W., DOBRIN, S.E., CONWAY, A.R., DONARUM, E.A., STRAUSS, K.A., DUNCKLEY, T., CARDENAS, J.F., MELMED, K.R., WRIGHT, C.A., LIANG, W., STAFFORD, P., FLYNN, C.R., MORTON, D.H., STEPHAN, D.S. (2004): Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of TSPYL loss of function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11689-11694.
134. SELICK, G. S., GARRETT, C., HOULSTON, R.S.A. (2003): Novel gene for neonatal diabetes maps to chromosome 10p12.1-p13. *Diabetes* 52, 2636-2638.
135. MIDDLETON, F.A., PATO, M.T., GENTILE, K.L., MORLEY, C.P., ZHAO, X., EISENER, A.F., BROWN, A., PETRYSHEN, T.L., KIRBY, A.N., MEDEIROS, H., CARVALHO, C., MACEDO ,A., DOURADO, A., COELHO, I., VALENTE, J., SOARES, M.J., FERREIRA, C.P., LEI, M., AZEVEDO, M.H., KENNEDY, J.L., DALY, M.J., SKLAR, P., PATO, C.N. (2004): Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 886-897.
136. KLEIN, R.J., ZEISS, C., CHEW, E.Y., TSAI, J-Y., SACKLER, R.S., HAYNES, C., HENNING, A.K., SANGIOVANNI, J.P., MANE, S.M., MAYNE, S.T., BRACKEN, MB. FERRIS, F.L., BARNSTABLE, J.O.C., HOH, J. (2005): Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385-389.

137. PEASE, A.C., SOLAS, D., SULLIVAN, E.J., CRONIN, M.T., CHRISTOPHER, P., HOLMES, C.P., STEPHEN P.A., FODOR, S.P.A. (1994): Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5022-5026.
138. http://www.expasy.org/sprot/hpi/hpi_stat.html
139. ZHU, H., ZINDER, M. (2003): Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 55-63.
140. ZHU, H., KLEMIC, J.F., CHANG, S., BERTONE, P., CASAMAYOR, A., KLEMIC, K.G., SMITH, D., GESTEIN, M., REED, M.A., SNYDER, M. (2000): Analysis of yeast protein kinase using protein chips. *Nat Genet.* 26, 283-289.
141. ZHU, H., BILGIN, M., BANGHAM, R., HALL, D., CASAMAYOR, A., BERTONE, P., LAN, N., JANSEN, R., BIDLINGMAIER, S., HOUEK, T., MITCHELL, T., MILLER, P., DEAN, R.A., GERSTEIN, M., SNYDER, M. (2001): Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293, 2101-2105.
142. LOGSDON, C.D., SIMEONE, D.M., BINKLEY, C., ARUMUGAM, T., GREENSON, J.K., GIORDANO, T.J., MISEK, D.E., HANASH, S. (2003): Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 63, 2649-2657.
143. EMILSSON, L., SAETRE, P., JAZIN, E. (2006): Alzheimer's disease: mRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling. *Neurobiol. Dis.* 21, 618-625.
144. SERVICE, R.F. (2005): Nanotechnology Takes aim at cancer. *Science*, 310, 1132-1134.
145. WIESNER, A. (2004): Detection of tumor markers with proteinchip technology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 45-67.
146. RAMASWAMY, S., GOLUB, T.R. (2002): DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* 20, 1932-41.

147. BEER, D.G., KARDIA, S.L., HUANG, C.C., GIORDANO, T.J., LEVIN, A.M., MISEK, D.E., LIN, L., CHEN, G., GHARIB, T.G., THOMAS, D.G., LIZYNESS, M.L., KUICK, R., HAYASAKA, S., TAYLOR, J.M., IANNETTONI, M.D. ORRINGER, M.B., HANASH, S. (2002): Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat. Med.* 8, 816-824.
148. HUANG, E., CHENG, S., DRESSMAN, H., PITTMAN, J., TSOU, M.H., HORNG, C.F., BILD, A., IVERSEN, E., LIAO, M., CHEN, C.M., WEST, M., NEVINS, J., HUANG, A. (2003): Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 361, 1590-1596.
149. LAPOINTE, J., LI, C., HIGGINS, J.P., VAN DE RIJN, M., BAIR, E., MONTGOMERY, K., FERRARI, M., EGEVAD, L., RAYFORD, W., BERGERHEIM, U., EKMAN, P., DEMARZO, A.M., TIBSHIRANI, R., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O., BROOKS, J.D., POLLACK, J.R. (2004): Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 811-816
150. SHIPP, M.A., ROSS, K.N., TAMAYO, P., WENG, A.P., KUTOK, J.L., AGUIAR, R.C., GAASENBEEK, M., ANGELO, M., REICH, M., PINKUS, G.S., RAY, T.S., KOVAL, M.A., LAST, K.W., NORTON, A., LISTER, T.A., MESIROV, J., NEUBERG, D.S., LANDER, E.S., ASTER, J.C., GOLUB, T.R. (2002): Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.* 8, 68-74.
151. WIESNER, A. (2004): Detection of Tumor Markers with ProteinChip Technology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 45-67.
152. YEOH, E.J., ROSS, M.E., SHURTLEFF, S.A., WILLIAMS, W.K., PATEL, D., MAHFOUZ, R., BEHM, F.G., RAIMONDI, S.C., RELLING, M.V., PATEL, A., CHENG, C., CAMPANA, D., WILKINS, D., ZHOU, X., LI, J., LIU, H., PUI, C.H., EVANS, W.E., NAEVE, C., WONG, L., DOWNING, J.R. (2002): Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell.* 1, 133-143.

153. KOHLMANN, A., SCHOCH, C., SCHNITTGER, S., DUGAS, M., HIDDEMANN, W., KERN, W., HAFERLACH, T. (2004): Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* 18, 63-71.
154. KOHLMANN, A., SCHOCH, C., DUGAS, M., RAUHUT, S., WENINGER, F., SCHNITTGER, S., KERN, W., HAFERLACH, T. (2005): Pattern robustness of diagnostic gene expression signatures in leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 42, 299-307.
155. HAFERLACH, T., KOHLMANN, A., SCHNITTGER, S., DUGAS, M., HIDDEMANN, W., KERN, W., SCHOCH, C. (2005): AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes Cancer* 43, 113-127.
156. SPIRA, A., BEANE, J., SHAH, V., LIU, G., SCHEMBRI, F., YANG, X., PALMA, J., BRODY, J.S. (2004): Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10143-10148.
157. SHAH, V., SRIDHAR, S., BEANE, J., BRODY, J.S., SPIRA, A. (2005): SIEGE: Smoking induced epithelial gene expression database. *Nucleic Acids Res. 33 Database Issue*, D573-9.
158. LI, Y., ZHOU, X., ST JOHN, M.A., WONG, D.T. (2004): RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J. Dent. Res.* 83, 199-203.
159. LI, Y., JOHN, M.A., ZHOU, X., KIM, Y., SINHA, U., JORDAN, R.C., EISELE, D., ABEMAYOR, E., ELASHOFF, D., PARK, N.H., WONG, D.T. (2004): Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 10, 8442-8450.
160. DE SMET, F., POCHE, N.L.M.M., ENGELEN, K., VAN GORP, T., VAN HUMMELEN, P., MARCHAL, K., AMANT, F., TIMMERMAN, D., DE MOOR, B.L.R., VERGOTE, I.B. (2006): Predicting the clinical behavior of ovarian cancer from gene expression profiles. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 147-151.

161. TWINE, N.C., STOVER, J.A., MARSHALL, B., DUKART, G., HIDALGO, M., STADLER, W., LOGAN, T., DUTCHER, J., HUDES, G., DORNER, A.J., SLONIM, D.K., TREPICCHIO, W.L., BURCZYNSKI, M.E. (2003): Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 63, 6069-6075.
162. ZHAO; H., LJUNGBERG, B.; GRANKVIST, K.L; G., RASMUSON, T., TIBSHIRANI, R., BROOKS, J.D. (2006): Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Medicine*, 3(1) e13.
163. <http://depts.washington.edu/l2l/>
164. HOQUE, M.O., LEE, J., BEGUM, S., YAMASHITA, K., ENGLER, J.M., SCHOENBERG, M., WESTRA, W.H., SIDRANSKY, D. (2003): High-throughput molecular analysis of urine sediment for the detection of bladder cancer by high-density single-nucleotide polymorphism array. *Cancer Res.* 63, 5723-5726.
165. BIGNELL, G.R., HUANG, J., GRESHOCK, J., WATT, S., BUTLER, A., WEST, S., GRIGOROVA, M., JONES, K.W., WEI, W., STRATTON, M.R., FUTREAL, P.A., WEBER, B., SHAPERO, M.H., WOOSTER, R. (2004): High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res.* 14, 287-295.
166. JANNE, P.A., LI, C., ZHAO, X., GIRARD, L., CHEN, T.H., MINNA, J., CHRISTIANI, D., JOHNSON, B.E., MEYERSON, M. (2004): High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 23, 2716-2726.
167. ZHAO, X., LI, C., PAEZ, J.G., CHIN, K., JANNE, P.A., CHEN, T.H., GIRARD, L., MINNA, J., CHRISTIANI, D., LEO, C., GRAY, J.W., SELLERS, W.R., MEYERSON, M. (2004): An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* 64, 3060-3071.

168. GARRAWAY, L.A., WIDLUND, H.R., RUBIN, M.A., GETZ, G., BERGER, A.J., RAMASWAMY, S., BEROUKHIM, R., MILNER, D.A., GRANTER, S.R., DU, J., LEE, C., WAGNER, S.N., LI, C., GOLUB, T.R., RIMM, D.L., MEYERSON, M.L., FISHER, D.E., SELLERS, W.R. (2005): Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
169. RAUCH, A., RUSCHENDORF, F., HUANG, J., TRAUTMANN, U., BECKER, C., THIEL, C., JONES, K.W., REIS, A., NURNBERG, P. (2004): Molecular karyotyping using an SNP array for genome wide genotyping. *J. Med. Genet.* 41, 916-922.
170. <http://www.ciphergen.com>
171. ISSAQ, H.J., CONRADS, T.P.; PRIETO, D.A.; TIRUMALAI, R., VEENSTRA, T.D. (2003): SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal. Chem.* 75,148A-155A.
172. ADAM, B.L., QU, Y., DAVIS, J.W., WARD, M.D., CLEMENTS, M.A., CAZARES, L.H., SEMMES O.J., SCHELLHAMMER, P.F., YASUI, Y., FENG, Z., WRIGHT, G.L. JR. (2002): Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res.* 62, 3609-3614.
173. VLAHOU, A., SCHELLHAMMER, P.F., MENDRINOS, S., PATEL, K., KONDYLIS, F.I., GONG, L., NASIM, S., WRIGHT, G.L. JR. (2001): Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am. J. Pathol.* 158, 1491-1502.
174. SAUTER, E.R., ZHU, W., FAN, X.J., WASSELL, R.P., CHERVONEVA, I., DU BOIS, G.C. (2002): Proteomic analysis of nipple aspirate fluid to detect biologic markers of breast cancer. *Br. J. Cancer* 86, 1440-1443.

175. PETRICOIN, E.F., ARDEKANI, A.M., HITT, B.A., LEVINE, P.J., FUSARO, V.A., STEINBERG, S.M., MILLS, G.B., SIMONE, C., FISHMAN, D.A., KOHN, E.C., LIOTTA, L.A. (2002): Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572-577.
176. POON, T.C., YIP, T.T., CHAN, A.T., YIP, C., YIP, V., MOK, T.S., LEE, C.C., LEUNG, T.W., HO, S.K., JOHNSON, P.J. (2003): Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin. Chem.* 49, 752-760.
177. National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention. Third report March 2005. The Early Detection Research Network, Translational research to identify early cancer and cancer risk.
178. MCLEAN, L.A., GATHMANN, I., CAPDEVILLE, R., POLYMERPOULOS, M. H., DRESSMAN, M. (2004): Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Clin. Cancer Res.* 10, 155-165.
179. MULLIGAN, G., KIM, S., STEC, J. (2002): Pharmacogenomic Analyses of Myeloma Samples from Bortezomib (VELCADE™) Phase II Clinical Trial. Proceedings from the 2002 American Society of Hematology meeting. *Blood* 100,391a. Abstract 1519.
180. LAZAROU, J., POMERANZ, B.H., COREY, P.N. (1998): Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama* 279, 1200-1205.
181. http://www.roche-diagnostics.com/products_services/amplichip_cyp450.html
182. <http://www.hapmap.org/>
183. The International HapMap Consortium (2005): A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.

184. BRAZMA, A., HINGAMP, P., QUACKENBUSH, J., SHERLOCK, G., SPELLMAN, P., STOECKERT, C., AACH, J., ANSORGE, W., BALL, C.A., CAUSTON, H.C., GAASTERLAND, T., GLENNISSON, P., HOLSTEGE, F.C., KIM, I.F., MARKOWITZ, V., MATESE, J.C., PARKINSON, H., ROBINSON, A., SARKANS, U., SCHULZE-KREMER, S., STEWART, J., TAYLOR, R., VILO, J., VINGRON, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29, 365-71.
185. SHERLOCK, G. (2005): Of fish and chips. *Nat. methods* 2, 239-240.
186. ZHENG, G., PATOLSKY, F., CUI, Y., WANG W.U., LIEBER, C.M. (2005): Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat. Biotechnol.* 23, 1294-1301
187. KIM, S., LIM, Y.T., SOLTESZ, E.G, DE GRAND, A.M., LEE, J., NAKAYAMA, A., PARKER, J.A., MIHALJEVIC, T., LAURENCE, R.G., DOR, D.M., COHN, L.H., BAWENDI, M.G., AND FRANGIONI, J.V. (2005): Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22, 93-97.
188. MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W.E., ATTIYA, S., BADER, J.S., BEMBEN. L.A., BERKA, J., BRAVERMAN, M.S., CHEN, Y.J., CHEN, Z., DEWELL, S.B., DU, L., FIERRO, J.M., GOMES, X.V., GODWIN, B.C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C.H., IRZYK, G.P., JANDO, S.C., ALENQUER, M.L., JARVIE, T.P., JIRAGE, K.B., KIM, J.B., KNIGHT, J.R., LANZA, J.R., LEAMON, J.H., LEFKOWITZ, S.M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K.L., LU, H., MAKHIJANI. V.B., MCDADE, K.E., MCKENNA, M.P., MYERS, E.W., NICKERSON, E., NOBILE, J.R., PLANT, R., PUC, B.P., RONAN, M.T., ROTH, G.T., SARKIS, G.J., SIMONS, J.F., SIMPSON, J.W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K.R., TOMASZ, A., VOGT, K.A., VOLKMER, G.A., WANG, S.H., WANG, Y., WEINER, M.P., YU, P., BEGLEY, R.F., ROTHBERG, J.M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
189. NEL, A., XIA, T., MÄDLER, L., LI, N. (2006): Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.

190. CAMPBELL, A.M., ECKDAHL, T.T., FOWLKS, E., HEYER, L.J., HOOPES, L.L.M., LEDBETTER, M.L., ROSENWALD, A.G. (2006): Genome Consortium for Active Teaching (GCAT). *Science* 311, 1103-1104.