Detección de marcadores tumorales por biosensores colorimétricos basados en nanotriángulos de Plata

Detection of tumor markers by colorimetric biosensors based on silver nanotriangles

Daniela González Zarate[1], José Luis Zamora Navarro[2], Irma Yadira Izaguirre Hernández[3], Pablo Thomas Dupont[4], José María Remes Troche[5], Luis Zamora Peredo[6]*

Resumen

Introducción. Los nanotriángulos de plata (Ag NTs) tienen la característica de ser coloidales, lo que significa que pueden ser dispersos homogéneamente en una solución líquida. Además, otorgan a la solución coloidal una coloración azul que puede cambiar debido a modificaciones en su morfología o estado de agregación. En los biosensores colorimétricos basados en Ag NTs se debe cuantificar ese cambio de coloración y relacionarlo con el cambio de concentración de la biomolécula objetivo. Objetivo: Diseñar un inmunoensayo colorimétrico, utilizando Ag NTs, para detectar un marcador tumoral. Metodología: Mediante el método de reducción química se sintetizaron Ag NTs y mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se estudió la dispersión de sus tamaños nanométricos. Mediante absorbancia UV-Vis se evaluó su estabilidad química por un periodo de tiempo de 40 días, en el cual su coloración azul se mantuvo estable. Finalmente, se evaluó el comportamiento colorimétrico de la solución coloidal cuando se enlazan diferentes proteínas a la superficie de las Ag NTs. Resultados: Se sintetizaron Ag NTs con un tamaño promedio de 70 nm con excelente estabilidad química mayor a 40 días. Los estudios de absorbancia demuestran que es posible identificar si el cambio en la coloración de la solución coloidal se debe a un cambio en la morfología de la nanopartícula o por aglomeración de estas. Además, es posible identificar cambios en la absorbancia óptica cuando la Ag NTs se enlazan con proteínas, como los marcadores tumorales. Conclusión: Es posible realizar inmunoensayos utilizando soluciones coloidales con Ag NTs para generar cambios en su colorimetría que sean proporcionales a la concentración de marcadores tumorales.

Palabras clave: Nanotriángulos de plata, sensores colorimétricos, absorbancia UV-Vis, marcadores tumorales.

https://doi.org/10.25009/rmuv.2025.1.132

Recibido: 18/03/25
Aprobado: 06/05/25

[1] Maestría, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
[2] Maestría, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
[3] Doctorado, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
[4]Doctorado, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
[5]Doctorado, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
[6]*Doctorado, Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico. luiszamora@uv.mx

Abstract

Introduction: Silver nanotriangles (Ag NTs) have the characteristic of being colloidal, which means that they can be homogeneously dispersed in a liquid solution. In addition, they give the colloidal solution a blue color that can change due to modifications in its morphology or state of aggregation. In colorimetric biosensors based on Ag NTs, this color change must be quantified and related to the change in concentration of the target biomolecule. Objective: To design an Ag NTs-based colorimetric immunoassay to detect a tumor marker. Methodology: Ag NTs were synthesized by the chemical reduction method and the dispersion of their nanometric sizes was studied by means of Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Their chemical stability was evaluated by means of UV-Vis absorbance for a period of 40 days, during which their blue color remained stable. Finally, the colorimetric behavior of the colloidal solution was evaluated when different proteins are bound to the surface of the Ag NTs. Results: Ag NTs with average size of 70 nm were synthesized with excellent chemical stability over 40 days. Absorbance studies demonstrate that it is possible to identify whether the change in the color of the colloidal solution is due to a change in the morphology of the nanoparticle or due to agglomeration of these. Furthermore, it is possible to identify changes in optical absorbance when Ag NTs bind to proteins, such as tumor markers. Conclusion: It is possible to perform immunoassays using Ag NTs colloidal solutions to generate changes in their colorimetry that are proportional to the concentration of tumor markers.

Keywords: Silver nanotriangles, colorimetric sensors, UV-Vis absorbance, tumor markers.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, cuando una mujer sospecha que está embarazada, la primera idea que viene a su mente es realizar una prueba rápida de embarazo. La prueba rápida de embarazo es un ejemplo de un biosensor colorimétrico que rápidamente, sin gastar mucho, con una confiabilidad alta y a simple vista puede determinar si está embarazada o no. Este dispositivo en realidad tiene la capacidad de mostrar una coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) que existe en su sangre y orina [1]. Otro ejemplo de un biosensor colorimétrico es la prueba de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2, que la pandemia de COVID-19 nos obligó a conocer, en la cual se deposita una gota de sangre y la coloración de las líneas nos permite determinar si contamos con anticuerpos IgG y/o IgM [2]. En general, los biosensores colorimétricos pueden ser utilizados para detectar bacterias, micotoxinas, metales pesados, antibióticos, pesticidas, patógenos transmitidos por alimentos, alérgenos, toxinas marinas [3, 4]. Estos dispositivos colorimétricos representan el biosensor ideal, debido a que son de bajo costo, son rápidos, no necesita la interpretación de un especialista, no son invasivos y a simple vista podemos conocer el resultado positivo o negativo del diagnóstico. Sin embargo, el principal reto que tienen este tipo de biosensores es su nivel de sensibilidad y especificidad, razón por la cual muchas investigaciones científicas aún siguen enfocadas en desarrollar nuevas metodologías y nuevos materiales para su optimización.

La detección de marcadores tumorales asociados a diferentes tipos de cáncer también ha utilizado biosensores colorimétricos. Marcadores como la alfa proteína (AFP), el antígeno carcino embrionario (CEA), el antígeno específico de próstata (PSA) y otros antígenos como CA125 y CA15-3 pueden ser detectados y cuan-

tificados por un inmunoensayo ampliamente utilizado como ELISA (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay), en donde se utiliza una enzima para generar la coloración mediante una reacción catalítica y con estudios de absorbancia óptica se puede cuantificar la concentración de anticuerpos o antígenos existentes en muestras de suero sanguíneo [5].

Por su parte, la nanotecnología ha impulsado el desarrollo de los biosensores colorimétricos ya que las metodologías más actuales utilizan nanopartículas metálicas y en comparación con los ensayos colorimétricos tradicionales, el análisis colorimétrico basado en nanopartículas no requiere enzimas como catalizadores. En este caso, el color se genera por el cambio en la absorbancia debido de las nanopartículas metálicas [3]. Las nanopartículas esféricas de oro y plata son las más utilizadas para el diseño de biosensores colorimétricos y generalmente se realizan mediciones de absorbancia para optimizar las curvas de calibración que permiten determinar concentraciones desconocidas de biomoléculas en muestras de suero sanguíneo [5, 6]. Los fenómenos más aprovechados por los inmunoensayos colorimétricos son: el cambio de color debido al cambio de geometría de las nanopartículas, distancia entre las nanopartículas y por aglomeran y precipitan [3, 6]. Por lo anterior, es necesario controlar la síntesis química de las nanopartículas para conocer muy bien el comportamiento de su espectro de absorción óptica en el tiempo y en diferentes soluciones donde estas nanoestructuras estarán disueltas.

En este trabajo presentamos la síntesis de nanopartículas de plata con morfología esférica (NPs) y triangular (Ag NTs) con el objetivo de diseñar un inmunoensayo colorimétrico, utilizando Ag NTs, para detectar un marcador tumoral. Analizamos los espectros de absorbancia UV-Vis de ambas nanoestructuras, donde comprobaremos el cambio de coloración de la solución coloidal originado por el cambio en la geometría de la nanopartícula. Además, evaluamos la estabilidad temporal de Ag NTs durante más de 40 días e identificamos las señales características del espectro de absorbancia cuando las Ag NTs son enlazadas a proteínas como la albumina de suero bovino (BSA) y anticuerpos contra el antígeno carbohidratado 19-9 (Ab CA19-9), marcador tumoral asociado al cáncer pancreático.

METODOLOGÍA

La síntesis de las nanopartículas de plata se realizó mediante el método de reducción química de nitrato de plata (AgNO3) mediante borohidruro de sodio (NaBH4) a una temperatura de 105 ºC y agitación constante a 600 rpm, donde también se debe incluir citrato de sodio y PVP, los cuales permiten que bajo concentraciones específicas se pueda dar forma triangular y plana a las nanoestructuras. Los detalles de las concentraciones y condiciones de síntesis pueden ser consultados en nuestros reportes previos [7].

Para enlazar las proteínas con las Ag NPs se debe funcionalizar la superficie de las nanoestructuras con una delgada capa de 3-ácido mercatopropiónico (3-MPA), lo cual evita que la plata interaccione eléctricamente con las proteínas y modifique su estructura. Posteriormente, se utilizó 125 µL de BSA a una concentración de 1 mg/mL con un tiempo de incubación de 1hr. Para la bioconjugación con el Ab CA 19-9 se utilizaron 25 µL con concentraciones de 5 y 20 µg/mL y se incubó durante 2 horas.

Para el estudio de absorbancia se utilizó un espectrómetro de la marca Thermo Scientific, modelo Genesys 50, con la capacidad de explorar la región ultravioleta y visible de 200 a 1100 nm con una resolución espectral de 2 nm. El estudio de microscopia electrónica de transmisión se realizó con el equipo marca JEOL modelo JEM2010 FEG en una celda de cobre recubierta con carbono con rejillas delgadas del mismo material.

RESULTADOS

La figura 1 muestra la fotografía de las soluciones coloidales con nanotriángulos de plata sintetizados con diferentes concentraciones 1.2, 0.9, 0.6 y 0.3 mL de borohidruro de sodio, A, B, C y D respectivamente. Claramente se observa como la coloración de la solución cambia de amarillo a azul conforme la concentración de borohidruro disminuye, algo que es originado por el cambio en la forma de las nanoparticulas de plata, es bien conocido que cuando las nanopartículas son esféricas el color es amarillo y cuando son triangulares es azul [8]. La figura 2 muestra las imágenes obtenidas por TEM donde se observa claramente que las nanopartículas de la solución amarilla (A) tienen morfología esférica y en la solución azul (D) tienen nanotriangulos. Ademas, se puede observar que dichas nanopartículas tienen dimensiones entre 60 y 70 nm. Por otra parte, la figura 3 muestra los espectros de absorbancia de las soluciones mostradas en la figura 1, claramente se observa que la solución A (amarilla) tiene solo un pico de absorbancia alrededor de 400 nm, mientra que la solución B (línea verde) tiene dos picos adicionales, un pico de poca intensidad en 330 nm y un pico muy ensanchado en 850 nm. En la solución C el pico en 400 nm tiene muy poco intensidad y cuando la concentración de NaBH4 es de 0.3 mL (solución D) dicho pico desaparece. Está bien establecido que la absorbancia en 400 nm es orginida por las partículas esféricas y los otros dos picos de absorción son generados por las partículas triangulares [8], lo que significa que podemos asegurar que en la solución azul solo tenemos nanotriangulos de plata.

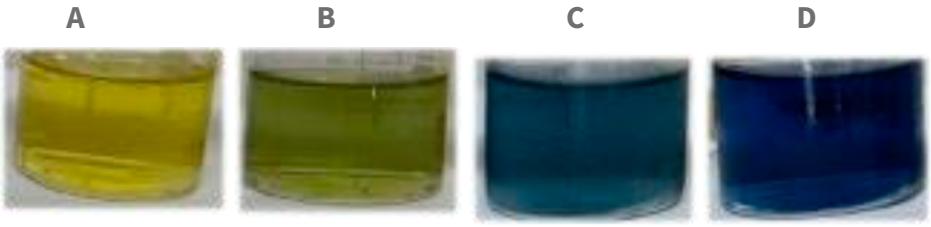


Figura 1. Imágenes de soluciones coloidales que contienen nanopartículas de plata sintetizadas con 1.2 (A), 0.9 (B), 0.6 (C) y 0.3 mL (D) de NaBH4.

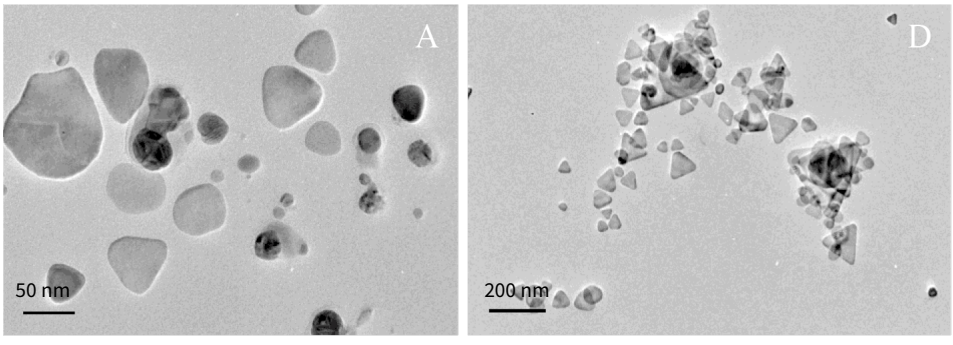


Figura 2. Imágenes TEM de nanopartículas de plata de forma esférica (solución A) y triangular (solución D).

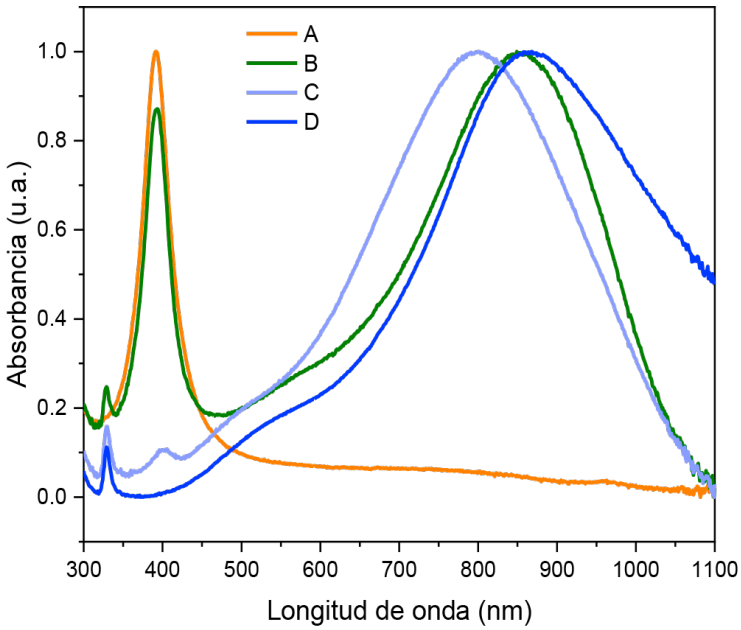


Figura 3. Espectros de absorbancia de soluciones coloidales que contienen nanopartículas de plata sinstetizadas con 1.2 (A), 0.9 (B), 0.6 (C) y 0.3 mL (D) de NaBH4.

La figura 4 muestra los espectros de absorción de soluciones de BSA en PBS, a una concentración de 1 µg/mL y de una solución de anticuerpos CA19-9 con una concentración de 5 µg/mL, en la cual solo se observa un pico de absorbancia en 277 nm para el BSA y en 267 nm para el Ab CA19-9. Estas dos bandas de absorción son una excelente guía para identificar cuando se enlazan estas dos proteinas a la superficie de las Ag NTs, como se muestra en la figura 5, donde se puede observar que cuando se tienen el sistema "Ag NTs + proteína" aparece un nuevo pico de absorción en longitudes menores a 300 nm (línea verde y naranja) en conparación a cuando solo existen Ag NTs (línea azul).

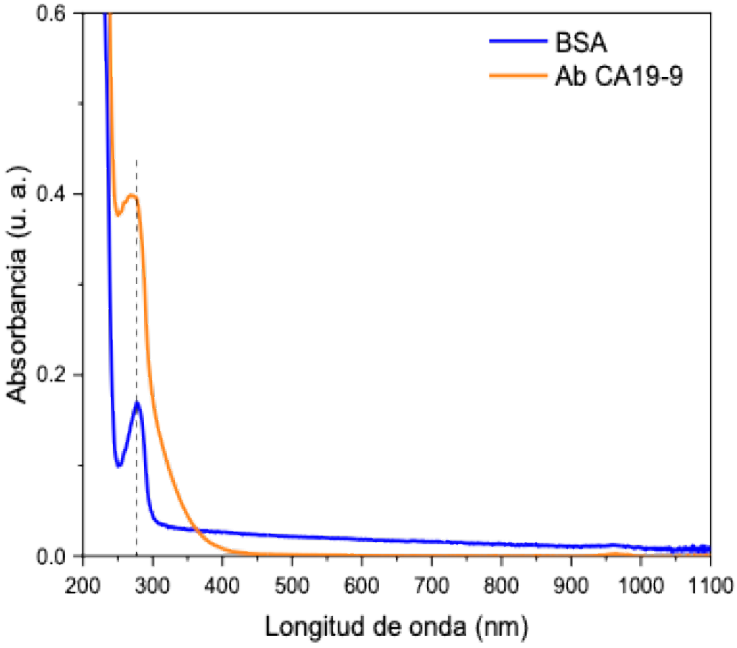


Figura 4. Espectros de absorbancia de soluciones con BSA y Ab CA19-9.

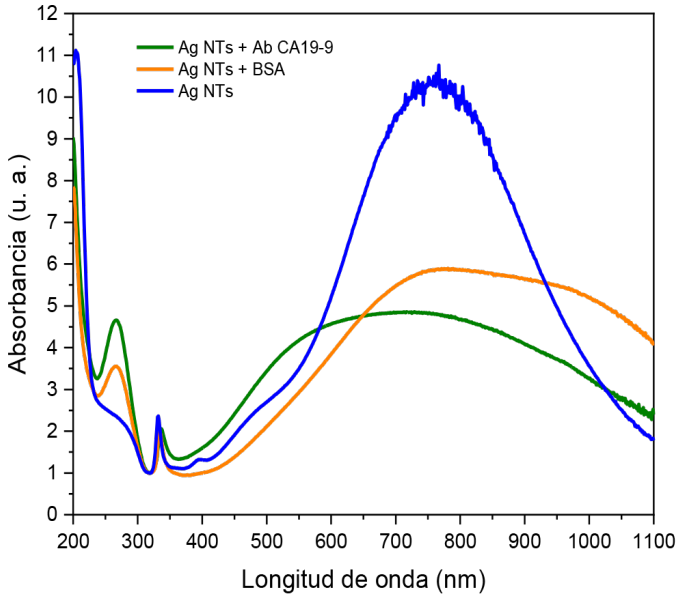


Figura 5. Espectros de absorbancia de soluciones de Ag NTs, Ag NTs con BSA y Ag NTs con Ab CA19-9.

Finalmente, la figura 6 presenta los espectros de absorbancia obtenido de soluciones coloidales donde diferentes concentraciones de Ab CA19-9 se han incubado con una solución de Ag NTs, se observa claramente que el pico de absorción en 267 nm generado por los anticuerpos tiene un aumento en su intensidad originado por el incremento de su concentración en la solución. Además, en la figura 7 se muestran las imágenes de las soluciones coloidales antes y después de agregar un volumen constante de antígenos CA19-9 a cada solución, se puede observar que la solución cambia su coloración en función de la concentración de anticuerpos, lo que sugiere que los antígenos se enlazan a los anticuerpos previamente enlazados a las Ag NTs, generando aglomeración de todo el sistema "nanotriángulos – anticuerpos – antígenos" y su posterior precipitación.

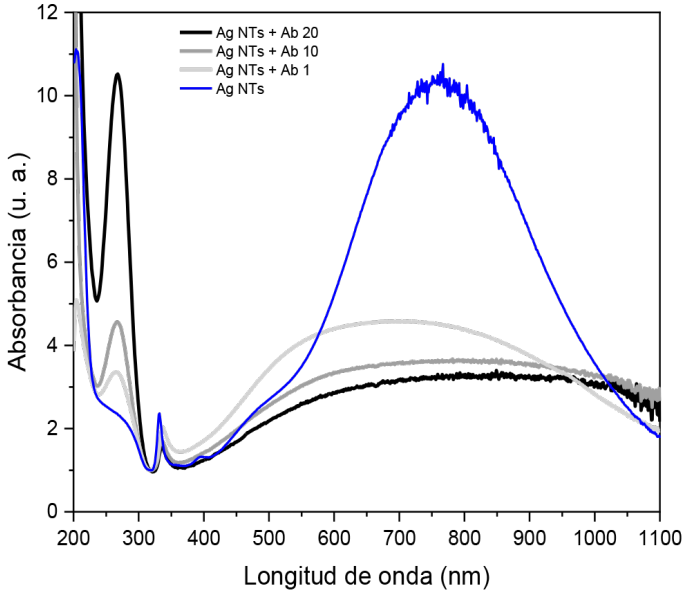


Figura 6. Absorbancia de soluciones con Ag NTs antes y después de incubar Ab CA19-9 con concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL.

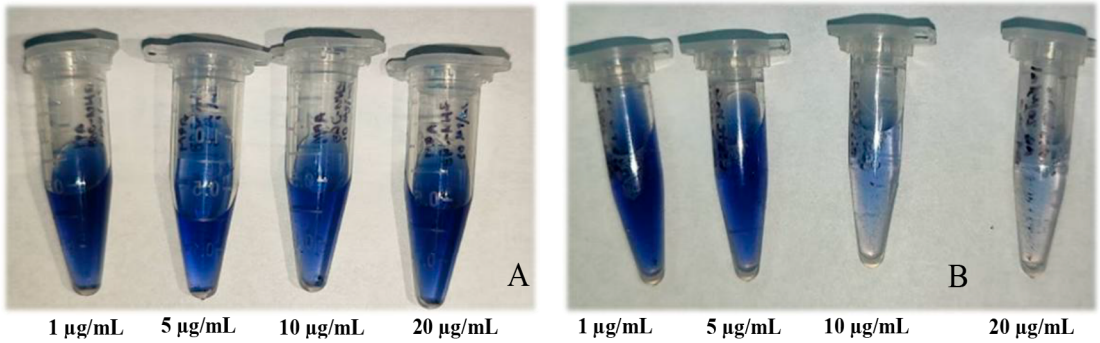


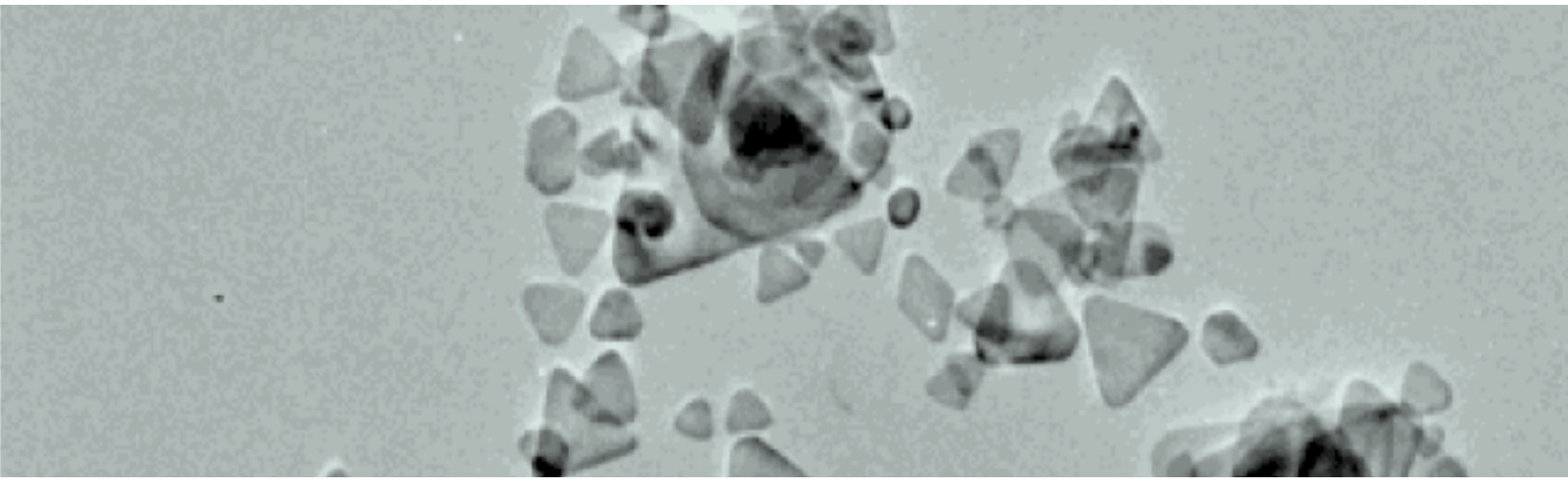
Figura 7. Soluciones de Ag NTs bionjugadas con diferentes concentración de Ab CA19-9 antes (A) y después (B) de agregar el mismo volumen de antígenos CA19-9 a cada vial.

CONCLUSIONES

En esta investigación se evaluó el comportamiento colorimétrico de soluciones coloidales de nanotriángulos de plata originado por cambios en su geometría y su biocojugación con proteínas como la albumina de suero bovino y los anticuerpos contra antígenos CA19-9, asociados al cáncer pancreático. Se demostró que mediante el análisis de la absorbancia óptica es posible diseñar un bioensayo que es capaz de detectar diferentes concentraciones de anticuerpos CA19-9. Esto establece las bases para diseñar un inmunoensayo que permita determinar diferentes concentraciones de marcadores tumorales asociados al cáncer.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (antes CONAHCYT) por el financiamiento recibido mediante el proyecto CF-2023-G-580.



BIBLIOGRAFÍA

1. R. M. Mohamed , S. M. El-Sheikh , M. W. Kadi , A. A. Labib and S. M. Sheta , A novel test device and quantitative colorimetric method for the detection of human chorionic gonadotropin (hCG) based on Au@Zn–salen MOF for POCT applications. RSC Adv. 2023, 13 , 11751 —11761. https://doi.org/10.1039/D2RA07854F

2. A. Sena-Torralba, R. Álvarez-Diduk, C. Parolo, A. Piper, and A. Merkoçi. Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials. Chemical Reviews 2022 122 (18), 14881-14910. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01012

3. J. Zhou, Y. Liu, X. Du, Y Gui, J. He, F. Xie, and J. Cai. Recent Advances in Design and Application of Nanomaterials-Based Colorimetric Biosensors for Agri-food Safety Analysis, ACS Omega 2023, 8, 46346–46361. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06409

4. Li Feng, Mingcheng Zhang and Zhiyi Fan. Current trends in colorimetric biosensors using nanozymes for detecting biotoxins (bacterial food toxins, mycotoxins, and marine toxins). Anal. Methods 2024, 16, 6771–6792. https://doi.org/10.1039/d4ay01184h

5. Yin, Y., Cao, Y., Xu, Y., & Li, G. Colorimetric immunoassay for detection of tumor markers. International Journal of Molecular Sciences 2010, 11(12), 5077–5094. https://doi.org/10.3390/ijms11125077

6. E. Mauriz. Clinical Applications of Visual Plasmonic Colorimetric Sensing. Sensors 2020, 20(21), 6214. https://doi.org/10.3390/s20216214

7. D. González-Zárate, J. L. Zamora-Navarro, M. B. de la Mora, G. Santana-Rodríguez, M. Díaz-Solís, and L. Zamora-Peredo. Influence of Sodium Borohydride Content on Triangular Silver Nanoprisms Dropped on Copper Hydroxide Nanowire-Based SERS Substrates. ACS Omega 2024 9 (47). https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06818

8. M. Zannotti, V. Vicomandi, A. Rossi, M. Minicucci, S. Ferraro, L. Petetta, R. Giovannetti. Tuning of hydrogen peroxide etching during the synthesis of silver nanoparticles. An application of triangular nanoplates as plasmon sensors for Hg2+ in aqueous solution. Journal of Molecular Liquids 2020, 309, 113238. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113238.