



Universidad de Oviedo

MASTER EN CIENCIAS ANALITICAS Y BIOANALITICAS

Trabajo Fin de Máster

***Nanopartículas de Oro vs Nanovesículas como marcas
en un inmunoensayo de Flujo Lateral para detección de
troponina-I cardiaca (cTnI)***

Pablo García Manrique

Junio 2014, Oviedo



M^a Carmen Blanco López, Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Nanopartículas de Oro vs Nanovesículas como marcas en un inmunoensayo de Flujo Lateral para detección de troponina-I cardiaca (cTnI)”

ha sido realizado por el licenciado **Pablo García Manrique**, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 20 de Junio de 2014

Fdo: M^a Carmen Blanco López

Agradecimientos

Quisiera aprovechar la ocasión para dirigir unas palabras de sincero agradecimiento a todas las personas que a lo largo de este curso, por un motivo u otro, han convertido este año del máster en uno de los más gratos a lo largo de mi naciente carrera profesional.

En primer lugar al Dr. Agustín Costa, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación que dirige, todo un privilegio profesional y personal en el que espero haber estado a la altura que se merece tal honor.

A mi directora, la Dr. Carmen Blanco, por trasmitirme su entusiasmo, apoyarme en las contrariedades y compartir su conocimiento y tiempo conmigo.

A Rebeca, Daniel y María, por ser unos excelentes guías en la senda del mundo de las nanovesículas, todo un universo por descubrir. Especialmente, agradecer la dedicación de su tiempo, sabiendo lo apretadas que tienen la agenda.

A Fani, por su inmensa contribución en la revisión del manuscrito y por todo el apoyo mostrado a lo largo de este año. Y por supuesto, a Lucía y Myriam, las mejores compañeras que se puede tener para adentrarse en el mundo Lateral.

No quisiera olvidarme del resto de componentes del grupo, por su cálida acogida en nuestro pequeño hueco en la ciencia, tratándome desde el primer día como un veterano más.

Por último, como no podía ser a María. El pilar central de mi energía, alegría y positivismo con el que afronto el día a día profesional y personal.

A todos vosotros, un profundo y merecido agradecimiento,

Pablo

Clave de abreviaturas y siglas

A lo largo de la memoria se puede encontrar las siguientes siglas y abreviaturas:

POC	<i>Point-of-Care</i> , también denominados dispositivos en cabecera de paciente
LOC	<i>Lab-on-a-Chip</i> , dispositivos miniaturizado de integración de procesos analíticos
LFIA	<i>Lateal Flow ImmunoAssay</i> , Inmunoensayos de flujo lateral
I+D	Investigación y Desarrollo
cTnI	Troponina-I cardiaca, biomarcador de infarto agudo de miocardio
AMI	Acrónimo Inglés de <i>Acute Myocardial Infarct</i> , Infarto agudo de miocardio (IAM)
AuNPs	Nanopartículas de Oro
NPs	Nanopartículas
DLVO	Teoría de estabilidad de coloides, recibe su nombre de las iniciales de sus postuladores: <i>Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek</i>
NVs	Nanovesículas
SRB	Sulforhodamina B
MB	Azul de Metilo

(cuando a la sigla anterior se le combina "nv" hace referencia a los transfersomas que encapsulan una disolución de dicho colorante

Índice de contenido

Listado de abreviatura	i
Introducción	1
1. Introducción	1
1.1 Mercado de los dispositivos <i>Point-of-Care</i> . Test rápidos basado en flujo lateral (LFIA)	2
1.2 ¿Cuándo es útil un dispositivo <i>Point-of-Care</i> ?	5
1.3 Infarto Agudo de Miocardio; un candidato a ser evaluado mediante POC/LOC	6
1.4 Soluciones comerciales de tipo POC/LOC para el diagnóstico de IAM	8
1.5 Nuevas estrategias de amplificación de señal para LFIA y diagnóstico de AMI	10
1.6 Nuevas oportunidades de mejora. Reducción de costes y sistemas de amplificación de la señal.	11
Objetivos	15
Trabajo experimental	16
2. Fundamentos teóricos	16
2.1 Comprendiendo los reactivos I: Nanopartículas de oro y su conjugación a anticuerpos.	16
2.2 Comprendiendo los reactivos II: Nanovesículas	18
2.3 Técnicas instrumentales para el estudio de la optimización y monitorización del proceso de síntesis del conjugado/nanovesícula	21
2.3.1 Espectroscopía UV-visible	21
2.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS) y ζ -potential	22
2.4 Comprendiendo la plataforma analítica: Lateral Flow Immunoassays (LFIA)	24
2.4.1 Componentes	24
2.4.2 Proceso de Diseño y Producción	29
3. Material y métodos	30
3.1 Material	30
3.2 Métodos	31
3.2.1 Sensibilidad de las AuNPs a la fuerza iónica del buffer	31
3.2.2 Obtención del P.I. de un anticuerpo	31
3.2.3 Ensayo de Flocculación	32
3.2.4 Protocolo de conjugación de Ac/AuNPs	32
3.2.5 Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ -potential	32
3.2.6 Montaje de las tiras de flujo lateral	33

3.2.7 Síntesis de nanovesículas de nueva formulación, y conjugación al Ac 9A6.12	33
3.2.8 Medida de la eficacia de encapsulación	34
3.2.9 Estudio de estabilidad de la suspensión de nanovesículas	35
4. Resultados y discusión	36
4.1 Optimización y Caracterización de la conjugación de AuNP/Ac 9A6.12	36
4.1.1 Sensibilidad del oro coloidal a la fuerza iónica del Buffer	36
4.1.2 Isoelectroenfoco de Anticuerpos: Obtención del Punto Isoeléctrico	37
4.1.3 Ensayo de floculación; Concentración estabilizante de Anticuerpo	38
4.1.4 Caracterización del bioconjugado y monitorización mediante Espectroscopía UV/Vis	41
4.1.5 Caracterización del bioconjugado y monitorización mediante DLS: Radio hidrodinámico y ζ -Potential	43
4.2 Diseño del Inmunoensayo de Flujo Lateral	45
4.3 Funcionalidad y sensibilidad alcanzada mediante el empleo de AuNP como marca	47
4.4 Síntesis y caracterización de Nanovesículas de nueva formulación: Transfersomas con colorantes artificiales	50
4.4.1 Caracterización morfológica de las nanovesículas	52
4.4.2 Funcionalización de las nanovesículas y evaluación de su funcionalidad en las tiras de flujo lateral	57
5. Conclusiones	59
Bibliografía	60



Introducción

1. Introducción

Las necesidades crecientes en el diagnóstico de enfermedades requieren soluciones tecnológicas innovadoras. En Europa, los altos costes del sistema de salud y el envejecimiento de la población son motivos para buscar una nueva gestión, basada en un nuevo sistema más personalizado y menos centralizado. La elevada prevalencia actual de enfermedades crónicas, fruto del aumento de la esperanza de vida por la mejora de las condiciones socio-sanitarias, puede llegar a colapsar los Sistemas de Salud Públicos. No sólo el gasto público se ve incrementado, si no que con frecuencia conlleva largos tiempos de respuesta de los resultados de un análisis para un diagnóstico o seguimiento de una enfermedad. Existen incluso numerosos estudios clínicos que han puesto de manifiesto las consecuencias negativas del stress asociado a la espera. Además, en muchos problemas clínicos se requiere un análisis rápido de los biomarcadores de interés para un correcto diagnóstico y toma de decisiones.

La Química Analítica proporciona soluciones a este reto social a través del desarrollo de dispositivos portátiles con altas prestaciones para llevar el análisis donde sea necesario. Estas plataformas de análisis en la bibliografía anglosajona se denominan *Point-of-Care* (POC).

Los dispositivos POC pueden ser empleados fuera de contextos de centralización, incluyendo oficinas médicas regionales (ambulatorios), consultas privadas, servicios de urgencias, ámbito doméstico, lugares itinerantes y temporales (campamentos de refugiados, catástrofes naturales, etc.) y lugares con recursos materiales limitados (O'Farrell 2013). Por otro lado, la necesidad creciente de un diagnóstico precoz promueve un mayor consumo activo de productos sanitarios por parte de la sociedad.

Una de las plataformas POC más utilizadas son los inmunoensayos de flujo lateral, conocidos por su acrónimo en inglés LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay). Este término engloba cualquier dispositivo inmuno-cromatográfico que, manual o mediante un lector especial, detecta uno o varios analitos sobre una tira de papel, nitrocelulosa o plástico que sirve de base a la migración de un flujo de muestra (O'Farrell 2009). En la sección 2.4 describen los componentes principales del test.

En este Trabajo Fin de Máster (TFM) se ha iniciado el desarrollo de un test basado en LFIA para detección de troponina cTnI (biomarcador de infarto) como sistema modelo. Inicialmente se ha realizado una revisión de la importancia social y económica de los dispositivos POC. A continuación se comenta la problemática clínica para diagnóstico de un infarto, y se hace una revisión de las soluciones actuales disponibles comercialmente y en la bibliografía. Finalmente se hace la propuesta de mejora mediante I+D en la que se ha centrado la parte experimental del TFM.

1.1 Mercado de los dispositivos *Point-of-Care*. Test rápidos basado en flujo lateral (LFIA)

En el año 2011 el mercado global de dispositivos de diagnóstico POC fue de 13,8 billones de dólares, y se espera que estas cifras lleguen a 16,5 billones de dólares en el 2016 (datos disponibles en <http://www.bccresearch.com>). Este sector es el que crece más rápidamente dentro de la sección de test de laboratorio in-vitro, con expectativas de dominar el mercado. En Europa este campo está estimado en 2,6 billones de dólares (datos del año 2013, disponibles en <http://www.marketresearch.com/Industry-Experts-v3766-Biosensors-Global-Overview-6846583>).

Los principales productos en este mercado son los sensores de glucosa, test de embarazo y de situaciones clínicas de emergencia. Las últimas tendencias en I+D apuntan hacia el desarrollo de dispositivos miniaturizados, más sensibles, de bajo coste, basados en nanotecnología y dirigidos a aplicaciones no invasivas.

Los tests LFIA se han convertido en uno de las modalidades de POC más populares. Además de las ventajas recogidas en la **figura 1**, relacionadas con el manejo y posibilidades de aplicación, existen una serie de ventajas relacionadas con el mercado de ventas que contribuyen a dicha popularidad.



Fig. 1. Ventajas generales relacionadas con el manejo y producción de dispositivos analíticos microfluídicos basados en Inmunoensayos de flujo lateral, LFIA. *Adaptada de O'Farrel, 2009.*

Entre ellas destaca la amplia posibilidad de ofertar dispositivos para cualquier situación donde un test rápido es requerido (5-20 minutos típicamente), pudiendo analizarse además cualquier tipo de muestra biológica (sólida o líquida), incluyendo todos los tipos de fluidos corporales: orina, lágrimas, saliva, suero o sangre total entre otros.

Otro aspecto importante está relacionado con la inversión inicial en diseño y desarrollo. Así como otros dispositivos POC requieren de al menos varios millones de euros/dólares (5-10), los test LFIA pueden requerir una inversión tan baja como 22.000€ y no más alta de 50.000€. Además, si se dispone del elemento de reconocimiento (aptámero, ácido nucleico o anticuerpo), no se requieren más de 5 meses para su diseño y optimización.

Finalmente, una vez que el prototipo está diseñado y validado con muestras reales mediante ensayos homologados, la producción a nivel industrial puede llegar a producir test con muy bajo coste (1-3€/análisis). Este precio fluctúa dependiendo de la disponibilidad de anticuerpos y del tipo de marca empleada en el ensayo (ver sección 1.6).

Los test rápidos basados en LFIA movieron un mercado mundial estimado en 3.650 millones de dólares americanos en 2012, y que se espera llegue a 4.675 millones en 2015 (con una tasa media anual de crecimiento del 7%, ver tabla 1).

Esta demanda comercial no es homogénea. Mientras que los Estados Unidos focalizan el 50% de las ventas mundiales, Europa demanda un 40%, quedando el 10% restante al resto de continentes (ver figura 2). A su vez, esta demanda restante es heterogénea, representando un 50% de la misma Asia (especialmente Japón) y el 50% restante para África, Sudamérica y Oceanía.

Tabla 1. Ventas y pronóstico de crecimientos de dispositivos basado en *Lateral Flow* (Millones de \$ americanos). Fuente: *Stratcom*, Montreal, Canadá, en *The Immunoassay Handbook (Segunda edición, 2013)*.

	2010	%Mercado	2015	%Mercado	CAGR%	Nº. de compañías
Clínica	2990	89	4100	89	7	Al menos 100
Veterinaria	280	8	420	9	8	Al menos 50
Alimentos y bebidas	50	1	95	1	14	Aprox. 20
Farmacia/biología	20	0.6	35	1	12	Aprox 20
Ambiental	10	0.2	12	0.2	4	Al menos 50
Control del agua	10	0.2	13	0.2	5	Aprox. 20
TOTAL	3360	100	4675	100	7	

Este comercio es abastecido por más de 250 compañías en todo el mundo, donde los productores de LFIA especializados en diagnóstico clínico representan el 40% del total. La tendencia a la descentralización de los laboratorios, es responsable de la demanda, junto con la actual situación socio-económica y las necesidades emergentes de los países en vías de desarrollo, sin olvidar los conflictos socio-políticos que generan un creciente número de refugiados que demandan una situación de control sanitario rápida y efectiva en ambientes con recursos materiales escasos

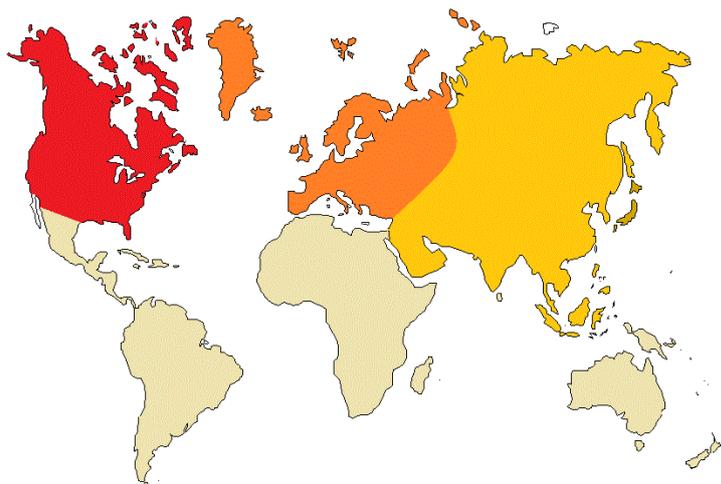


Fig. 2. Distribución de los demanda de dispositivos analíticos *Point-of-care* (POC) basados en inmunoensayos de flujo lateral (LFIA). La gradación de color es función de la demanda, siendo los colores más fuertes un mayor consumo de POCs.

En nuestro país algunos dispositivos basados en LFIA están plenamente implantados en el Sistema de Salud. Los Ambulatorios y servicios de urgencias emplean tiras de flujo lateral para el diagnóstico de *Amigdalitis Estreptocócica*, y los Hospitales emplean paneles (conjuntos) de tiras para la detección de drogas de abuso en orina, junto con por supuesto, los test de embarazo mediante detección de β HcG.

A pesar de la gran demanda de este tipo de POC, y de la aceptación de alguno de ellos por parte de la comunidad sanitaria, uno de los grandes problemas que ralentizan la implantación de dispositivos basados el flujo lateral en Europa es el gran control y regulación de los laboratorios centrales, cuya centralización es empleada como herramienta de control del gasto creciente en los sistemas públicos de salud fruto de una población con elevada esperanza de vida.

Este hecho es uno de los retos a los que se enfrentan los productores de este tipo de dispositivos, que buscan a su vez reducir costes junto con la mejora de la sensibilidad y la posibilidad de multi-detección.

Esta falta de penetración en el mercado, debido a las limitaciones de los dispositivos LFIA y la falta de confianza por parte de la comunidad sanitaria, ha movido a los diseñadores y productores hacia nuevos formatos que mejoren las características operacionales (mayor simplicidad) y analíticas (multi-detección y menores límites de detección, cualitativa y cuantitativa), buscando un mayor atractivo de estos productos. Esta mejora se basa en aplicar conceptos avanzados de *Lab-on-a-chip* (LOC) a plataformas analíticas como papel y membranas (Chin, Linder et al. 2012), en las que se integren todas las etapas analíticas en un solo dispositivo.

Un ejemplo de estos dispositivos híbridos es el test clínico *AlcNOW* (Bayer Healthcare) para pacientes diabéticos, que combina varias tiras de Lateral Flow con detección óptica en un único dispositivo.

Lo que es evidente en base a la experiencia de las empresas productoras de dispositivos POC es que deben ofrecer un valor añadido sobre los test de laboratorio, bien sea por mejoras analíticas, mayor amplitud de aplicación o una reducción en el coste del análisis del marcador a analizar (Chin, Linder et al. 2012).

Parámetros como tamaño de mercado, tasa anual de crecimiento, satisfacción de la demanda desde el punto de vista del problema analítico y posibilidad de posición dominante en el mercado (ser el primero en dar respuesta comercial), deben de ser consideraciones a tener en cuenta a la hora de configurar estrategias de mercado para el desarrollo de nuevos productos.

1.2 ¿Cuándo es útil un dispositivo Point of Care?

El empleo de dispositivos POC puede mejorar 3 aspectos fundamentales del diagnóstico: el tiempo, la responsabilidad del paciente y los costes (Gubala, Harris et al. 2011). El tiempo total de respuesta se acorta, al evitar el viaje de la muestra al laboratorio y el retorno de los resultados, permitiendo un diagnóstico más precoz, siendo de vital importancia en algunas patologías en las que los minutos pueden llegar a suponer incluso la vida o la muerte.

Por otra parte, pueden disminuir la frecuencia de la visita a los hospitales, con los gastos económicos y profesionales (días de trabajo) que conllevan. En esta línea de auto-monitorización, los dispositivos POC permiten un aumento de la frecuencia de auto-testeo y una mayor adherencia al cumplimiento de los tratamientos (Gubala, Harris et al. 2011), con el aumento no sólo de la calidad de vida del paciente, si no de un mejor pronóstico de la enfermedad.

Por último, los instrumentos son más pequeños y sencillos que los test de laboratorio, evitándose etapas de lavado por ejemplo, que simplifican el dispositivo y por ello los costes materiales, de producción y de mantenimiento. Otro aspecto económico que mejoran es la disminución en la pérdida de resultados o de errores en el etiquetado. Aunque uno de los mayores avances que pueden suponer, es la posibilidad de evitar ingresos innecesarios, evitando grandes costes económicos, personales (en cuanto a personal asistencial y del propio paciente) y la saturación de los servicios de salud.

1.3 Infarto Agudo de Miocardio; un candidato a ser evaluado mediante POC/LOC

Las complicaciones derivadas de la ruptura de la placa de aterosclerosis son englobadas en lo que se denomina como Síndrome Agudo Coronario, que varía desde la Angina inestable (daño reversible del miocardio) a un Infarto Agudo de Miocardio (necrosis, muerte celular, de amplias áreas de miocardio) (Azzazy and Christenson 2002; McDonnell, Hearty et al. 2009).

El Infarto Agudo de Miocardio, citado en la bibliografía por su acrónimo en inglés: *Acute Myocardial Infarction* (AMI), requiere un diagnóstico rápido y precoz que permita un comienzo inmediato del tratamiento con el objeto de minimizar el posible daño causado.

La troponina cardíaca I (cTnI), forma parte del complejo de troponinas (junto con la C y la T) que se localiza en los filamentos de miofibras del corazón, cuya función es la regulación de la contracción del músculo cardíaco. Estas isoformas cardíacas poseen un péptido N-terminal específico de las mismas, que permite una detección muy selectiva.

La necrosis producida por falta de oxígeno producto de la isquemia como consecuencia de la obstrucción por la placa en los vasos coronarios conlleva la liberación del contenido celular a la sangre, apareciendo en éstos niveles elevados (en este caso) de cTnI. Por lo tanto, el incremento en los niveles sanguíneos de este biomarcador serán relativos a la extensión del área dañada (Azzazy and Christenson 2002; Melanson, Tanasijevic et al. 2007; McDonnell, Hearty et al. 2009).

La aparición de cTnI elevada 4-6 horas después de la aparición del dolor de pecho, produciendo un pico a las 12-16 horas y una subsiguiente caída en los niveles (6-8 días de duración), son consistentes con el diagnóstico de un Síndrome Agudo Coronario (Melanson, Tanasijevic et al. 2007). Esta elevación ha de ser superior a un límite marcado (*Cut-off level* en la literatura médica anglosajona) que se establezca en el percentil 99 de la población sana de referencia medido con una imprecisión total inferior al 10% (Melanson, Tanasijevic et al. 2007), aceptado como valor general 20,4pg/mL (Xu, Xu et al. 2009).

La posibilidad de detectar cada vez concentraciones más pequeñas de este biomarcador (mayor sensibilidad) puede suponer una mejora en la detección precoz del infarto, ya que éste se detectará en sus primeras fases y podrá ser diferenciado de otras patologías que cursen con elevaciones de dicho marcador (que lo harán a diferente nivel, y con una duración distinta).

Los biomarcadores del estado cardíaco deben ser testeados como mucho 30 minutos tras la llegada del paciente al servicio de urgencias, que permita el inicio del tratamiento con una máxima demora de 60-90 tras dicha llegada (Ryu, Jin et al. 2011).

Por lo tanto, nos encontramos frente a un problema analítico que demanda una respuesta precoz, rápida, sensible y específica. Es el escenario ideal donde un dispositivo POC/LOC puede ser beneficioso. Este tipo de instrumentación de diagnóstico puede ofrecer un resultado de calidad en poco tiempo, allí donde el paciente ha sufrido el posible infarto, y con una tecnología que puede permitir analizar varios marcadores simultáneos que ofrezcan la suficiente información para el correcto manejo del paciente.

Actualmente en contextos clínicos se están empleando dos tipos de dispositivos POC: la versión de sobremesa, que es prácticamente un equipo miniaturizado idéntico a los del laboratorio central, y una versión portátil de mano de las mismas. Estos POC para el caso de marcadores cardiacos como la cTnI están predominantemente basados en inmunoensayos (ver sección 1.4) de flujo lateral o de flujo a través (Flow Through, en literatura anglosajona) (McDonnell, Hearty et al. 2009; Posthuma-Trumpie, Korf et al. 2009).

Numerosos estudios empleando los dispositivos POC comerciales y experimentales han demostrado producir resultados similares a los test de laboratorio, de una forma rápida sin comprometer la calidad analítica. Además, su empleo pudo reducir el número de hospitalizaciones con falsos infartos, reduciendo los importantes costes que pueden suponer este tipo de ingresos.

Por otro lado, la multidetección puede ofrecer mucha más información que el análisis individual de un marcador como cTnI, permitiendo eliminar la presunción de otro tipo de patologías que cursan con elevación de dicho biomarcador, y ofrecer posibilidades de diagnóstico mucho más fiable en menos tiempo. Por ejemplo, el estudio *"The Chest Pain Evaluation by Creatine Kinase-MB, Myoglobin, and Troponin I, CHECKMATE"* desarrollado con un dispositivo POC para medir los 3 marcadores cardiacos indicados en el título del proyecto, identificó con mayor prontitud que el test de laboratorio un mayor número de pacientes con Infarto de Miocardio, disminuyendo la mortalidad por el mismo (McDonnell, Hearty et al. 2009). Este panel de biomarcadores queda establecido como la mejor herramienta para el diagnóstico de IAM en servicios de urgencia.

Por último, regiones como Asturias, con una población envejecida elevada, y con gran cantidad de la población en entornos rurales alejados de los hospitales, es un ambiente proclive a implantar dispositivos POC/LOC para la detección de IAM. Por ejemplo, la disponibilidad en las Ambulancias de este tipo de equipos podría ahorrar el tiempo que se gasta en el desplazamiento del paciente a Centros de salud (en este caso los hospitales como Cabueñes o el HUCA) donde puedan realizarse este tipo de determinaciones, y la consiguiente mejora en el manejo del paciente como se ha ido comentando a lo largo de esta sección.

1.4 Soluciones comerciales de tipo POC/LOC para el diagnóstico de IAM

Un primer punto que debe evaluar un productor de test basado en LFIA y microfluídica, en general, son las soluciones comerciales actualmente en el mercado (y en fase de desarrollo) para el problema analítico al que se pretende dar respuesta, y que grado de solución aportan para identificar posibles puntos de mejora que permitan el lanzamiento de productos innovadores, o simplemente mejorados.

Al realizar una búsqueda de los test clínicos basados en LFIA para la detección de cTnI se observa la existencia de múltiples compañías que comercializan este tipo de productos (**tabla 2**). La homogeneidad en cuanto a tipos de muestras es bastante elevada. La mayoría analizan todos los componentes de la sangre (suero, plasma, etc.) en un intervalo de tiempo entre 5-15 minutos, lo cual es aceptable para el diagnóstico al que se pretende dar respuesta.

Tabla 2. LFIA comercializados para la detección de troponina I (cTnI) en diferentes tipos de muestras sanguíneas. *Fuente: información procedente de la consulta directa en las páginas web de casas comerciales.*

Marca/ Casa comercial	Muestra	Límite de detección	Tiempo de respuesta	Sensibilidad (%)	Sensitividad (%)
Instant-View® CliaWaived Products	ST / S	1,5ng/mL	5-15min	99,3	96
PainCheck ARC Bioproducts	S / P	0,3ng/mL	5-15min	NE	NE
BioNexia® Biomérieux	ST / S / P	1ng/mL	10min	96,27	99,43
(Sin nombre) Toda Pharma	ST / S / P / PC	0,5ng/mL	10min	100	82
One Step (Sin nombre)	ST / S / P	1ng/mL	15min	98,3	100
One Step Atlas Medial	ST / S / P	0,5ng/mL	10min	98,5	98,4
Heart Scan™ Bhat Bio-Tech India LTD.	S / P	0,5ng/mL	10min	98,5	98,4
One Step Genomix Biotech	ST / S / P	0,5ng/mL	10min	98,5	98,4
Troponin Cassette BioTina GmbH	ST / S / P	0,5ng/mL	15min	98,5	98,4

ST: Sangre Total; S: Suero; P: Plasma; PC: Punción Capilar

Sin embargo, existe bastante variación en los límites de detección, que fluctúan entre 0,3 ng/mL y 1,5 ng/mL. A pesar de ser unos valores muy bajos para llevar a cabo la detección a simple vista mediante la formación/ausencia de una línea de color, son concentraciones de biomarcador bastante

por encima de los *Cut-off* establecidos (20,4pg/mL, ver sección 1.4). Estos límites de detección mostrados en la tabla 1 son fácilmente alcanzados mediante el empleo de nanopartículas de oro coloidal conjugadas a los anticuerpos de detección (de la Escosura-Muñiz, Parolo et al. 2010; Ryu, Jin et al. 2011; Goryacheva, Lenain et al. 2013).

Con estos resultados se puede intuir que uno de los posibles puntos de innovación y mejora es la exploración de estrategias de amplificación que bajen dichos límites, y así satisfacer la demanda de ser capaz de detectar mínimas elevaciones de cTnI. Por otro lado, otro punto atractivo para el lanzamiento al mercado de un dispositivo de LFIA podría ser la reducción del coste final, de tal forma que resulte ventajoso frente al resto de productos existente. Este aspecto es considerado en la sección 1.6.

En el caso de que se considere como una limitación en los dispositivos LFIA la falta de cuantificación, se pueden encontrar en el mercado otras plataformas POC que ofrecen soluciones de cuantificación y que están basadas también en tecnología de microfluídica.

Así por ejemplo otras soluciones comerciales basadas en dicha tecnología para el diagnóstico de AMI emplean la detección electroquímica sobre electrodos *Thin-film* en chips de silicio, como el dispositivo *iSTAT* (Abbott), en cuyo abanico de marcadores analizados está la Troponina I (**figura 3**). Otro dispositivo POC es la plataforma *Triage* (Alere), basada en inmunoensayos con detección por fluorescencia. Por último, existen otros EQUIPOS que se encuentran aún en fase de desarrollo y aprobación por las autoridades sanitarias, como el dispositivo *Nanomix Omega 3* (Nanomix), que emplea nanotubos de carbono para la amplificación de la señal electroquímica.



Fig. 3. Ejemplo de alguno de los POCs para cTnI disponibles a nivel comercial. **A)** Lector y cartucho desechable de *iSTAT* (Abbott), basado en detección electroquímica. **B)** Lector y cartucho desechable de *Triage* (Alere), con detección por Inmunoensayo con marcas fluorescentes.

1.5 Nuevas estrategias de amplificación de señal para LFIA y diagnóstico de AMI

Hay un segundo punto que se debe considerar cuando se pretende lanzar al mercado un producto innovador: qué estrategias de mejora están siendo exploradas en la investigación, y cuánto está protegido por publicaciones científicas y patentes.

Cuando se planea una estrategia de amplificación de señal innovadora, algunas consideraciones importantes deben tomarse en cuenta. Por ejemplo, una de las ventajas que ofrecen los test POC/LFIA es la modalidad *One Step*, en la que el dispositivo realiza todo el proceso tras su introducción en la muestra. Esta ventaja debe mantenerse a la hora de diseñar estrategias.

En lo referente a nuevos sistemas de amplificación actualmente publicados para la detección de cTnI en tiras de flujo lateral, se encuentran los siguientes trabajos.

Choi *et al.* (Choi, Lee et al. 2010) desarrollaron una estrategia basada en dos conjugados, Anti cTnI/10 nm AuNPs recubiertas de BSA y anti-BSA/40 nm AuNP's (**figura 4**), cada uno inmovilizado en zonas independientes de la tira de papel. Con este sistema de amplificación de la señal fueron capaces de detectar concentraciones tan bajas como 0,01 ng/mL en 10 minutos, un resultado similar al obtenido con estrategias que emplean amplificación con plata en dos pasos.

Una estrategia similar fue llevada a cabo por Jimin Zhu *et al.* (Zhu, Zou et al. 2011). Esta vez, una primera AuNP (13 nm) con un anticuerpo de detección y una hebra simple de ADN biotinilada es amplificada por un segundo conjugado compuesto por una AuNP (41 nm) y estreptavidina (**figura 4**). Al igual que el diseño anterior, los dos conjugados son inmovilizados en diferentes almohadillas. Con este formato los autores son capaces de detectar 1 ng/L de cTnI en suero humano.

Alternativamente a nanopartículas de oro como marcas en técnicas inmunológicas, algunos autores han explorado la posibilidad de amplificaciones con nanomateriales magnéticos (*ver sección 1.6*).

Yiseul Ryu *et al.* (Ryu, Jin et al. 2011) crearon un LFIA con un conjugado basado en una partícula magnética recubierta de proteína G (para orientar los anticuerpos gracias a su especial afinidad por la región Fc de la molécula de Ig) y un anticuerpo monoclonal contra cTnI. Este conjugado permitió alcanzar la detección de 0,01ng/mL medido a simple vista y cuantificado con un sensor de Giant Magnetoresistive (GMR).

Por último, Xu *et al.* (Xu, Xu et al. 2009) desarrollaron un LFIA mediante el empleo de nanopartículas superparamagnéticas (111nm) conjugadas a un anticuerpo monoclonal frente a cTnI.

Empleando un lector de magnetismo, estos autores fueron capaces de detectar 0,01ng/mL en suero humano dopado con un complejo comercial de troponinas cardiacas.

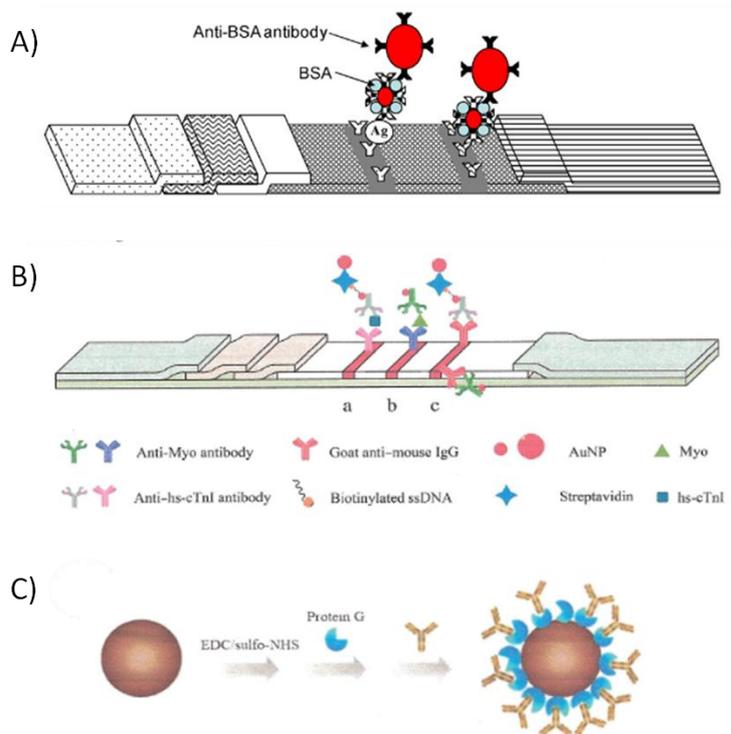


Fig. 4. Diversas estrategias de amplificación de señal actualmente publicadas para la detección de cTnI. A) Choi et al. 2010, B) Zhu et al. 2011, y C) Ryu et al. 2011.

Estas estrategias consiguen mejorar la sensibilidad, pero con un aumento considerable del coste material y de producción del dispositivo. Este hecho hace necesario continuar explorando nuevas marcas que permitan límites de detección como los alcanzados, pero a un coste inferior incluso al de emplear AuNPs como único conjugado (como los mostrados en la **tabla 2**).

1.6 Nuevas oportunidades de mejora. Reducción de costes y sistemas de amplificación de la señal.

A pesar de los grandes avances llevados a cabo en los últimos años, los test rápidos basados en LFIA siguen estando limitados en ciertos aspectos: baja sensibilidad, imposibilidad de cuantificación del analito, y no más de 3-4 detecciones simultáneas (Posthuma-Trumpie, Korf et al. 2009). (Chin, Linder et al. 2012).

Pocos son los avances que se han producido en lo que es la plataforma analítica en sí (los materiales que componen la tira), a excepción de algunos aspectos relacionados con la membrana, como por ejemplo la orientación del reactivo de captura mediante la modificación química de la

misma (Mansfield 2009), o la integración de todos los componentes en un único material (Jones 2009). Sin embargo, la investigación sobre la mejora de los dispositivos LFIA se centra en el diseño, producción y evaluación de nuevas marcas y estrategias de amplificación de señal; así como de nuevos métodos de lectura de resultados buscando la cuantificación del analito detectado (O'Farrell 2013).

Para crear la señal visual muchos tipos de materiales son empleados, siempre en la nano-escala (de la Escosura-Muñiz, Parolo et al. 2010; Goryacheva, Lenain et al. 2013) para favorecer el flujo a través de la membrana. Los más frecuentes son las partículas de látex coloreado y las nanopartículas de oro, debido a la relativa sencillez de la química de la conjugación con elementos de reconocimiento, y su posibilidad de producción a nivel industrial.

La **tabla 3** recoge las principales ventajas y desventajas de nanopartículas coloreadas y luminiscentes que han sido aplicadas a día de hoy en test rápidos basados en flujo lateral. Este tipo de nanopartículas permiten una detección óptica, la más popular en dispositivos POC/LFIA (Seydack 2005; Ijeh 2011).

Tabla 3. Principales ventajas y desventaja de nanopartículas coloreadas y/o luminiscentes aplicadas a inmunoensayos de flujo lateral. *Adaptado de Goryacheva et al. (Trends in Analytical Chemistry, vol.46, 2013)*

Tipo de marca	Ventajas	Desventajas
Nanopartículas coloreadas		
Oro coloidal	-Posibilidad de modificación para obtener marcas más brillantes con el mismo o diferente color -Varios lectores disponibles	-Sensibilidad limitada al brillo
Carbón coloidal	-Procesado óptico mejorado al ya estar en escalas de grises -Producción barata, rápida y masiva	-No química de superficie -Adsorciones físicas de inmunoreactivos -Formas no regulares
Colorantes coloidales	-Brillo superior a los moleculares	
Nanopartículas luminiscentes		
Colorante coloidales fluorescentes	-Fluorescencia superior a los moleculares	-Interferencias en señales de excitación / emisión
Emisores de infra-rojos	-Eliminación espectral de interferencias de matriz	-Lectores comerciales no disponibles -Tamaños grandes, limitantes del poro de la membrana
Emisores <i>Up-converting</i>	-Larga vida -Desplazamientos anti-Stokes que eliminan el fondo -Foto-estabilidad -Síntesis sencilla	-Distribución de tamaño no homogéneos -Adsorciones inespecíficas -Baja eficiencia cuántica -Estabilidad reducida cuando no son modificados
Nanopartículas con larga vida de emisión <i>Quantum dots</i>	-Separación temporal de la emisión del fondo (sensibilidad) -Tamaño pequeño -Fluorescencia intensa -Bandas de emisión estrechas y amplias de excitación (selectividad)	-Baja eficiencia cuántica -Lectores complicados y de elevado coste -Elevada toxicidad

En los últimos años otro tipo de materiales han ido haciéndose hueco en estos dispositivos. Por ejemplo, materiales magnéticos y paramagnéticos han sido empleados como marcas (Goryacheva, Lenain et al. 2013) debido a las posibilidades de cuantificación que ofrecen, y a su fuerte contraste óptico al ser óxidos de hierro colores muy oscuros). Estas nuevas marcas han ido apareciendo y evolucionando a la vez que han aparecido nuevos equipos de detección (Gubala, Harris et al. 2011).

Otro ejemplo son los liposomas (nanovesículas en general), vesículas lipídicas que pueden encapsular compuestos de diferente naturaleza (colorantes, marcas electroquímicas, fluoróforos, etc.) con los que se consigue un aumento de la sensibilidad de hasta 3 órdenes de magnitud (Goryacheva, Lenain et al. 2013; Liu and Boyd 2013), y que presentan la ventaja de con poca cantidad de materia prima, ser capaz de sintetizar grandes volúmenes de muestra, con lo que se abaratan los costes materiales finales.

La elección de un tipo u otro de material se realiza en base a una variedad de factores que impone el caso concreto de detección que se desea realizar. Robustez del conjugado frente a condiciones extremas (por ejemplo pH) de la muestra, cuantificación o simplemente *screening*, niveles de sensibilidad que se desean alcanzar, multidetección, coste material o de producción que se puede llegar a alcanzar, son algunos de los puntos que hay que considerar a la hora de elegir la marca para el dispositivo de LFIA (O'Farrell 2009).

Ejemplos comerciales (**Figura 3**) que emplean diversas marcas, pero que poseen en común una finalidad de detección de cTnI son: *Triage*, empleo de medidas de fluorescencia; *MagnotechTM*, mediciones de magnetismo; y *Claros*, amplificación de la señal mediante reacciones químicas de plata y medición de la densidad óptica (Chin, Linder et al. 2012).

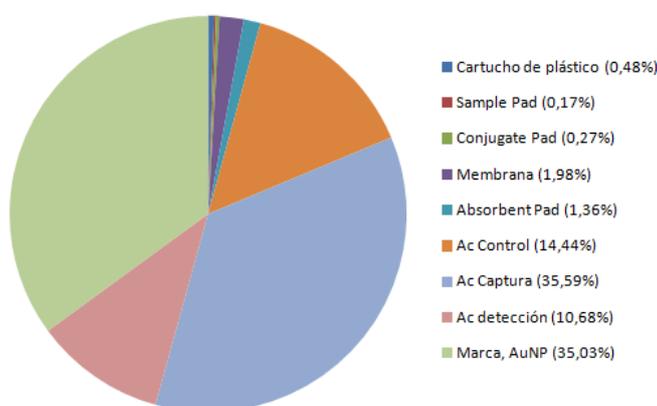


Fig. 5. Contribución al coste material del dispositivos de los diferentes componentes y reactivos de una tira reactiva basada en LFIA. Se indica el porcentaje individual sobre el total del coste, que es de 1,15€/análisis cuando se emplea como marca AuNPs.

Sin embargo, este tipo de marcas pueden llegar a representar un 35% del coste material del dispositivo (**figura 5**). Si la estrategia de mercado elegida por el productor es el lanzamiento de un producto con características analíticas similares a los comercializados pero con un precio inferior que llame la atención de los compradores, el empleo de nuevas marcas ha de ser el objetivo de su departamento de I+D.

Objetivos del presente Trabajo de Fin de Máster

Con la realización del Trabajo de Fin de Máster recogido en esta memoria, se ha pretendido poner en práctica, integrar y ampliar los conocimientos teóricos adquiridos a lo largo de los diferentes módulos (asignaturas obligatorias, optativas y prácticas en empresa) por parte del alumno firmante del trabajo. Para ello se escogieron los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivos generales:

1. Consolidar los procedimientos generales en el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral (desde el montaje de la tira, hasta la síntesis del conjugado empleado como reactivo de detección) iniciados por el grupo en trabajos anteriores.
2. Poner a punto un protocolo de trabajo para optimización de los procesos involucrados en el diseño y desarrollo de este tipo de test basado en el seguimiento de las etapas químicas involucradas mediante técnicas instrumentales.

Objetivos específicos:

1. Diseñar y desarrollar un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de Troponina-I cardiaca como biomarcador de Infarto Agudo de Miocardio.
2. Emplear nanopartículas de oro como marcas inmunológicas: optimizar su conjugación y caracterizar sus bioconjugados mediante *Espectroscopía UV/Vis* y *Dynamic Light Scattering*.
3. Iniciar en el grupo la investigación sobre síntesis, caracterización y empleo de nanovesículas de nueva formulación con colorantes artificiales como posibles marcas inmunológicas para test rápidos basados en LFIA, y explorar las ventajas que puede suponer su empleo para reducir los costes materiales de dichos dispositivos.
4. Comparar las características analíticas que ofrecen ambos tipos de marcas, e indicar los posibles puntos de optimización y mejora para trabajos futuros.



Trabajo Experimental

2. Fundamentos teóricos

2.1 Comprendiendo los reactivos I: Nanopartículas de oro y su conjugación a anticuerpos.

El oro coloidal es una suspensión de pequeñas nanopartículas (NPs), frecuentemente entre 2 y 150 nm, que es estable y uniforme (solo un pequeño rango de tamaño forma el coloide) (Seydack 2005; de la Escosura-Muñiz, Parolo et al. 2010; Goryacheva, Lenain et al. 2013).

El estado monodisperso se consigue gracias a un balance entre las fuerzas que actúan sobre estas NPs. Debido a su naturaleza hidrofóbica, las NPs metálicas tienden a agregarse en complejos mayores mediante fuerzas de *Van der Waals*. Esta es la razón por la que se estabilizan con moléculas de citrato sobre su superficie, que aportan cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las partículas. Estos principios de fuerzas de repulsión/atracción balanceadas se recogen en la teoría DLVO (Acrónimo de los nombres de los autores que la postularon) (Hermanson 2008).

Por otro lado, los anticuerpos son biomoléculas que constan de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, formadas cada una por un péptido cuya estructura terciaria es típica de la familia de las globulinas (dominios globulares estabilizados por puentes disulfuro intra-catenarios). Ambas cadenas pesadas se encuentran unidas por puentes disulfuro, a la vez que este mismo enlace une cada cadena ligera a una cadena pesada (Regueiro González, López Larrea et al. 2005). Como toda proteína y péptido, la carga de los Ac viene determinada por la naturaleza de los residuos lateral de los aminoácidos, cobrando mayor importancia para su conjugación aquellos de tipo polar ionizable, que dependiendo del pH adquirirán carga + o -.

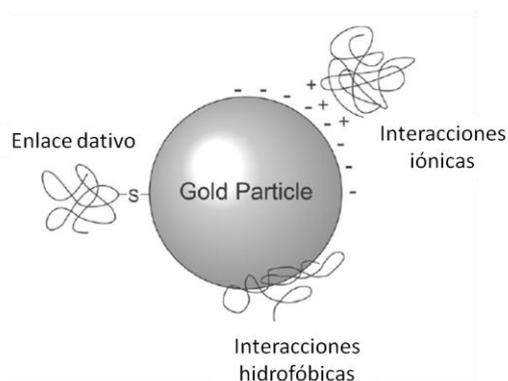


Fig.6. Interacciones que se establecen entre las NPs metálicas y biomoléculas (proteínas). *Imagen modificada de Bioconjugate Techniques, Hermanson 2008.*

La química que envuelve la estructura de las NPs y de los Ac puede ser empleada para su conjugación (unión). En la **figura 6** se resumen las interacciones que pueden darse entre ambos

elementos: (1) interacciones electroestáticas entre las cargas negativas de las NPs y las cargas positivas de residuos polares de los aminoácidos. (2) adsorción directa sobre la superficie gracias a regiones hidrofóbicas de cavidades superficiales de las proteínas. (3) establecimiento de enlace cuasi-covalente (dativo) entre los grupos tiol de los Ac y los átomos del metal (Au y Ag).

Cualquier modificación que afecte a las interacciones entre las NPs y las biomoléculas puede llevar a la no conjugación, pudiendo degradarse los reactivos de forma irreversible. Es importante que las NPs mantengan a lo largo del proceso su carácter individual, para generar conjugados reproducibles y del tamaño y propiedades deseadas (por ejemplo densidad de biomolécula por NPs). Para ello, se debe evitar al máximo la agregación por la pérdida de la fuerza electrostática que las mantiene individuales, y que se puede producir por la introducción de cargas positivas que atenúen la carga negativa de las mismas. Esto suele ocurrir, inevitablemente, al introducir cationes de las disoluciones buffer en los que se encuentran las biomoléculas y que se emplean para mantenerlas estables (amortiguación de cambios en el pH por ejemplo que no conlleven la desnaturalización y por ende, la pérdida de funcionalidad).

Por otro lado, hemos comprobado que las cargas positivas de las biomoléculas son un punto clave en las interacciones con las NPs. El conocimiento del Punto Isoeléctrico de las proteínas (pH al que la carga neta es cero) nos sirve para conocer el pH que al debemos poner la disolución reguladora, y poder controlar la carga que queremos posea la biomolécula.

De esta forma, para conseguir la conjugación jugando con las interacciones que se establecen, surge la demanda de información acerca de las condiciones a las que se debe llevar dicho proceso (Hermanson 2008). Por un lado es necesario obtener información sobre la molaridad máxima (fuerza iónica) que toleran las NPs antes de agregarse irreversiblemente, y por otro el P.I. del Ac para saber el tipo de buffer a emplear y el pH al que debe estar. Con todo ello se pretende minimizar la agregación entre NPs y maximizar la cantidad de proteína unida por NPs. Otro aspecto relacionado con la conjugación es la cantidad de proteína necesaria para estabilizar la NP, evitando cualquier agregación posterior, que reste funcionalidad y reproducibilidad al empleo del conjugado para bioensayos (Seydack 2005).

Esta información se obtiene de dos ensayos sencillos, uno en el que se incuban NPs con diferentes concentraciones de sales para ver la respuesta de agregación, y otro denominado Ensayo de Floculación en el que el efecto observado en el anterior se emplea para comprobar la resistencia a la agregación inducida por sales cuando la NPs posee la suficiente cantidad de proteína en su

superficie para mantenerse estable (individual, sin agregarse) a pesar de la presencia de sales (Hermanson 2008b; Hermanson 2008; Ljungblad 2009; Zhu, Zou et al. 2011).

2.2 Comprendiendo los reactivos II: Nanovesículas

Las nanovesículas (NVs) lipídicas, generalmente llamadas Liposomas, son un conjunto de vesículas esféricas formadas por bicapas de lípidos en las que las cadenas apolares se orientan conjuntamente unas con otras hacia el interior de la bicapa, y con las cabezas polares hacia el exterior de la bicapa (hacia el medio acuoso exterior y hacia la cavidad interior) (Rongen, Bult et al. 1997; Gómez-Hens and Manuel Fernández-Romero 2005; Edwards and Baeumner 2006; Goryacheva, Lenain et al. 2013). Su formación es espontánea cuando los fosfolípidos son dispersados en agua debido a las reacciones desfavorables con ella por parte de las cadenas hidrofóbicas, y la posibilidad de crear estructuras cerradas al ordenarse para dejar la parte polar hacia el solvente.

Existe una diversidad en cuanto a estructura (si bien existe homogeneidad en cuanto a la forma esférica), pudiendo estar formados por una única bicapa (unilamelares) o varias capas (multilamelares), y a su vez formando una única vesícula (univesiculares) o un saco de vesículas (multivesiculares) (Rongen, Bult et al. 1997). El tipo de liposoma dependerá del método empleado en su síntesis (*comentado más adelante*).

En su composición más simple los liposomas están compuestos por fosfolípidos, pudiendo emplearse para su formulación una inmensa variedad de tipos, con diferentes grupos funcionales en la cabeza polar que permitan diversas formas de conjugación. Este grupo puede elegirse en base al mecanismo que se desee aplicar, que generalmente estará condicionado por los grupos funcionales disponibles en la biomolécula. Es importante elegir aquellos grupos cuya modificación no afecte a la funcionalidad de la biomolécula (Edwards and Baeumner 2006).

Es frecuente que, junto a los fosfolípidos, se emplee colesterol en las formulaciones de los liposomas gracias a sus propiedades de reducir la permeabilidad y evitar la pérdida de parte del contenido encapsulado (fenómeno citado en la literatura científica como *Leaking*) (Gómez-Hens and Manuel Fernández-Romero 2005; Edwards and Baeumner 2006). Su pequeño tamaño y carácter eminentemente apolar, hace que se intercale entre las cadenas apolares de los aminoácidos, orientando su pequeña cabeza polar en el mismo sentido que las análogas de los fosfolípidos.

En cuanto a su preparación, muchos métodos han sido publicados, pero pocos han sido aplicados cuando el destino de los liposomas es su empleo como herramienta analítica. Esta finalidad impone

ciertos requisitos al método, como simplicidad, reproducibilidad, y generación de un tamaño homogéneo que permita una amplificación controlada de la señal analítica (Rongen, Bult et al. 1997).

Los métodos de síntesis se agrupan en cuatro categorías: (1) aquellos que incluyen procesos mecánicos, (2,3) aquellos que se basan en la eliminación del solvente orgánico o del detergente, respectivamente, empleado en su síntesis, y (4) otros métodos basados en transformaciones del tamaño, por fusiones por ejemplo. La **tabla 4** recoge sintéticamente los tipos morfológicos de liposomas que se producen en cada grupo de métodos.

Tabla 4. Morfología de los liposomas en función del método empleado para su síntesis. Información obtenida de Rongen *et al.* 1997. *MLV*: Multilamelares; *SUV*: unilamelares pequeños; *LUV*: unilamelares grandes; *MMV*: multivesiculares;

Tipo de método	Tipo de liposoma generado
Mecánicos	
Método de capa fina (<i>Bangham et al. 1965</i>)	MLV
Ultrasonificación de lípidos dispersos en agua (<i>Huang 1969</i>)	SUV
Eliminación de solventes orgánicos	
Reverse-Phase Method (<i>Szoka and Papahadjopoulos 1978</i>)	REVs
	LUVs
Solvent Injection (<i>Deamer and Bangham 1976</i>)	SUV
	MUV
Eliminación de detergentes	
Detergent-Dialysis method (<i>Jiskoot et al. 1986</i>)	SUV
Cambio de tamaños	
Congelado-Descongelado (<i>Chapman et al. 1991</i>)	MVV
	LUV
	SUV
Método de Deshidratación-Rehidratación (<i>Garçon et al. 1986</i>)	DRV
	LUV

La sustancia a encapsular es otro punto de elección a la hora de diseño de un liposoma, y está íntimamente relacionado con el tipo de detección que se empleará posteriormente (Rongen, Bult et al. 1997; Edwards and Baeumner 2006). A su vez, el tipo de detección se escoge en función de la sensibilidad requerida para alcanzar los límites de detección que impone el problema analítico en el que el liposoma se quiere emplear como herramienta de amplificación de la señal.

Entre la etapa de síntesis y su empleo como herramienta analítica (en este trabajo concretamente se evalúa su empleo como marca colorimétrica en un inmunoensayo de flujo lateral) ha de llevarse a cabo un proceso de caracterización (Edwards and Baeumner 2006). La caracterización nos da información sobre las cualidades morfológicas y funcionales del liposoma, pudiendo emplear esta

información para saber si cumple las necesidades que impone su finalidad, o para indicar posibles puntos de optimización en el proceso de síntesis.

Las características más importantes a determinar se engloban en tres categorías (Paternostre et al. 1988, en Gómez-Hens and Manuel Fernández-Romero 2005; Edwards and Baeumner 2006): (1) Morfológicas, tamaño medio de la población generada, distribución de tamaños o polidispersabilidad, y carga eléctrica (determinadas generalmente con técnicas como el DLS, explicada en la sección 2.3.2); (2) Organización de la estructura, como permeabilidad y fluidez (determinadas por técnicas de dispersión de bajo ángulo de Rx o SAXS, y Calorimetría Diferencial o DSC); y (3) Funcionales, como eficacia de encapsulación y estabilidad (Estudiadas mediante técnicas que implican separar el compuesto no encapsulado del encapsulado y medir posteriormente la cantidad total frente a lo encapsulado por técnicas cromatográficas como el HPLC; para el caso de la estabilidad el empleo de técnicas que miden la dispersión de la luz a diferentes alturas del recipiente que contiene la solución de nanovesículas es muy frecuente, como la explicada en la sección 2.3.3).

El relativo elevado coste de los fosfolípidos suscitó el interés por buscar compuestos alternativos para la elaboración de nanovesículas. El bajo coste, gran estabilidad y facilidad de almacenaje promovió la exploración de surfactantes no iónicos como alternativa a los fosfolípidos, ya que desde los años 70 se venían empleando en cosmética gracias a sus propiedades de autoensamblado en medios acuosos tal como lo hacían los fosfolípidos (Uchegbu and Vyas 1998). Este tipo de moléculas de las que se componen dan nombre a este otro tipo de nanovesículas, los Niosomas. Su síntesis y caracterización ha ido en paralelo a la de los liposomas, de tal forma todos los métodos de síntesis y la inmensa mayoría de las técnicas de caracterización de éstos puede ser aplicada en los Niosomas (Tangri and Khurana 2011).

El carácter de rigidez que caracteriza a los dos tipos anteriormente citados de nanovesículas es muy diferente al de nanovesículas compuestas por la mezcla de los componentes de los tipos de NV anteriormente comentadas, los Transfersomas, sintetizados por primera vez en 1992 por Cevc y colaboradores (Vinod, Kumar et al. 2012). Esta elevada deformabilidad era el objetivo deseado en una nanovesícula para la administración de compuestos a través de la piel, pero su elevada resistencia al paso por tamices de poros de relativo pequeño tamaño puede ser empleado para otros fines interesantes.

2.3 Técnicas instrumentales para el estudio de la optimización y monitorización del proceso de síntesis del conjugado/nanovesícula

2.3.1 Espectroscopía UV-visible

Los nanomateriales pueden interactuar con la radiación electromagnética produciendo fenómenos de absorción, fluorescencia o fenómenos de scattering (dispersión). Dependiendo de la naturaleza físico-química del nanomaterial podrán darse uno o varios de estos fenómenos.

Las nanopartículas metálicas poseen un fenómeno físico denominado Plasmon Superficial (en la literatura científica citado por sus siglas en inglés SPR, Surface Plasmon Resonance), en el que los electrones de la banda de conducción son excitados por la radiación electromagnética incidente, produciendo una oscilación coherente de los mismos que conlleva la formación de un dipolo con un aumento del campo eléctrico de la superficie de la nanopartícula. Este campo eléctrico conlleva la fuerte absorción de la luz (Cruz, Rodriguez et al. 2012). En el caso de las nanopartículas de oro, este fenómeno se produce a longitudes de onda correspondiente a la región visible del espectro, siendo las responsables de los colores rojizos de las disoluciones de AuNPs.

La frecuencia (o longitud de onda) a la que se produce este fenómeno es dependiente de las propiedades intrínsecas del material (como su constante dieléctrica), de la morfología (tamaño y forma) y del medio que las rodea (Ljungblad 2009; Ijeh 2011; Cruz, Rodriguez et al. 2012). Son estas dos últimas, morfología y entorno, las variables que nos permitirán caracterizar y monitorizar cambios producidos en las mismas para conseguir materiales compuestos nanopartícula-biomolécula (bioconjugados).

Gracias a sus propiedades ópticas excepcionales, las nanopartículas de oro y sus conjugados pueden ser evaluados mediante el estudio del pico de absorción (la posición e intensidad de λ_{\max}) de la banda del SPR. El espectro obtenido informa directamente del tamaño, estado de agregación, y en base a la ley de Beer (**ecuación 1**), de la concentración de nanopartícula y/o bioconjugado (Sapsford, Tyner et al. 2011).

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \quad (1)$$

La espectroscopía UV/Vis emplea un haz de luz monocromático de intensidad (I_0) y longitud de onda (λ) conocida que atraviesa una referencia y la muestra en paralelo, y tras interactuar con la materia de la muestra es detectada (I). El cociente de ambas intensidades se denomina transmitancia,

que se relaciona con la Absorbancia según se observa en ecuación 1. Si la muestra absorbe la radiación, a mayor concentración de ésta mayor será la absorbancia, y viceversa.

Son varios los trabajos que han descrito el efecto de las biomoléculas, especialmente las proteínas, adsorbidas sobre las AuNPs (Wangoo, Bhasin et al. 2008; Jans, Liu et al. 2009; Ljungblad 2009; Ijeh 2011 entre otros), y de plata (Szymanski and Porter 2013). Esta unión provoca desplazamientos en λ_{\max} ($\approx 5\text{nm}$ de acuerdo con la mayoría de los trabajos) que pueden ser empleados para confirmar la adsorción de la biomolécula y la consiguiente formación del conjugado.

Debido a la citada dependencia de la frecuencia a la que se da el SPR con el tamaño, la agregación de nanopartículas deriva en desplazamientos mayores de λ_{\max} , y la consiguiente pérdida de intensidad de la posición original debido a la disminución en la concentración de NPs individuales. Este hecho puede observarse a simple vista, manifestándose como un cambio de color de la disolución, de su rojo característico a un tono púrpura o azul dependiendo del grado de agregación). Este hecho es la base del ensayo de floculación anteriormente comentado.

En resumen, la posición e intensidad de λ_{\max} constituyen los parámetros a observar durante las optimizaciones y producción de conjugados de Anticuerpo-AuNP.

2.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS) y ζ -potential

Otra de las excepcionales propiedades ópticas de las AuNPs es la gran capacidad de dispersar la luz en todas direcciones. Este hecho puede ser aprovechado para el cálculo del tamaño de la partícula de la siguiente forma.

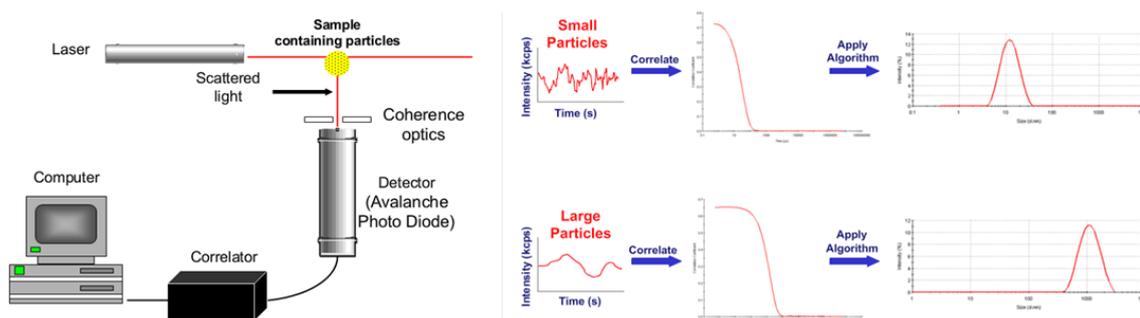


Fig. 7. Configuración de los elementos de medida de un equipo de DLS (izquierda), y forma de obtención del tamaño de la partícula a través de la medida de la fluctuación de la luz dispersada a lo largo del tiempo (derecha). *Imágenes tomadas de la página corporativa de Malvern Instruments.*

Las partículas en suspensión en un líquido se encuentran en continuo movimiento debido a choques con las moléculas del líquido que las rodean, fenómeno denominado en la literatura científica por su término en inglés, *Brownian motion*. La intensidad de la luz dispersa fluctuará en el tiempo debido a la suma de las diferentes fases constructivas y destructivas de las ondas de dicha luz a lo largo del movimiento de las partículas.

Los equipos de DLS miden la fluctuación de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo (**figura 7**) gracias a un componente del equipo, denominado correlador, que mide la similitud (correlación, de ahí su nombre) entre la intensidad de la luz dispersada a dos periodos de tiempo diferente. Cuanto más rápido se mueva una partícula (gracias a su menor tamaño) las diferencias serán mayores ya que las interacciones constructivas y destructivas serán muy diferentes en cada punto, y por tanto la correlación disminuirá muy rápido con el tiempo (**figura 7**, parte superior derecha). Al contrario, las partículas de mayor tamaño se moverán más despacio, y la correlación disminuirá muy lenta con el tiempo (**figura 7**, parte inferior derecha).

Esta correlación sirve para calcular el coeficiente de difusión traslacional (D), que se relaciona con el tamaño (radio hidrodinámico, tamaño de la partícula incluida la capa de solvente cercana a su superficie) a través de la *ecuación de Stokes-Einstein* (**ecuación 2**):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_h} \quad (2)$$

En dicha ecuación k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del líquido de la solución. De esta forma el equipo es capaz de ofrecer medidas del tamaño y distribución de tamaño de las partículas, en nuestro caso nanopartículas de oro y posteriormente tamaño de las nanovesículas.

Puesto que la adsorción de biomoléculas aumentará el radio hidrodinámico de la NP, este incremento puede servir para comprobar la correcta reacción entre los dos reactivos (Jans, Liu et al. 2009; Sapsford, Tyner et al. 2011; Bell, Minelli et al. 2013).

Otro dato importante en la caracterización de suspensiones de NPs, y de interés en la síntesis de bioconjugados, es el ζ -Potential, término anglosajón que se emplea para referirse a la carga de una partícula en el plano de Stern adquirida en una solución particular. Como se ha comentado con anterioridad en el apartado 2.1.1, la carga de las NPs es esencial para el mantenimiento del carácter monodisperso de las mismas. Puesto que la conjugación implica la adsorción de biomoléculas sobre su superficie, la carga de las NPs irá variando (disminuyendo concretamente, por el efecto de

apantallamiento del anticuerpo) a lo largo del proceso de conjugación, hecho que nos servirá para monitorizar dicho proceso y evaluar la estabilidad del conjugado (Sapsford, Tyner et al. 2011; Bell, Minelli et al. 2013).

La forma con la que el equipo obtiene dicho dato es muy sencilla, y de forma resumida se explica de la siguiente forma. La muestra en su cubeta específica (ver sección 3.2.6 de *material y métodos*) es iluminada por un haz láser. En un ángulo de 17° se mide la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada fruto del movimiento de las partículas cargadas al aplicarse un campo eléctrico entre los extremos de la celda. Con la fluctuación se calcula la velocidad de las partículas, que en un campo eléctrico se denomina movilidad electroforética (U_E), relacionada con el ζ -Potential a través de la ecuación de Henry (**ecuación 3**).

$$D_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (3)$$

Donde ε es la constante dieléctrica, η la viscosidad del líquido, $f(ka)$ la función de Henry (1 para medios no acuosos, 1,5 para medios acuosos), y z el ζ -Potential.

2.4 Comprendiendo la plataforma analítica: Lateral Flow Immunoassays (LFIA)

Trabajos anteriores del grupo (Blanco Covián 2013) centraron la atención sobre las características de los componentes de la tiras de flujo lateral, así con en los principios operacionales generales; sin embargo es importante revisar algunas de sus características para entender los principales aspectos sujetos a optimización durante el diseño y desarrollo de las mismas.

2.4.1 Componentes

Aunque en la **figura 8** se recogen las funciones de los diversos componentes, es necesario comentar brevemente las posibles modificaciones que se pueden realizar sobre éstos con la finalidad de aumentar dichas funciones y su impacto sobre la sensibilidad global del test.

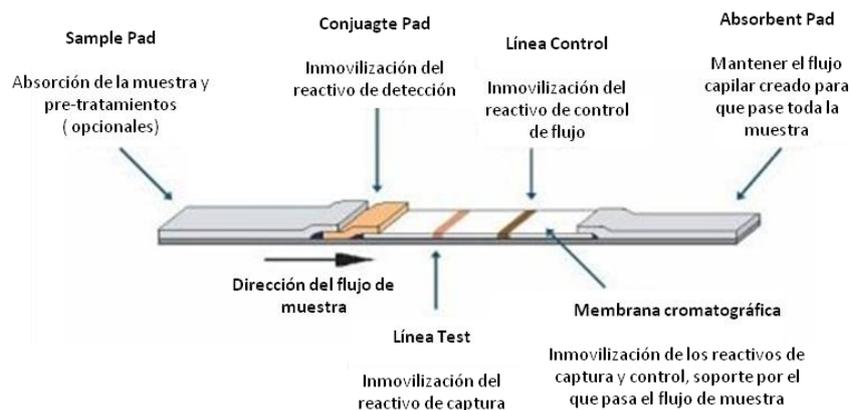


Fig. 8. Componentes y función de cada uno de ellos, de un dispositivo basado en inmunoensayos de flujo lateral.

Sample Pad

Si bien la principal función de este elemento es la mera absorción de la muestra y su distribución hacia el *Conjugated Pad*, éste puede ser tratado para mejorar la sensibilidad. La **tabla 5** recoge las principales modificaciones que buscan una mejora de la sensibilidad.

Otro aspecto susceptible de mejora es la propia naturaleza del material del que está fabricado. En muestras de elevada concentraciones de elementos con gran tamaño (como células) la clásica almohadilla de celulosa puede ser sustituida por fibra de vidrio al igual que el *Conjugate Pad*.

Tabla 5. Tratamientos del Sample Pad previos al montaje con la finalidad de aumentar la sensibilidad del Test.

Objetivo	Pautas a seguir
Promover la resolubilización del conjugado, reducir sus uniones inespecíficas y minimizar las posibles adsorciones del analito a la membrana	Añadir un pequeño porcentaje de BSA y/o una pequeña cantidad de SDS o Tween 20 a una concentración muy baja, y desecar en estufa a 37°C 1-2h.
Evitar los cambios de sensibilidad debidos a cambios en la composición química de la muestra. Por ejemplo, de la acidez o fuerza iónica	Pre-tratamiento con 1M de boratos con pH 9.5

Conjugate Pad

Elemento cuya única función es la inmovilización del conjugado. El único parámetro crítico, que el conjugado salga por completo de la almohadilla, depende únicamente del volumen de muestra a analizar; a su vez, éste dependerá de la capacidad de absorción del último elemento de la tira: el *Absorbent Pad*.

Sin embargo, el buffer de aplicación del conjugado puede mejorarse añadiendo una pequeña cantidad de sacarosa que preserva las estructuras biológicas al desecarse para su montaje en la tira, y facilitará la salida de éstas y su incorporación al flujo. Por otra parte, se prefiere como buffer un disolución 2mM de boratos pH 7, 7-4, ya que posee cierto carácter surfactante.

Membrana, algo más que un soporte

La membrana donde tiene lugar el inmunoensayo es probablemente la parte más importante de la tira. No es un elemento pasivo, ya que su composición y propiedades físicas crean el flujo capilar responsable de la sensibilidad y especificidad, afectando a parámetros clave como la consistencia de la línea test (anchura, intensidad, homogeneidad, etc.).

Como soporte sobre el que se establece un flujo, es importante que retenga de forma irreversible los reactivos que componen las líneas de control y de test. Esta capacidad es producto de las características químicas (tipo de polímero) y físicas (tamaño y distribución de poros, espesor, etc.).

Un concepto importante que los diseñadores de tiras deben tener en cuenta es la interconexión que se establece entre las características individuales. La sensibilidad del test será producto de dichas características individuales, y de sus relaciones. La **figura 9** ilustra este concepto, mostrando las principales relaciones que se establecen.

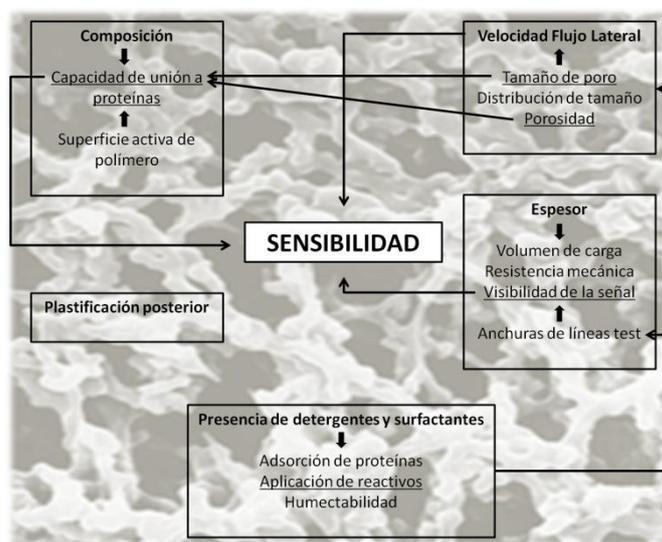


Fig. 9. Efecto sobre la sensibilidad de las características de la membrana, e interconexión de las mismas que ejemplifican la complejidad de la membrana como soporte analítico.

La **capacidad de unión de proteínas** por parte de la membrana se debe a las interacciones entre el material que la forma y las proteínas. En el caso de la nitrocelulosa, material más empleado en su

fabricación, éstas son de naturaleza electrostática, entre el dipolo que forma el nitrato y el dipolo que forma el enlace peptídico.

Es lógico pues, que la mayor o menor capacidad de una membrana esté relacionada con la superficie de polímero de esta, que a su vez, es producto de características como el tamaño de poro, porosidad, etc.

La **velocidad de flujo capilar**, velocidad del frente de muestra sobre la membrana, depende de la suma de las características de la estructura porosa (tamaño de poro, distribución y porosidad).

La importancia de este parámetro está relacionada con la concentración efectiva del analito sobre la línea test. Con un incremento de la velocidad (membranas más rápidas, con poros mayores), los antígenos y anticuerpos estarán lo suficientemente próximos como para formar el complejo durante menos tiempo, por lo que la sensibilidad se verá disminuida. Puesto que la velocidad disminuye exponencialmente con la distancia recorrida, la posición de las líneas de control y test contribuirá a una mayor o menor sensibilidad. Líneas próximas al final de la membrana se verán influenciadas por un flujo más lento, con el consiguiente aumento de sensibilidad, y viceversa.

Otro aspecto en el que el flujo influye sobre la sensibilidad es el efecto sobre la calidad de la línea test. Membranas rápidas provocaran que la aplicación de los reactivos difumine lateralmente en mayor grado, creando líneas más anchas. Puesto que recordemos, es un espacio tridimensional, en la línea la concentración de complejo que forma la señal será menor, pudiendo no ser apreciado por el ojo humano la señal proveniente de concentraciones inferiores.

Por último, el espesor de la membrana afecta de la misma forma a la visibilidad del resultado, pero también a la fragilidad y al volumen muerto, aspectos a tener en cuenta en el cuidado del manejo de las membranas durante su montaje y al tipo de *absorbent pad* que debe ser empleado para asegurar un correcto flujo (que toda la muestra fluya sobre las líneas).

Otro aspecto con impacto sobre la sensibilidad es la aplicación de agentes tensoactivos (surfactantes y detergentes) a las membranas o a los reactivos. Así como una mínima cantidad es necesaria para vencer la hidrofobicidad del material, y que la membrana permita el flujo de líquidos acuosos, un exceso puede bloquear la adsorción de proteínas a la hora de aplicar los reactivos, o favorecer la formación de líneas más anchas.

Sin embargo, la elevada concentración de anticuerpo inmovilizado en la líneas test y control provoca una modificación de las propiedades químicas y físicas de la zona, pudiendo llegar a tener

un impacto sobre el flujo capilar en estas zonas (pudiendo incluso deformarse la forma del frente y que se creen canales preferentes de flujo). Para evitar tal proceso, puede añadirse una pequeña cantidad de estos compuestos a los reactivos a inmovilizar, restaurando las condiciones originales y equiparándolas al resto de la membrana para asegurar un flujo homogéneo. Esta interconexión ha de tenerse en cuenta a la hora de optimizar un diseño, ya que el cambio de un parámetro puede tener impacto sobre otro, provocando que finalmente la sensibilidad no mejore.

Por ejemplo, membranas con poros mayores (mayores velocidades de flujo), retendrán menos cantidad de proteína por unidad de superficie, pero se requerirán igual o mayor cantidad que para membranas de poro inferior, puesto que difundirán lateralmente provocando una menor concentración efectiva (con impacto sobre la visibilidad) que deberá ser optimizada.

De esta forma, surgen puntos importantes de optimización como consecuencia de esta naturaleza compleja de la membrana. La **figura 10** refleja los puntos susceptibles de optimización en el proceso de diseño de una tira LFIA, siendo los puntos relativos a la composición de los medios de los reactivos de captura desarrollados en la **tabla 6**. Recordemos que la optimización de la fase de identificación (conjugado) han sido expuestos en apartados anteriores (*ver sección 2.1*).

Tabla 6. Parámetros relativos a la composición de los buffer de los reactivos de captura, con el objetivo de aumentar la sensibilidad del Test.

Parámetro	Objetivo	Pautas a seguir
Composición	Conseguir la estabilidad del pH sin interferir en la fijación a la membrana o la obturación de los poros modificando la eficiencia y características del flujo	Elegir la composición en función del pH al que indique el punto isoeléctrico del elemento de captura: 4-6 Acetato de Amonio 6-7.5 PBS 7.5-8.5 Boratos
Fuerza iónica	Evitar interferencia de los iones en solución con las interacciones electrostáticas que permiten la fijación de los reactivos de captura Evitar la aparición de residuo sólido tras la evaporación que retrasan la humectación y avance del flujo	Mínimo requerido para tamponar el pH Eliminación de NaCl del medio Empleo de diluyentes no salinos
pH	Evitar la solubilidad de la proteína y mantener estable la solución	Trabajar \pm unidad sobre el punto isoeléctrico
Presencia de aditivos	Mejorar la aplicación al reducir viscosidad, solubilidad del reactivo proteico, y acelerar el secado	Empleo de 1-10% v/v de metanol, etanol o propanol
Adición de Detergentes	Evitar la humectación inferior de la línea test por la presencia del elemento de captura	Adición de 0.05% de SDS o 0.005% de Triton X-100

Absorbent Pad

Su única función es generar un flujo capilar continuo, y que éste sea unidireccional sin posibilidad de reflujo de la muestra hacia las zonas analíticas. Generalmente en compuestos de celulosa, la única optimización posible es su elección en base a qué cantidad de muestra se desea hacer pasar por la zona analítica. Para ello pueden escogerse entre diversos modelos en base al grado de compactación de la celulosa, o modificarse mediante corte selectivo las dimensiones del mismo.

Holder

Puede parecer que su única función es estética, al dejar a la vista únicamente la zona de introducción de la muestra y de visualización de los resultados. Sin embargo, ejerce una función muy importante a la hora de aumentar la sensibilidad. Interiormente posee una serie de protuberancias cuya finalidad es presionar en la justa medida los componente en las zonas donde éstos se solapan, de tal forma que se asegura bajo cualquier circunstancia un correcto flujo homogéneo.

2.4.2 Proceso de Diseño y Producción

Finalmente, es importante indicar que el proceso de diseño de un test LFIA, a pesar de parecer sencillo y rápido, se compone de múltiples pasos cuyo orden es importante a la hora de alcanzar una sensibilidad lo suficientemente elevada como para dar respuesta a la detección que se plantea. La **figura 10** recoge esquemáticamente un diagrama en el que se muestran dichos procesos, y puede servir de base para plantear un diseño y producción de un test LFIA.

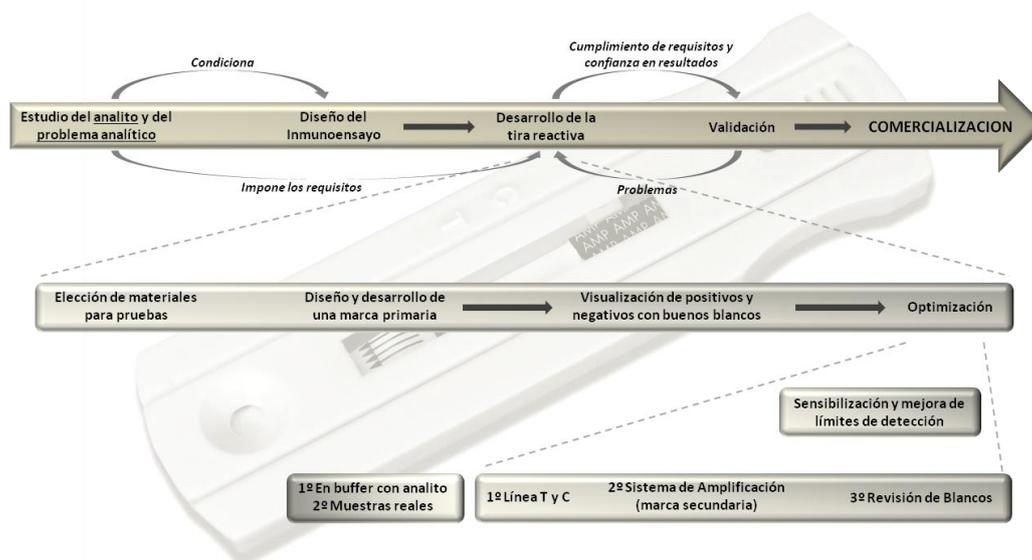


Fig. 10. Diagrama de etapas de diseño y producción de un dispositivo POC basado en inmunoensayos de flujo lateral (LFIA).

3. Material y métodos

3.1 Material

Reactivos comunes

NaCl (Sigma Aldrich)

Seroalbúmina bovina, BSA (Sigma Aldrich)

EDC (Sigma Aldrich)

NHS (Sigma Aldrich)

Agua mili-Q

Metanol (Fluka)

Metanol calidad HPLC (Fluka)

Cloroformo (Fluka)

Tween20 (Fluka)

HEPES (Sigma Aldrich)

Nanopartículas y reactivos para la síntesis de Nanovesículas

Solución de Oro coloidal, 40nm de partícula (BBI Solutions, Cardiff, UK)

Sulforhodamina B (Sigma Aldrich)

Azul de metilo (Sigma Aldrich)

Fosfatidilcolina de soja, (Phospholipon90G, PL90), (Lipoid GmbH)

Poligliceril-3 dioleato, (Plurol oleique), (Gattefossé)

Colesterol (Sigma Aldrich)

1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxy(polietilenglicol)2000], PL-PEG-COOH (Avanti Polar Lipid Inc.)

Fungibles de uso común y especiales

Tubos Eppendorff 1,5mL y 2,5mL (Dismed)

Puntas de micropipeta de 20, 200 y 1000µL

Dispositivos desechables para diálisis, modelo Slide-A-Lyzer® Dialysis cassette 7000MWCO (Thermo Scientific)

Cubetas desechables transparentes a UV modelo UV-Transparent Disposable Cuvette from Sarstedt (Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)

Jeringuillas para administración de inyecciones percutáneas, para volúmenes de 1mL.

Viales opacos para HPLC con tapón de goma perforable (Dismed)

Material para el montaje de tiras de Flujo Lateral

Membrana de Nitrocelulosa modelo UniSart® CN95 (Sartorius)

Sample Pad y Conjugate Pad de fibra de vidrio (Millipore Corporation, USA)

Absorbent Pad de celulosa (Millipore Corporation, USA)

Tarjetas autoadhesivas para montaje de test rápido de flujo lateral (MDI, India)

Equipos e Instrumentación

Medidor de pH

Centrifuga con rotor para tubos Eppendorff

Guillotina de filo rodante para material plástico (Kodak, USA)

Espectrofotómetro UV/Vis modelo Perkin Elmer lambda 900, de los SCTs de la Universidad de Oviedo

Celdas de Cuarzo para espectrofotometría UV/Vis, modelo X (Perkin Elmer, Germany)

Equipo para DLS modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)

Celdas para medición de ζ-Potential, modelo Folded capillary cell DTS 1060 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)

Sonicador modelo CY-500 (Optic Ivymen System, Spain)

Homogeneizador modelo SilentCrusher M, rotor tipo 22G (Heidolph, Germany)

Rotavapor modelo X (Buchi, Switzerland)

Agitador magnético y térmico

Equipo de HPLC HP series 1100 (Hewlett Packard, US) con detección por DAD (HP G1315A, Hewlett Packard, US) y Fluorescencia (1260 Infinity A, Agilent Technologies, US)

Columna analítica para HPLC Zorbax Eclipse Plus C-18 (5µm de partícula, 4,6mm x 150mm), (Agilent Technologies, US)

Turbiscan Lab® Expert, (Formulation, France)

Celda de vidrio para análisis de Backscattering con tapón magnético para el equipo Turbiscan Lab® Expert, (Formulation, France)

Trazadora de líneas modelo PLM-02 (Easy Printer, MDI)

Cortadora manual de plásticos con filo rodante (Fellowes®, Newton TM)

3.2 Métodos

3.2.1 Sensibilidad de las AuNPs a la fuerza iónica del buffer

Para este ensayo se emplean 250 μL de AuNP de 40 nm (*BBI Solutions, UK*) incubados en tubos *Eppendorff* (1,5 mL) en agitación durante 15 minutos con 250 μL de diferentes concentraciones de NaCl (2, 5, 10, 25, 50 mM y 1M) preparadas en agua Mili-Q. A continuación se pasa el contenido a una celda de cuarzo de 500 μL y paso óptico de 10 mm. Los espectros se obtuvieron midiendo la absorbancia entre 450 y 650 nm con un equipo *Perkin Elmer lambda 900*.

3.2.2 Obtención del P.I. de un anticuerpo

2 μg de proteína (Ac 9A6.12) fueron mezclados con un tampón de carga para la rehidratación de la tira y la introducción de la muestra en la misma. Se prepararon 125 μL de tampón que contenía: Urea 8M y CHAPS para solubilizar la proteína, IPG Buffer (anfolitos) y una mínima cantidad de azul de coomassie (para dar color).

Se coloca la disolución tampón en una cubeta alargada de preparación de tiras, y se aplica formando una línea sobre la que cuidadosamente se deposita (con la acrilamida hacia abajo) la tira. Se cubre de aceite mineral para evitar la deshidratación, y se deja toda la noche rehidratando.

Tras este tiempo, se retira el aceite y, con cuidado, se lava la tira por inmersión en un buffer (por ejemplo PBS) para retirar el exceso de aceite. Se coloca la tira sobre la cubeta de porcelana, y ésta sobre el equipo, verificando que los contactos están correctamente alineados. A continuación se colocan dos almohadillas de celulosa ligeramente humedecidas, que actuarán como absorbente de las sales, sobre los extremos de la tira (solapando 2 mm). Se vuelve a cubrir la tira y los dos canales adyacentes con aceite mineral para favorecer la disipación del calor. Se colocan y ajustan los electrodos presionando sobre las almohadillas y se cierra la tapa del equipo.

Se configura el software con las especificaciones de la tira (normalmente con indicar el tipo de tira el software ya sabe qué condiciones tiene que aplicar). Se le seleccionó la longitud (7 cm) y gradiente de pH (5-8), y por último el programa de enfoque: 2 h a 150 v para la extracción de las sales, un gradiente de 4000 v (10000 V/h) para el enfoque (que llevará 6 h 49 min según el equipo), y una hora extra a 150 v para que no se desenfoque.

Al finalizar el enfoque, se retira el aceite, se vuelve a lavar la tira en buffer y se tiñe durante dos horas con una solución de 40% Metanol, 10% de ácido acético, 50% de agua Mili-Q y 0,1% de Coomassie. Para desteñir se emplea la misma disolución, pero sin colorante, y se deja agitando 6 h.

Puesto que el gradiente de pH es lineal, se escanea la tira y se calcula la posición de la banda. Por extrapolación se obtiene el pH del P.I.

3.2.3 Ensayo de Floculación

250 μL de las citadas AuNPs son incubadas en tubos Eppendorff con 20 μL de Anticuerpo monoclonal anti cTnI 9A6.12 (producción propia por parte del *Grupo de Nanobioanálisis de la Universidad de Oviedo*, producido en ratón) a diferentes concentraciones 0,010/ 0,015/ 0,025/ 0,05/ 0,1/ 0,15/ y 0,20 mg/mL en PBS 10 mM y 2 mM, pH 7.4. Tras la incubación se añaden 100 μL de NaCl 10% y se incuba de nuevo durante 15 minutos con agitación. Finalmente, se añaden 130 μL de agua Mili-Q, y se procede a medir espectrofotométricamente como en el apartado 3.2.1.

3.2.4 Protocolo de conjugación de Ac/AuNPs

1,5 mL de AuNPs son incubadas con 100 μL de la concentración de Ac obtenida en el ensayo de floculación en un tubo de ensayo de vidrio con agitación durante 15 min. 100 μL de BSA 1 mg/mL son añadidos a la disolución y se vuelve a incubar durante 15 min con agitación. Tras este paso, se divide el volumen final en dos tubos *Eppendorff* de 1,5 mL, y se centrifugan a 10000 rpm durante 10 min. Se elimina con cuidado el sobrenadante, y el pellet (que deberá ser fácilmente resuspendible y de color rojo) se resuspende en 500 μL de PBS 2 mM, pH 7,4. Se repite el proceso de centrifugación y se resuspende el pellet en un volumen final, controlando por pesada, de 150 μL de PBS (2 mM, pH 7,4, 10% de sacarosa y 0,1% de BSA).

Finalmente las alícuotas de trabajo son congeladas a -4°C hasta su empleo, teniendo en cuenta que son estables a temperatura ambiente un día. *Protocolo adaptado y modificado de Bioconjugate Techniques (Hermanson 2008)*.

3.2.5 Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ -potential

Las medidas de tamaño y ζ -potential fueron efectuadas con un equipo *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)*. Para las medidas de tamaño se emplearon cubetas desechables transparentes a UV, modelo UV-Transparent Disposable Cuvette from Sarstedt (*Aktiengesellschaft & Co., Nürmbrecht*) con una capacidad de 400 μL . Para el caso del ζ -potential se emplearon celdas capilares en forma de U con electrodos acoplados, con una capacidad de 800 μL , que se llenaron con una ajuga de inyección para vacunas, tal y como especifica el fabricante. Las celdas eran modelo *Folded capillary cell DTS 1060 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)*.

Se crearon archivos de medida específicos para tamaño y ζ -potential de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y se configuró que cada medida se repitiese 3 veces consecutivas con la finalidad de calcular parámetros estadísticos básicos (media y desviaciones estándar) tal y como aconseja el fabricante.

3.2.6 Montaje de las tiras de flujo lateral

Para la fabricación de las tiras se emplearon los componentes citados en la *sección 3.1, Materiales*. Para su montaje se coge una tarjeta soporte (Backing card) con las regiones de pegado del resto de componentes delimitadas. Tras despegar el área reservada a la membrana, se corta un fragmento de ésta de 32 cm, y se pega sobre la tarjeta procurando no tocar la membrana con los dedos. Se toma una tira de *Absorbent Pad* cuyas dimensiones vienen ajustadas a la longitud de la tarjeta soporte (30 cm), y se pega sobre ésta solapando con la membrana 1 mm. Por último, en este caso concreto, se utiliza como *Sample Pad* una tira de fibra de vidrio empleada generalmente como *Conjugate Pad* (debido a que observamos que la introducción de la muestra era mejor que con uno de celulosa). Una vez montados todos los componentes, se utiliza una guillotina de filo rodante para cortar tiras individuales de 5mm de ancho.

Con la ayuda de una micropipeta, se dispensan por tira 1 o 3 puntos de 0,3 μL de reactivos de captura, ya que la dispensadora de líneas sufrió un problema técnico a medio proyecto. Se dejan secar las tiras en estufa a 37°C durante una hora, y se almacenan en un bolsa opaca de cierre hermético con una bolsita de desecante (silica gel).

Puesto que se trata de pruebas iniciales, en las que la sensibilidad se va a probar mínimamente, se ha escogido una membrana con velocidad de flujo medio de 90 s/40 mm modelo UniSart[®] CN95.

3.2.7 Síntesis de nanovesículas de nueva formulación, y conjugación al Ac 9A6.12

El protocolo de síntesis es una versión modificada del propuesto por Bangham *et al.* (Bangham *et al.* en Rongen, Bult *et al.* 1997), denominado *Thin film hydration method*. Los pasos del proceso son los siguientes:

1. Pesada de los componentes: 0,750 g de cada uno de ellos (PL90, Plurol Oleique y colesterol).
2. Disolución de los mismos en la mezcla de disolventes orgánicos: 4 mL de Metanol y 6 mL de cloroformo (este último para la ayuda de la mezcla con el colorante, ya que se encuentra en agua mili-Q a, ver concentraciones en sección 3.1 materiales). A esta mezcla se le añade el fosfolípido (112 μL que posee un grupo -COOH y que permitirá la conjugación por medio

- de EDC/NHS para formar un enlace covalente de tipo amida con los grupos $-NH_3$ de los anticuerpos).
- Tras la adición de los lípidos y su completa disolución en agitación (aproximadamente a los 3 min), se añade 1 mL del colorante a encapsular, y se deja en agitación durante otros 7 min.
 - Se aplica a la disolución anterior ultrasonidos durante 10 min, con una amplitud de 42%. El objetivo es asegurarse la homogeneidad de la disolución.
 - Se eliminan los disolventes orgánico por medio de la evaporación en atmósfera a baja presión (140 bar) con la ayuda de un rotavapor a 30 rpm y con el baño de agua a 45°C. El aspecto que debe quedar es el de un gel denso, de un color o rojo oscuro (SRB) o azul oscuro (MB).
 - Este gel se rehidrata con 50 mL de HEPES (10 mM, pH 7,4) a 45°C y en agitación a 15000 rpm durante 15 min con la ayuda de un homogeneizador.
 - Tras ese tiempo, se aplica ultrasonidos de nuevo la disolución de nanovesículas ya formadas (de nuevo 42%, durante 10 min), con el objetivo de reducir y homogeneizar tamaños. Este paso se lleva en un baño de hielo para evitar el exceso de calor generado.
 - Se mide el tamaño con el DLS y se observa el PDI (índice de poli-dispersibilidad, medida del ancho de la distribución de tamaños). Tras repetir dos tandas más de ultrasonidos, con sus correspondientes medidas en DLS, se da por finalizado la síntesis.

Diálisis. Se toman 3 mL de la solución de nanovesículas, para su diálisis en un cartucho modelo *Slide-A-Lyzer® Dialysis cassette 7000MWCO (Thermo Scientific)*. Como medio de diálisis se emplea HEPES (10 mM, pH 7,4). El objetivo de este paso es eliminar el colorante que no ha sido encapsulado. Puesto que el medio deja de dializar si está saturado, éste se cambió cada 5 h hasta que no se observó coloración debido a colorante libre (sin encapsular).

Conjugación. 300µL de nanoveículas dializas son activadas (sus grupos carboxilo) con 100 µL de EDC/sulfoNHS 1 mg/mL en HEPES durante 2 h. Trascorrido este tiempo, se añaden 100 µL del Ac 9A6.12 y se deja reaccionar con ligera agitación durante 16h. Para la eliminación del exceso de Ac se probó una estrategia de filtración con filtros de 200 kDa que resultó fallida (ver sección resultados).

3.2.8 Medida de la eficacia de encapsulación

1 ml de nanovesículas dializadas y sin dializar fueron lisadas con 9 mL de metanol, y filtradas con filtros de jeringa de PES y PVDF. El producto filtrado se diluyó 1:1000 en el caso de las SRBnv y 1:100 en el caso de las MBnv. 500 µL de éstas diluciones fueron introducidos en viales opacos para HPLC. La cromatografía para obtener el pico correspondiente a los colorantes empleados fue

una fase reversa llevada a cabo con fase A (100% agua) y fase B (100% metanol) según trabajos previos del grupo (Pando et al 2014. *in press*).

La columna analítica fue un modelo Zorbax C18 (5 μm de partícula, 4,6 mm x 150 mm) de la casa comercial Agilent, y un HPLC series 1100 (*Hewlett Packard, US*). Se configuró un volumen de inyección de 20 μL y una temperatura de 40°C. El gradiente empleado fue el siguiente: a los 2 min 80% fase A y 20% de fase B, a los 5 min 100% de fase B, y a los 10 min 100% de fase B. La detección empleada fue Absorbancia a 554 nm y 607 nm para SRB y MB respectivamente, y Fluorescencia (554-585 nm de excitación y emisión respectivamente) para el caso de SRB.

3.2.9 Estudio de estabilidad de la suspensión de nanovesículas

20 mL de la suspensión de nanovesículas fueron empleadas para llenar un celda de medida con una altura máxima de llenado de 40 mm. Se monitorizó la retrodispersión de luz (Backscattering, %) de la muestra a lo largo de toda la celda, tras indicarle que fue llenada con dicho volumen. Se configuró el sistema para que se tomaran medidas cada 3 h durante 7 días. El equipo empleado fue un modelo *Turbiscan Lab® Expert (Formulation, France)*. Los datos obtenidos fueron exportados y tratados con el software T_{lab} Expert v.1.13.

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización y Caracterización de la conjugación de AuNP/Ac 9A6.12

La naturaleza y tipo de interacciones que se establecen entre los reactivos de la bioconjugación (AuNPs y anticuerpos) requiere una optimización de las condiciones de los medios donde van a tener lugar, con el objetivo de permitir que éstas no sólo se den, si no que el resultado final sea de la mejor calidad posible. Como se ha indicado en la **sección 2.1**, tres datos son necesarios para el ajuste de las condiciones: fuerza iónica del buffer, pH de la disolución y concentración del anticuerpo.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los diferentes ensayos previos al desarrollo de la conjugación.

4.1.1 Sensibilidad del oro coloidal a la fuerza iónica del Buffer

El ensayo de sensibilidad de las nanopartículas de oro comerciales (BBI, 40 nm) a diferentes concentraciones de sal (NaCl) se muestra en la **figura 11**. El resultado obtenido concuerda con lo esperado, a mayor concentración de sal, mayor es la agregación de las NPs. La agregación se observa como una disminución de la absorbancia a la longitud de onda del SPR propia de estas NPs (λ_{max} , 525 nm) y, en casos de intensa agregación, por un cambio de color (de rojo a azul) fruto del cambio en el tamaño de las partículas y por tanto, de la longitud a la que se observa el SPR. Similares resultados han sido observados por diversos autores que trabajan con AuNPs de tamaños similares al empleado en este trabajo (Wangoo, Bhasin et al. 2008; Ljungblad 2009).

El efecto de la agregación inducida por sales se debe a la neutralización de las cargas negativas que provienen de la capa de citrato adsorbido a la superficie de las AuNPs empleado en su síntesis por el método de Turkevich (Wangoo, Bhasin et al. 2008). Estas cargas negativas son las responsables de generar, por repulsión, el estado monodisperso de la solución de oro coloidal, y por tanto su pérdida permite a las NPs agregarse.

Puesto que las cargas provienen de los grupos carboxilo del citrato, es importante comprobar y mantener el pH de la solución de NPs en un valor por encima del pK_a de dicho grupo. En este caso, es importante comprobar que el pH esté entre 8-9 para poder ser empleadas en la conjugación (Hermanson 2008). Éste puede ser ajustado con NaOH (0,1M) si fuese necesario.

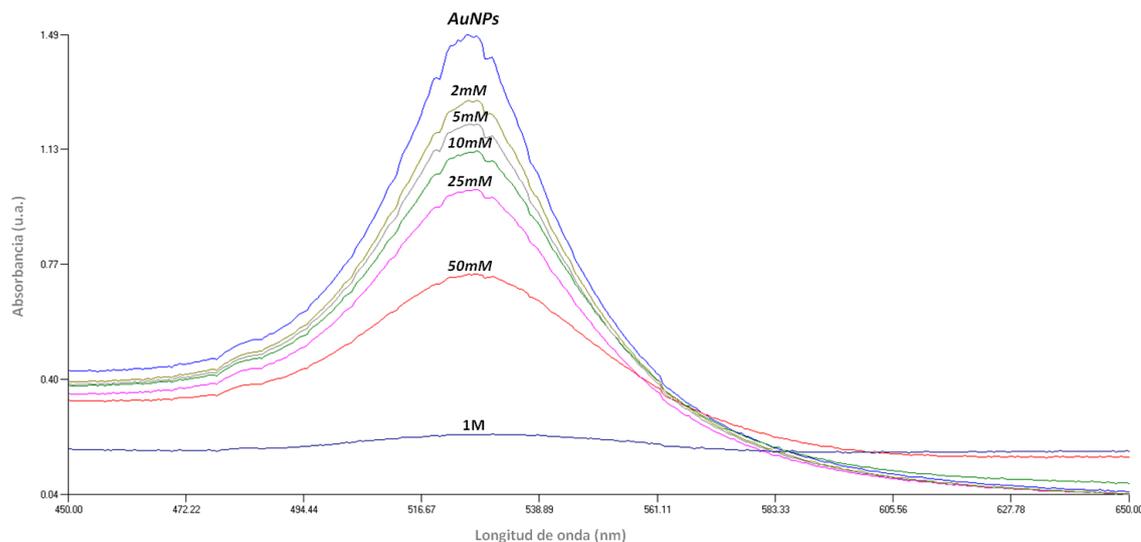


Fig.10. Sensibilidad de las nanopartículas de oro coloidal (40 nm) a diferentes concentraciones de NaCl. La disminución de absorbancia coincidente con λ_{max} del SPR (525 nm) se debe a la agregación de las nanopartículas inducida por la pérdida de cargas negativas como efecto de su atenuación por los cationes de sodio.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió emplear PBS 2 mM como buffer en el que se encuentren los anticuerpos para su adición a las NPs, aunque se encuentra en Stock de PBS 10 mM. Es lógico pensar que NPs de mayor tamaño soportarán fuerzas iónicas superiores, puesto que la carga está relacionada con la superficie, y ésta con el tamaño. Por ello, la sensibilidad de cada NP ha de ser evaluada de forma independiente.

4.1.2 Isoelectroenfoque de Anticuerpos: Obtención del Punto Isoeléctrico

El mantenimiento de la naturaleza monodispersa de la solución de oro no es el único parámetro a controlar. La disolución de anticuerpos ha de mantenerse estable y sin agregados, para que al ser añadida a la solución de AuNPs puedan interactuar 1:1. Este estado se consigue en condiciones donde el pH de la disolución de los Ac está cercano al punto isoeléctrico, donde la repulsión y atracción electrostática se encuentra equilibrada. La **figura 11** muestra el resultado de la obtención del P.I. del anticuerpo 9A6.12, empleado en este trabajo para ser conjugado a AuNPs.

El P.I. obtenido de 5,82 es consistente con otros anticuerpos monoclonales descritos para marcadores cardiacos (Szymanski and Porter 2013). Sin embargo, puesto que una de las interacciones que se establecen entre Ac/AuNPs es de carácter electrostático, el pH de la disolución de Ac suele establecerse en 1-1,5 unidades de pH por encima del P.I. asegurando un ligero predominio de cargas positivas que permita la interacción con las cargas negativas de las AuNPs (Hermanson 2008; Wangoo, Bhasin et al. 2008).

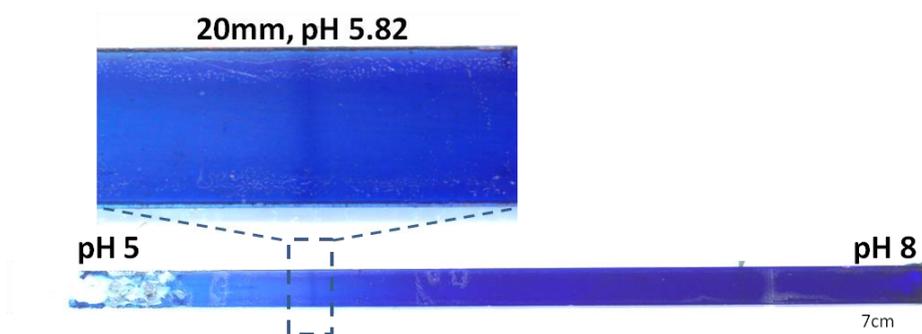


Fig.11. Resultado del isoelectroenfoque de 2µg de anticuerpo 9A6.12 empleando una tira ReadyStrip™ IPG (BIO RAD) con un gradiente de pH entre 5 y 7 (7cm de longitud, con gradiente lineal), y un equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Los detalles del programa de enfoque pueden consultarse en la sección de métodos. La posición de la banda a 20mm desde el inicio (pH 5) nos indica por extrapolación que el P.I. es de 5.82.

Por otro lado, el valor del P.I marcará el tipo de buffer (composición) a emplear, como se muestra en la **tabla 6** de la **sección 3.4**. En nuestro caso, para el P.I. citado se requiere PBS como reguladora, al igual que en muchos de los trabajos consultados (Ljungblad 2009; Choi, Lee et al. 2010; Zhu, Zou et al. 2011).

4.1.3 Ensayo de floculación; Concentración estabilizante de Anticuerpo

El tercer parámetro a optimizar en la conjugación es la cantidad de anticuerpo que se necesita para estabilizar las AuNP. Como se comentó en la **sección 2.1** de *fundamentos teóricos*, la mínima cantidad estabilizante de Ac se calcula mediante el ensayo de floculación. Con ello se busca encontrar no sólo la estabilización de las NPs, si no la concentración mínima requerida para evitar exceso de moléculas de Ac, por un lado gasto innecesario de uno de los reactivos más caros empleados en este tipo de trabajos (**figura 5**), y por otro lado evitar fenómenos de saturación en superficie que genere impedimentos estéricos y pérdida de funcionalidad del conjugado. Este procedimiento se encuentra citado ampliamente en trabajos en los que se bioconjugan Ac y AuNPs (Wangoo, Bhasin et al. 2008; Choi, Lee et al. 2010).

El resultado para el caso concreto del anticuerpo 9A6.12 se observa en la **figura 12**. Puesto que a pesar de elegir PBS 2 mM como buffer de disolución en el ensayo del punto 4.1.1, se decidió realizar inicialmente un ensayo de floculación con los anticuerpos tal cual son enviados desde el *Servicio de Biotecnología Preparativa de la Universidad de Oviedo* (PBS 10 mM), al no ser una diferencia muy considerable la agregación inducida entre 2 y 10 mM. Visualmente se observa que 0.1 mg/mL ofrece un color rojo característico tras la adición de 10% de NaCl, que nos muestra la estabilidad de las NPs gracias a la adsorción de moléculas de Ac a su superficie (**detalle figura 12**).

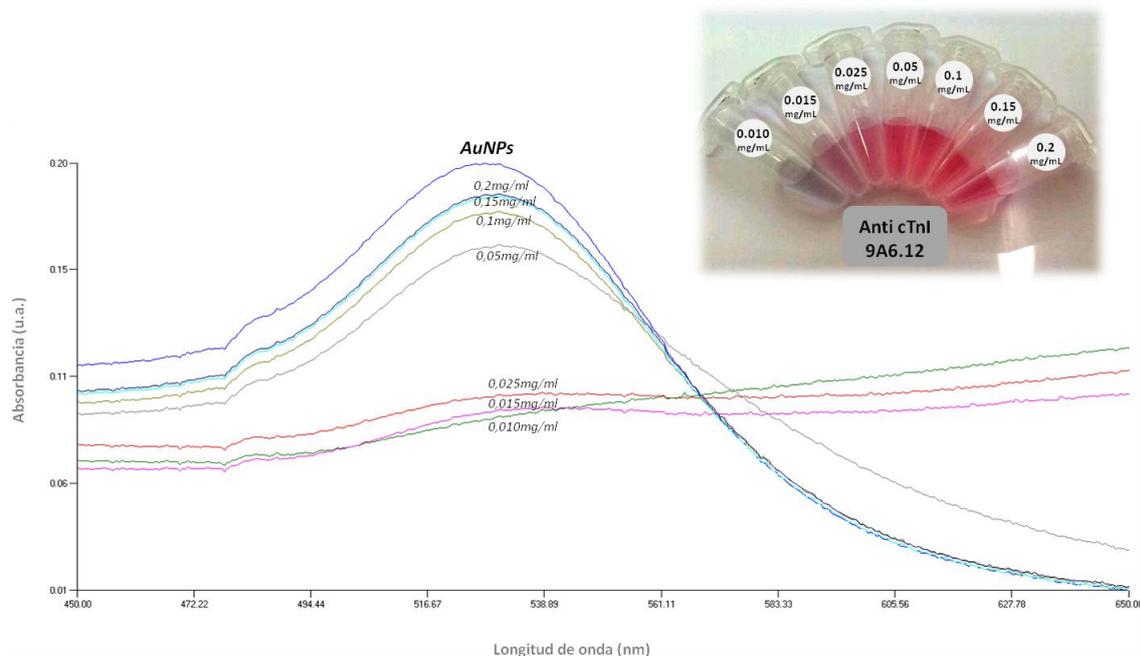


Fig.12. Conjunto de espectro UV/Vis correspondiente al ensayo de floculación empleado para conocer la cantidad mínima estabilizante de las nanopartículas de oro. En este caso el anticuerpo se encontraba disuelto en PBS 10 mM, pH 7.4. Tras los 15min de reacción se induce la agregación con 10% de NaCl. El cambio de color observado en el detalle superior (de rojo, estabilizado, a azul, agregado) da una indicación de la concentración buscada, en este caso 0.15, ya que se trabaja una dilución por encima de la primera de color rojo. Se observa el desplazamiento de la longitud de onda del SPR natural, fruto de la adsorción de anticuerpo.

Por otro lado, se observan dos conjuntos de espectros: uno cercano al de las NPs desnudas y otro con máximos bastante desplazados respecto a la longitud de onda del SPR de las AuNP (525nm). Ambos conjuntos representados en la **figura 12** corresponden con los tubos rojos (AuNPs estabilizadas, cercanas al SPR natural) y otro a los azules-purpuras (AuNPs agregadas).

A medida que la concentración de Ac aumenta, se consigue una mayor estabilización de las NPs, lo que se traduce como un máximo cada vez más cercano al de las AuNPs sin modificar. El máximo de estabilización se alcanza a los 0,15 mg/mL, ya que 0,20 mg/mL estabiliza lo mismo. Por lo tanto, 0,15 mg/mL sería la concentración mínima estabilizante, ya que se suele emplear un 15% más de la primera concentración estabilizante (0,1 mg/mL) (Hermanson 2008).

Otro dato de especial interés que se obtiene de los espectros es el desplazamiento, de aproximadamente de 5 nm, que se observa en los máximos de los espectros relativos a las concentraciones estabilizantes de NPs.

Como se comentó en la sección 2.1 el SPR es un fenómeno dependiente del estado de la superficie de la NPs, y cualquier cambio en la misma producirá un cambio en la frecuencia del mismo. Este cambio de 5 nm tras la adición de Ac ha sido ampliamente registrado por numerosos trabajos (más adelante citados), y se atribuye a la adsorción de los Ac sobre la superficie de las NPs.

Este desplazamiento puede ser empleado como confirmación de la adsorción de moléculas de Ac a la superficie (Seydack 2005; Ljungblad 2009; Ijeh 2011; Sapsford, Tyner et al. 2011; Bell, Minelli et al. 2013) y, por tanto, utilizado en posibles comprobaciones de la calidad y del correcto proceso de conjugación, importante hecho en la producción del conjugado a gran escala por parte de productores de test LFIA que empleen AuNPs como marca. Esta observación será revisada en secciones posteriores.

Puesto que el buffer en el que se encontraban los Ac, 10 mM, incluía 150 mM de NaCl y se había constatado la sensibilidad de las NPs a concentraciones elevadas de sales, se decidió dializar el Ac a PBS 2 mM sin NaCl (cuya única función es evitar crecimiento de microorganismos que degraden el anticuerpo). Cabe mencionar que aunque es el stock el que posee una concentración elevada de sales, las diluciones bajas de Ac para estabilizar se realizaban con PBS 10 mM sin sales, disminuyendo por tanto la concentración final de NaCl.

El ensayo de floculación bajo las nuevas condiciones ofreció resultados visualmente idénticos al caso anterior, pero espectrofotométricamente diferentes. La **figura 13** muestra las tres concentraciones más altas para facilitar su visualización, aunque la mejora resultante es extrapolable al resto de concentraciones.

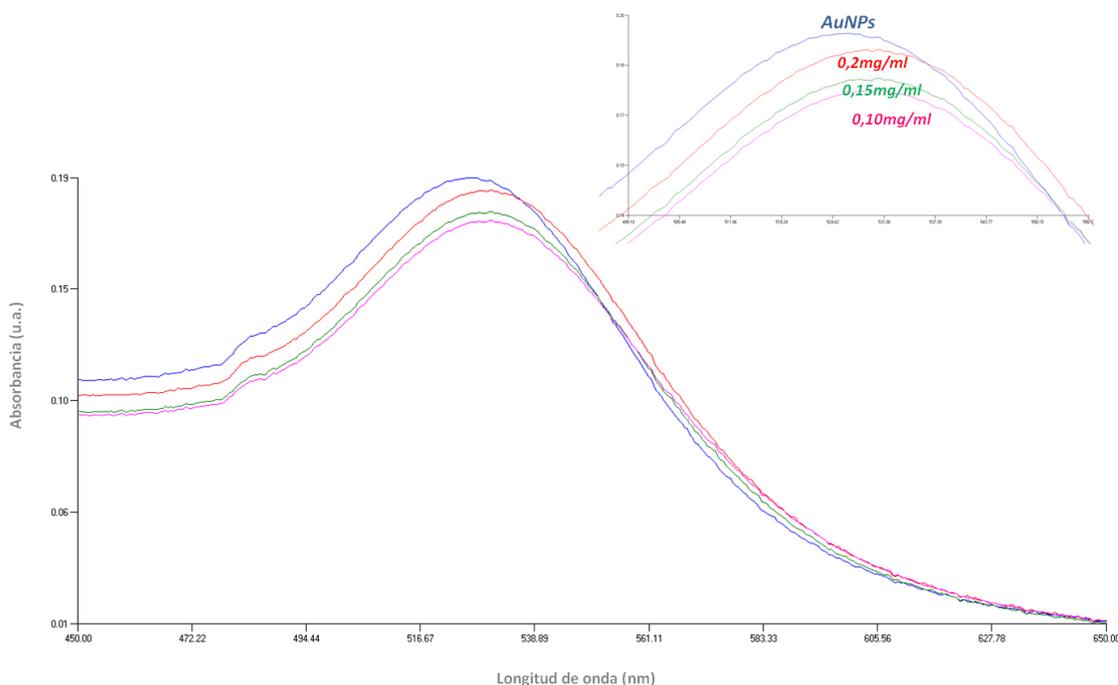


Fig.13. Conjunto de espectro UV/Vis correspondiente al ensayo de floculación empleado para conocer la cantidad mínima estabilizante de las nanopartículas de oro. En este caso el anticuerpo se encontraba disuelto en PBS 2 mM, pH 7.4, tras realizar una diálisis del Stock. Al disminuir la fuerza iónica se observa como 0.2 mg/mL estabiliza más que 0.15 mg/mL, y en general para las mismas concentraciones se obtienen mejores resultados de cuantificación. En el detalle superior se observa claramente el desplazamiento del SPR de 5nm de magnitud. De nuevo se observa el desplazamiento de la frecuencia del SPR.

En este caso se observa una diferencia entre las concentraciones de Ac de 0,15 mg/mL y 0,20 mg/mL, estabilizando las NPs más esta última concentración. Este resultado es debido a que como se observó en el ensayo del apartado 4.1.1 una menor fuerza iónica induce menor agregación, y por tanto permite que queden monodispersas más NPs que se estabilicen por Ac. Este hecho es importante, ya que la calidad del conjugado es un elemento esencial para alcanzar una elevada sensibilidad en los test LFIA (Holchleitner 2012; O'Farrell 2013). La presencia de agregados de NPs puede interferir en el flujo a través de la membrana, generando falsos positivos en la línea T al reaccionar con los reactivos de captura, o simplemente estancando al llegar a dicha zona (Millipore 2012).

La mayor estabilización de las AuNPs para una misma cantidad de Ac empleando PBS 2mM como buffer abala el resultado obtenido en el ensayo de la sección 4.1.1. El buffer de A óptimo para la bioconjugación de AuNPs es PBS 2 mM, pH 7.4. Respecto a la concentración de Ac a emplear, 0,20 mg/mL es aquella que ofrece los mejores resultados, estando dentro de los valores encontrados en la bibliografía (Choi, Lee et al. 2010; Ijeh 2011; Zhu, Zou et al. 2011).

4.1.4 Caracterización del bioconjugado y monitorización mediante Espectroscopía UV/Vis

Optimizadas las condiciones de la bioconjugación, ésta se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento detallado en la sección 3.2.4, de materiales y métodos. Para comprobar el éxito del proceso en su totalidad, y la posibilidad de monitorizar cada una de sus etapas, diferentes alícuotas al final de cada proceso fueron evaluadas mediante espectroscopía UV/Vis y *Dynamic Light Scattering* o DLS. Un correcto y controlado proceso de bioconjugación permitirá obtener resultados reproducibles, así como unos resultados satisfactorios en sus aplicaciones finales (Sapsford, Tyner et al. 2011).

En esta sección nos centraremos en el análisis mediante espectroscopía UV/Vis. Debido a la adsorción de las moléculas de los Ac sobre las nanopartículas gracias a las interacciones comentadas en secciones anteriores, la posición de la banda de SPR se desplaza hacia valores superiores, 5 nm aprox. (**figura 14**).

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas, como las de oro, dependen de numerosos factores que han sido citados en la sección de fundamentos teóricos. Sin embargo, es importante hacer hincapié en el medio que las rodea, que es la variable que se ve modificada en este caso.

De acuerdo a la teoría de Gustav Mie (Seydack 2005; Ijeh 2011), el coeficiente de extinción σ de una partícula con N electrones, y R radio se expresa según la **ecuación 4**:

$$\sigma_{ext} = \frac{24\pi NR^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon_2}{[\epsilon_1 + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2^2} \quad (4)$$

Donde λ es la longitud de onda de absorción en el SPR, ϵ_m es la constante dieléctrica del medio que rodea a la NP, y ϵ_1 y ϵ_2 son las partes real e imaginaria, respectivamente, de la función dieléctrica del material. Bajo esta relación se explica que cambios en el medio que rodean a la NP conllevan cambios en λ .

Esta es una explicación simplificada al desplazamiento del SPR de las AuNPs cuando se adsorben moléculas de Ac a su superficie, y su utilidad para comprobar la efectiva adsorción de las mismas.

Sin embargo, también explica la inexistencia de cambios tras el bloqueo con BSA. Al tratarse de una proteína en baja concentración, al igual que los anticuerpos, el índice de refracción del medio no cambia, al igual que no lo hace la constante dieléctrica, por lo que λ tampoco. Esto indica que esta técnica no resulta útil para conocer la eficacia del bloqueo correcto de la nanopartícula conjugada al Ac.

Por otra parte, gracias a la *Ley de Beer* (ecuación 1, *sección 3.2 de fundamentos teóricos*), podemos monitorizar la concentración de los conjugados y, por ejemplo, evaluar posibles pérdidas debidas a la adsorción a las paredes de los tubos o contenedores, o a pérdidas debidas al arrastre inintencionado de conjugado durante los procesos de lavado del pellet tras la centrifugación para la eliminación de exceso de reactivos.

En los espectros de la **figura 14**, las diferencias en absorbancia observadas son debidas a diferencias en la concentración de los conjugados como consecuencia de la preparación de la muestra a medir: se tomaba una alícuota pequeña (250 μ L) que se llevaba a un volumen final de 500 μ L con la finalidad de no gastar mucho conjugado y así no tener que hacer un volumen elevado, con el gasto económico que conlleva. Los diferentes volúmenes se midieron con diferentes micropipetas, añadiendo pequeños errores instrumentales.

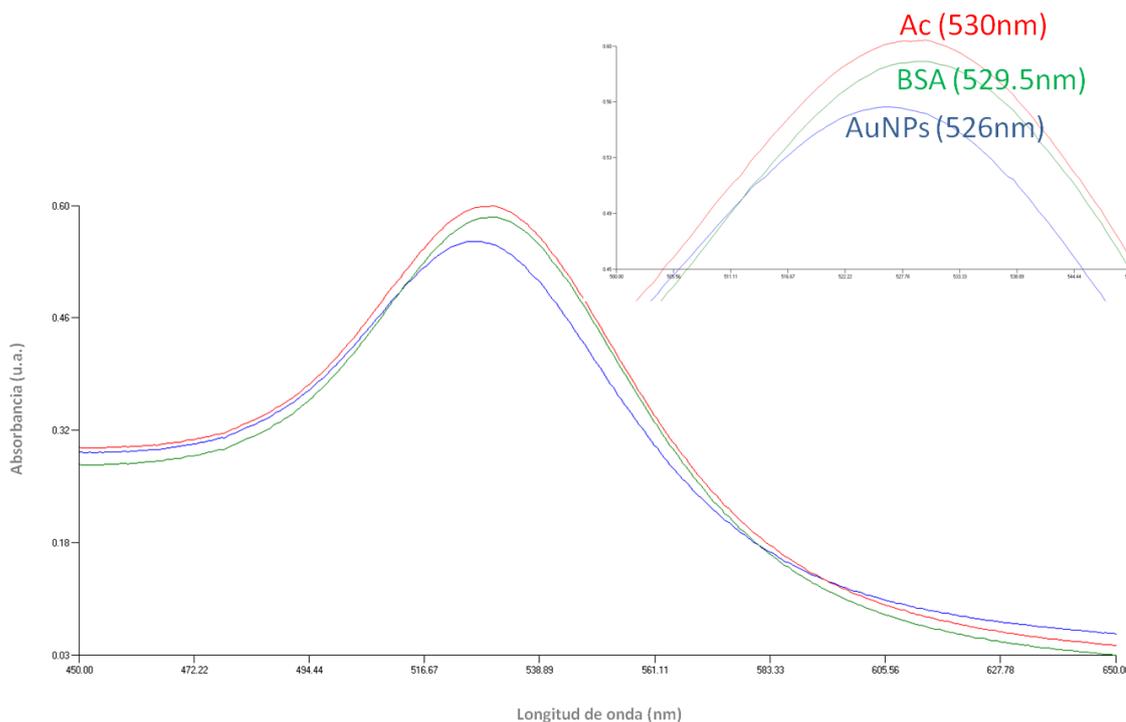


Fig.14. Espectros UV/Vis correspondientes a los tres productos del proceso de conjugación: nanopartículas desnudas (azul), nanopartículas recubiertas de anticuerpo (rojo), y nanopartículas bloqueadas con BSA (verde). Se observa el desplazamiento del SPR natural de las nanopartículas (526 nm) hacia longitudes de onda superior, fruto de la modificación del estado superficial de las mismas como producto de la adsorción de moléculas de Ac. El bloqueo posterior no produce más desplazamientos, por lo que no podemos intuir si se ha producido correctamente.

4.1.5 Caracterización del bioconjugado y monitorización mediante DLS: Radio hidrodinámico y ζ -Potential

En esta sección se comentan los resultados de la monitorización de la conjugación mediante la otra técnica mencionada: *Dynamic Light Scattering*. Al igual que en el caso anterior, esta técnica ha sido ampliamente usada para caracterizar bioconjugados (Jans, Liu et al. 2009; Sapsford, Tyner et al. 2011; Bell, Minelli et al. 2013).

Otra de las propiedades ópticas de las AuNPs, su capacidad de dispersión de la luz es empleada para medir el radio hidrodinámico de las NPs vía ecuación de Stokes-Einstein (ver fundamentos teóricos, sección 3.2.2).

El aumento experimentado en el radio hidrodinámico tras la conjugación del anticuerpo, de 45 nm (NPs desnudas) a 52,03 nm (con el Ac adsorbido), es consistente con observaciones realizadas por otros autores (Ijeh 2011; Bell, Minelli et al. 2013), y sirve de comprobación del éxito de la conjugación (**figura 15,A**).

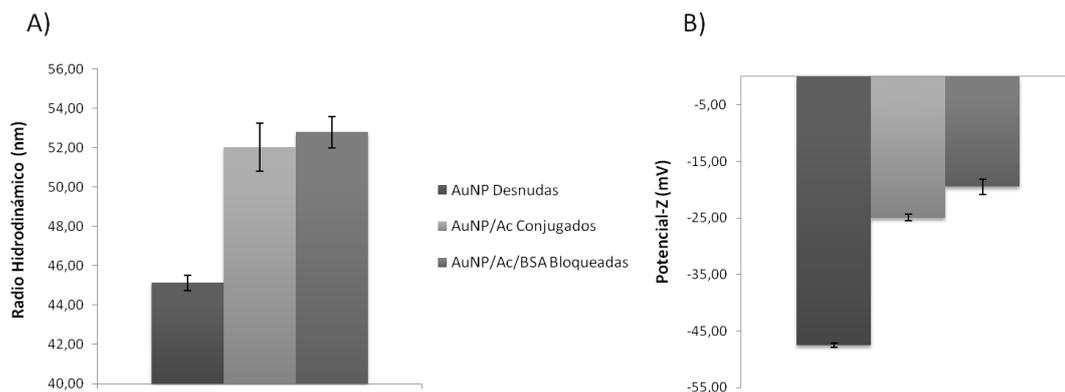


Fig.15. Monitorización mediante *Dynamic Light Scattering* de la bioconjugación del anticuerpo monoclonal (A6.12) Anti-cTnI a nanopartículas de Oro coloidal (40nm). (A) Tamaño (radio hidrodinámico, nm) de las nanopartículas desnudas, conjugadas a los anticuerpos y bloqueadas con BSA. (B) Carga (Potencial-Z, mV) de las mismas etapas de la conjugación.

La adsorción de proteínas sobre la superficie de la NP modifica el radio hidrodinámico con un incremento $2N$, siendo N el tamaño de la biomolécula (Jans, Liu et al. 2009). Algunos autores, entre ellos los anteriormente citados, han empleado este incremento como una medida de la posición que adquiere el anticuerpo sobre la NPs (Ijeh 2011; Bell, Minelli et al. 2013).

Con unas dimensiones aceptadas de 10nm de longitud, 7 nm de altura y 2 nm de anchura, las diferentes orientaciones del anticuerpo sobre la NPs generarán diferentes aumentos en el radio hidrodinámico. Un incremento de 3 nm aprox. como el observado en este trabajo, sugiere una orientación del anticuerpo sobre la NPS según la **figura 16**, en el que la biomolécula se adsorbe por uno de sus planos frontales (ligeramente inclinada con los parátomos hacia afuera), donde algunos autores mencionan se encuentra la mayor densidad de carga (Szymanski and Porter 2013). Postulamos que son con la parátomos hacia afuera, ya que es la región F_c la que favorece mayor número de interacciones hidrofóbicas.

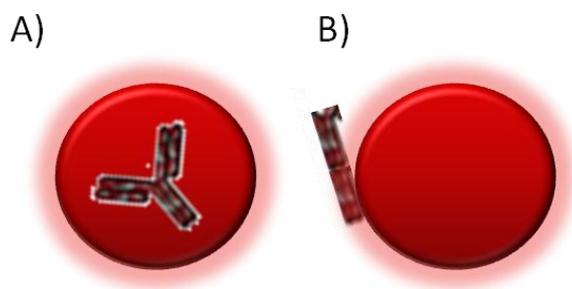


Fig.16. Posible orientación de las moléculas de Ac según los resultados obtenidos en el incremento del radio hidrodinámico mediante medidas con DLS, de aproximadamente 3nm. Según este incremento, el Ac se orienta con una de sus caras frontales hacia la superficie. (A) Vista frontal, (B) vista lateral.

Similares razonamientos fueron llevados a cabo para la determinación de la orientación de la Proteína A sobre AuNPs (Jans, Liu et al. 2009).

Posteriormente, el bloqueo con BSA de los huecos libres que deja el Ac produce un incremento de 1 nm en el radio hidrodinámico. Ya que la molécula es más pequeña, su contribución en el tamaño es despreciable. Sin embargo el incremento se debe al aumento de la hidratación de la capa de proteína al retener éstas más moléculas de solvente.

En cuanto a las modificaciones en el ζ -Potential (**figura 15,B**), un aumento en el tamaño hidrodinámico produce una disminución en la carga de las NPs, coherente con la adsorción de biomoléculas sobre su superficie (Sapsford, Tyner et al. 2011). Con un valor inicial de -46,5mV para NPs desnudas (confirmado como correcto con las especificaciones del fabricante), se pasa a un valor de -25 mV tras la adsorción de moléculas de Ac. Este valor es similar al encontrado en los trabajos de los ya citados autores Bell, Minelli *et al.* Aunque hay que tener en cuenta que cada proteína en cada tipo de buffer aportará una carga diferente en base a su secuencia de aminoácidos.

Posteriormente, el bloqueo con BSA neutraliza las cargas negativas superficiales libres, hasta llegar a un valor de -19 mV. Esta carga final del conjugado contribuye a la explicación a por qué no se puede mantener sin congelar, ya que acaba precipitando y los productores de LFIA deciden inmovilizarlo en el *Conjugate Pad*. Está aceptado que el umbral de potencial para mantener un estado monodisperso estable en disolución es -30mV (Dair, B.J et al. 2009 en Sapsford, Tyner et al. 2011), y que por debajo de él las partículas tienden a agregarse.

A pesar de poseer Ac en su superficie que evita su agregación instantánea, con el tiempo acaban agregando. Las fuerzas *de Van der Waals* implican también dipolos instantáneos en todas las moléculas, aunque sean polares. Esto causa agregación. De hecho es el motivo de que precipiten: la gravedad empieza a actuar y a vencer al empuje que mantiene las partículas en suspensión solo cuando los agregados son suficientemente grandes y con suficiente masa.

4.2 Diseño del Inmunoensayo de Flujo Lateral

Una vez se optimizaron las condiciones de síntesis del conjugado, éste se produjo en mayor cantidad según la metodología expuesta en la *sección 3.2.4 de materiales y métodos*, y se procedió a su empleo en el diseño de un LFIA para cTnI. Como se muestra en la **figura 10**, sección 2.4, una de las etapas iniciales en el diseño de un dispositivo LFIA es el diseño en sí del inmunoensayo, es decir, qué tipos de anticuerpos (monoclonal o policlonal) hay que escoger y que formato (competitivo o sándwich) deberá tener el ensayo.

En la mayoría de los casos donde se van a detectar analitos en el orden de ng/mL (como el caso de la troponina, ver *sección 1.3 de la introducción*), se prefiere el empleo de anticuerpo monoclonales, ya que el alto grado de afinidad es una de sus ventajas (Brown 2009). Esta característica tiene una elevada importancia en las tira de flujo lateral debido a la peculiaridad del sistema. Así como en otro tipo de inmunoensayos (p.e. un ELISA) los reactivos interaccionan entre sí en fase líquida durante cierto tiempo, en una tira el reactivo de captura permanece inmobilizado en una banda con un ancho aproximado de 0,5-1 mm sobre la que pasa el flujo con analito aproximadamente a una velocidad de 0,1-0,7 mm/s, lo que deja un total de 6 s de interacción, requiriendo por ello una alta afinidad del Ac (O`Farrell 2013).

Por otro lado, en el caso específico de la cTnI, se recomienda que el reactivo de detección sea un Ac dirigido a reconocer el péptido N-terminal específico, y que el de captura reconozca algún epítopo estable de la troponina, ya que ésta puede circular, oxidada, reducida, fosforilada etc. (Melanson, Tanasijevic et al. 2007). Puesto que nuestro grupo de investigación produce un anticuerpo monoclonal de alta afinidad que reconoce parte de la secuencia del péptido N-terminal (trabajo no publicado), se decidió escoger este Ac como elemento de detección siguiendo las indicaciones de Melanson et al., y seleccionar un Ac de captura comercial frente a un epítopo estable. Para ello se consultó la secuencia de a.a. de la cTnI (Takeda, Yamashita et al. 2003), y se seleccionó un par de anticuerpos de la casa comercial Hytest (Turku, Finlandia). Estas parejas de Ac, 9A6.12/560 y 9A6.12/19c7 se sometieron al test denominado *Half strip spotting method* (Fiechtner, 2009 en O`Farrell 2013). Este test consiste en inmovilizar un punto de reactivo de captura sobre una tira a la sin *Absorbent* y *Conjugate Pads*, dejando sólo el *Absorbent*. Esta tira se sumerge en un pocillo con disolución que contenga el conjugado y el analito, evaluando también blancos).

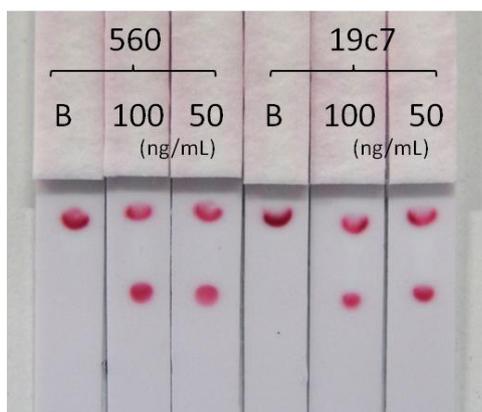


Fig.17. Test de elección del sistema de anticuerpos en formato Sándwich para la detección de cTnI en muestras de suero y sangre total humana para el diagnóstico de Infarto de miocardio mediante un test rápido basado en LFIA. Se representan un blanco, 100ng/mL y 50 ng/mL de cTnI empleando dos anticuerpos de captura comerciales (560, 19c7; Hytest, Turku, Finlandia) y AuNP/A6.12 como elemento de detección. Basado en el método *Half strip spotting*, Fiechtner, 2009.

Con en esta metodología se pretende evaluar la forma de los puntos una vez finalizado el test. El resultado para nuestros pares de Ac se muestra en la **figura 17**. En ambos casos se observa que los blancos no dan señal, lo cual es uno de los resultados buscados (ausencia de falsos positivos). Por otra parte se busca aquella pareja de Ac que genere, en presencia del analito, un punto intenso con un frente en forma de media luna marcado, señal de la alta afinidad del Ac (la alta afinidad hace que a pesar del flujo rápido, se deje menos Ag libre para las moléculas posteriores).

Realmente observamos que ambas parejas de anticuerpos se comportan de forma idéntica. No debe llevar a confusión el tamaño del punto, ya que éste depende de la reproducibilidad del pipeteado de los Ac a inmovilizar. Con estos resultados se optó por el Ac 560 como elemento de captura por ser el que reconoce una secuencia de a.a. más alejada de la reconocida por 9A6.12 e impedir posibles impedimentos estéricos, que no permitirían obtener señales a bajas concentraciones. El diseño final de inmunoensayo queda reflejado en la **figura 18**.

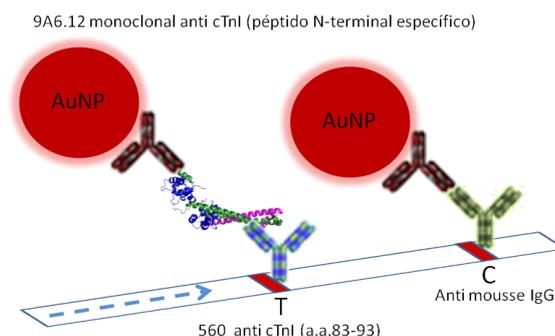


Fig.18. Diseño del inmunoensayo empleado en el presente trabajo. La línea Test está compuesta por Anti cTnI (*Hytest, Turku, Finland*) a una concentración 1mg/mL, mientras que la línea Control está formada por Anti-IgG de ratón (*Sigma Aldrich*) también a una concentración de 1mg/mL. Como reactivo de detección se emplea 9A6.12 (producción propia, en ratón) que reconoce parte de la secuencia del péptido N-terminal específico de la Troponina-I cardiaca. Este anticuerpo se encuentra conjugado a nanopartículas de oro (40nm, *BBI Solutions*). La flecha señala la dirección del flujo.

4.3 Funcionalidad y sensibilidad alcanzada mediante el empleo de AuNP como marca

Aunque es necesario obtener unas buenas condiciones de flujo para observar con claridad la formación de señales, como en el caso del test anteriormente citado, en esta sección se describe la optimización del buffer en el que se corren las tiras.

Inicialmente se probó a realizar el test en la tira con el analito (cTnI) en PBS 10 mM, pH 7,4, al que se le añadió el conjugado (15 μ L, por ser el volumen que se suele cargar en un *Conjugate Pad* (Blanco Covián 2013) y se dejaba reaccionar durante 4 min. Posteriormente se introducía la tira y se

esperaba obtener la señal 10 min tras el inicio. Pero lo que se observaba es que el conjugado no conseguía fluir más allá de 1 cm desde el inicio de la membrana (**figura 19**, izquierda).

Es más, se observa como las líneas con reactivo inmovilizado quedan como en negativo (blancas), indicando que el flujo en esa parte de la tira es diferente al resto. El perfil en forma de V y la línea blanca en negativo se debe a un problema en el cortado de las tiras.

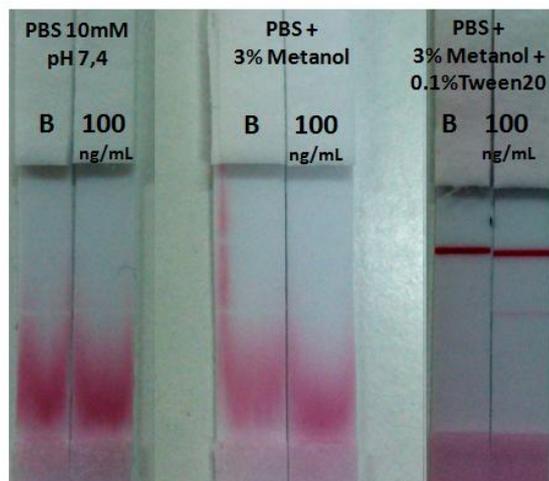


Fig.19. Optimización de la composición del *running buffer* para tiras de flujo lateral con Ac/AuNP como reactivo de detección. Nótese que es necesaria la adición de una pequeña cantidad (0.1%) de un agente surfactante como el Tween20 para que el conjugado fluya a través de la membrana. Las líneas en negativo (más blanco que el fondo) en los dos primeros conjuntos de tiras (izquierda y centro) se deben a la diferente capacidad de flujo en dichas zonas, fruto del desplazamiento del surfactante de la zona al inmovilizar los reactivos de captura.

Optimizado el buffer en el que se lleva a cabo el test, se llevó a cabo un calibrado, empleando para ello concentraciones de cTnI desde 1 ng/mL hasta 100 ng/mL (el máximo al que encuentran las alícuotas de trabajo). Tras montar las tiras como se indica en la sección 3.2.6 de material y métodos, previo al corte individual, se aplicaron los reactivos de captura con una máquina trazadora de líneas. Tras dejar secar en estufa y ser almacenadas, pudieron ser empleadas en los test de prueba.

El resultado final (una vez secas) se muestra en la **figura 20** (izquierda). Se observa la disminución de la intensidad de señal a medida que hay menos analito en la muestra. El problema surge cuando al secar, se observa lo que se ya se va intuyendo en fresco, una ligera señal en el blanco con la misma intensidad que en la concentración de 1 ng/mL, lo que hacía sospechar de un falso positivo.

Este hecho, que no se observaba en el test de prueba de los Ac se debe a las diferencias en cuanto a la aplicación del reactivo (en cuanto al volumen concretamente). Ya que mientras que en el punto hay 0,5 μ L, en la línea hay prácticamente el doble. El problema no proviene del volumen de reactivo en sí, si no de su composición.

Los anticuerpos eran disueltos desde el Stock comercial (5,5 mg/mL) a la concentración final de 1 mg/mL, la más frecuente en la literatura y la recomendada como concentración inicial (Holchleitner 2012; Millipore 2012), en PBS 10 mM. Como se ha comentado en la sección 2.4 *comprendiendo la plataforma analítica*, uno de los problemas en la línea T es la concentración de sales, que puede entorpecer el flujo al quedar como residuo seco; y los anticuerpos comerciales vienen en PBS 100 mM con 150 mM de NaCl, una elevada concentración en sales. Por otra parte, la fijación de reactivo desplaza el surfactante natural de la membrana, por lo que en conjunto, sales y desplazamiento de surfactante, crean un flujo diferente en el que el conjugado más tardío deja de fluir y se acumula en la zona generando una pequeña señal.

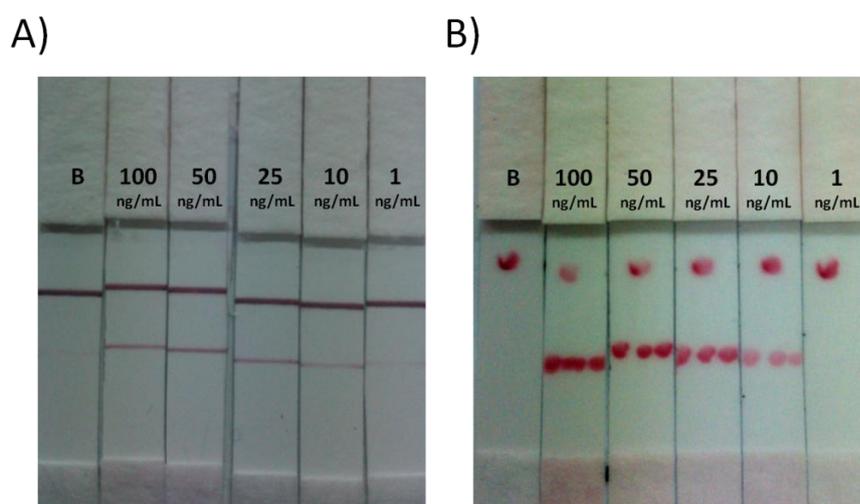


Fig.20. A) Aspecto de las tiras, una vez secas, de un calibrado de 1-100 ng/mL con el reactivo de captura inmovilizado preparado en buffer PBS 10 mM (pH 7.4). Se puede observar señal en el blanco, con la misma intensidad que 1 ng/mL, posiblemente debido a retención de oro tardío. B) Aspecto de las tiras, a los 10 minutos del inicio del test, de un calibrado 1-100 ng/mL con el reactivo de captura preparado en agua miliQ. La eliminación de las sales, y una pequeñísima cantidad de surfactante en el buffer del reactivo mejora la sensibilidad de la tira. Al secar no se observa señal en el blanco, ni tampoco en la concentración más baja.

Siguiendo los consejos de los fabricantes de componentes de LFIA (tras consultar el problema), se optimizó la aplicación de los reactivos diluyendo éstos en agua mili-Q, y añadiendo a la mezcla una pequeña cantidad de metanol (favorece la desecación y humectación) y una pequeña cantidad de surfactante para re-equilibrar las condiciones de flujo de la zona. Repitiendo el calibrado (**figura 20**, derecha), se observa que aumenta la intensidad de la señal y tras secar la tira, no se observaba la señal en el blanco, aun así, no fuimos capaces de observar señal proveniente de la concentración de 1 ng/mL, posiblemente debido a la pérdida del analito al tener que realizar diluciones intermedias desde el Stock.

Resumiendo todo lo expuesto anteriormente, respecto al uso AuNPs como marca, se consiguió optimizar las etapas de conjugación al anticuerpo, y observar los buenos resultados que pueden ser obtenidos con su empleo en LFIA para la detección de cTnI.

4.4 Síntesis y caracterización de Nanovesículas de nueva formulación: Transfersomas con colorantes artificiales

En la introducción se hacía mención a la problemática que existe en la implantación de los dispositivos POC en el mercado debido a que deben suponer una reducción del coste del análisis respecto a los test de laboratorio. Además, en los dispositivos LFIA la marca empleada para la detección supone el mayor coste, después de los Ac. La búsqueda de nuevos materiales puede conllevar no sólo la reducción del coste por análisis, si no también

En los dispositivos LFIA puede resultar atractivo el empleo de vesículas flexibles que resistan al paso a través de la membrana (de tamaño de poro entre 5-20 μm) sin romperse, ya que en el flujo de muestra no viajan solas.

La existencia de este tipo de vesículas flexibles, los transfersomas, suscitó nuestro interés por su empleo en tiras de flujo lateral como marca, ya que en el resto de características (a excepción de la estabilidad como se comentará más adelante) son similares a los liposomas convencionales (Uchegbu and Vyas 1998; Vinod, Kumar et al. 2012).

En este tipo de nanovesículas es frecuente el empleo de Fosfatidilcolina como fosfolípido de membrana, debido a su bajo coste (Gómez-Hens and Manuel Fernández-Romero 2005; Vinod, Kumar et al. 2012). En nuestro caso disponíamos de fosfatidilcolina de soja (Phospholipon90G, PL90) y un surfactante, Poligliceril-3 dioleato (Plurol Oleique), que había sido empleado para la síntesis de Niosomas (Pando, Caddeo et al. 2013) bajo una metodología conocida y optimizada.

Completando la composición de los transfersomas con colesterol como estabilizante de membrana, tal y como se comentó en la *sección 2.2 de fundamentos teóricos*, quedó establecida la formulación de los mismos que se recoge en la **tabla 7**.

Para las pruebas iniciales que se recogen en este trabajo, se decidió optar por una formulación de tipo 1:1:1 y evaluar las características morfológicas y funcionales que ofrece.

Tabla 7. Formulación de los transfersomas rellenos de colorantes artificiales para LFIA, y medios orgánico e hidrófilo de síntesis. Se detallan la naturaleza, función y cantidad pesada/medida que ha sido empleada en la síntesis.

Compuesto	Naturaleza	Función	Cantidad pesada/medida
PL90	Fosfolípido	Estructura	0.750g
Plurol Oleique	Surfactante	Estructura/Introducir elasticidad	0.750g
Colesterol	Lípido	Estabilizante	0.750g
PL-PEG-COOH	Lípido modificado	Funcionalizar el Ac	112µL
Metanol	Disolvente orgánico	Solubilizar lípidos	4mL
Cloroformo	Disolvente orgánico	Solubilizar lípidos y permitir la adición de los colorantes (en fase acuosa)	6mL
HEPES 10mM, pH 7.4	Disolución reguladora	Rehidratación de la capa fina de lípidos	50mL
Azul de metilo (MB)	Colorante artificial	Colorante	2mL
Sulforhodamina B (SRB)	Colorante artificial	Colorante	2mL

Para la funcionalización de las nanovesículas, se escogió la química de la *carbodiimida* para crear enlaces covalentes entre grupos -COOH y -NH₃ por ser los grupos amino un residuo fácilmente encontrable en los Ac sin que su empleo afecte a su funcionalidad (Rongen, Bult et al. 1997).

Para ello, se decidió emplear otro componente en la formulación, un fosfolípido modificado con polietilenglicol (1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxy(polietilenglicol)2000]) que introduce un grupo carboxilo terminal, y sirve como espaciador entre la superficie de la nanovesícula y el Ac, evitando impedimentos estéricos que afecten a la funcionalidad del conjugado.

Puesto que la detección colorimétrica ofrece ventajas como su bajo coste y requerimientos instrumentales simples (en el caso de detección visual ni siquiera se requieren), características que encajan con la demanda de las situaciones de análisis de un AMI, se escogieron dos colorantes que se habían empleado anteriormente en la síntesis de liposomas para dispositivos basados en flujo lateral (Ho and Wauchope 2002; Chen, Baeumner et al. 2005; Edwards and Baeumner 2006; Ho, Zeng et al. 2008; Liu and Boyd 2013).

El método escogido para la síntesis de los transfersomas fue el denominado *Thin film hydration method* (Baillie et al., 1995, en Rongen, Bult et al. 1997), que se clasifica dentro de los métodos mecánicos, por ser un método que ya había sido empleado por parte del grupo en trabajos anteriores (Pando, Caddeo et al. 2013; Pando, Beltrán et al. 2014).

El proceso completo de síntesis se encuentra detallado en la sección 3.2.7 de material y métodos. Puesto que este método produce MLVs con una gran heterogeneidad de tamaños, variando entre 100-1000 nm, se optó por añadir una secuencia de sonicaciones al final del proceso con el objetivo de

reducir y homogeneizar el tamaño de las nanovesículas (Rongen, Bult et al. 1997). Visualmente el proceso de síntesis se resume en la secuencia de imágenes que componen la **figura 21**.



Fig. 21. Proceso de síntesis de los transfersomas: (a) pesado de componentes, agitación y adición de colorante; (b) sonicación de la disolución; (c) eliminación de solventes orgánicos mediante evaporación en atmósfera reducida; (d) rehidratación, adición extra de colorante y agitación mecánica; (e) nueva sonicación con medición de tamaño y polidispersión (f) mediante DLS. Consultar material y métodos para conocer condiciones exactas de trabajo y equipos empleados.

4.4.1 Caracterización morfológica de las nanovesículas

Tras la síntesis (incluida la diálisis para eliminar el colorante no encapsulado), se llevó a cabo una primera caracterización de tamaño y polidispersibilidad (Poli-Dispersibility Index) mediante DLS que ofreció unos resultados aceptables, recogidos en la **tabla 8**.

El tamaño final fue de $196,3 \text{ nm} \pm 1$ (PDI $442,3 \pm 12$) para el caso de SRBnv y de $250 \text{ nm} \pm 3,86$ (PDI $435,04 \pm 14,5$) para el caso de MBnv. Estos valores de tamaño entran dentro del rango mencionado anteriormente para MLVs, sin embargo poseen una dispersión de tamaños alta a pesar de las secuencias de sonicación al final de la síntesis. Por otra parte, a pesar de emplear la misma formulación y metodología de síntesis rigurosamente controlada, existe una pequeña diferencia de tamaño entre ambos tipos de nanovesículas, siendo las de MB mayores que las de SRB.

Tabla 8. Características morfológicas de los transfersomas compuestos de PL90, Plurol Oleique y Colesterol (1:1:1) mediante Dynamic Light Scattering.

Tipo de Transfersoma	Relleno	Color	Tamaño final (nm)	ζ-Potential (mV)	Eficacia de Encapsulación
SRB-TRS	Sulforodamina B (150mM, en H ₂ O MQ)	Rosa Fucsia	$196,3 \pm 1$ PDI (442,3 ± 12)	$-24,5 \pm 0,45$	16
MB-TRS	Azul de Metilo (30mM, en H ₂ O MQ)	Azul Añil	$250 \pm 3,86$ PDI (435,04 ± 14,5)	$-21,8 \pm 0,82$	78

Por otro lado, son comparativamente similares a los producidos en trabajos consultados, cuyo rango de tamaño es de 230 nm (Ho and Wauchope 2002), 236nm (Ho, Zeng et al. 2008) y 315 nm (Edwards and Baeumner 2006), lo que hace aventurar posibles buenos resultados en las tiras.

En cuanto a la carga, poseen un ζ -Potential de $-24,5 \text{ mV} \pm 0,45$ (SRBnv) y $-21,8 \text{ mV} \pm 0,82$ (MBnv), lo que indica una cierta tendencia a la inestabilidad al estar dicho valor por debajo del límite de -30mV ya anteriormente comentado (*ver sección 4.1.5*). Esta tendencia se podría comprobar en el análisis de perfiles de dispersión de luz, comentado a continuación.

Dentro de las técnicas de caracterización de parámetros funcionales, como la estabilidad, se encuentra el análisis de perfiles de variación de la dispersión de luz (Δ BS profile analysis), frecuentemente empleado en estudios composiciones de liposomas (Pando, Caddeo et al. 2013; Pando, Beltrán et al. 2014). En este tipo de análisis se pueden observar fenómenos de floculación/coagulación (aumento de tamaño en la zona media), precipitación (aumento de BS en el fondo de la celda) y de cremado (aumento de BS en la zona superior de la celda).

20mL de la suspensión de NVs fueron introducidos en una celda para estudios de Δ BS, y se analizó la variación de la dispersión de luz a lo alto de la celda, tomando medidas cada 3 h durante una semana. Ambas suspensiones se comportaron de la misma forma, y gráficamente se puede observar la variación de los perfiles con el tiempo en la **figura 22**.

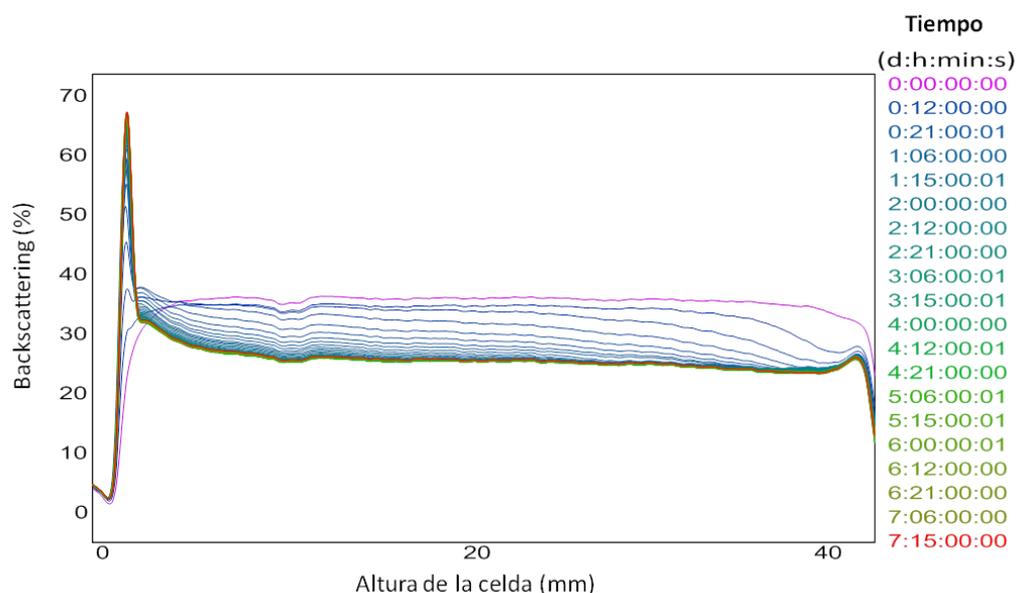


Fig. 22. Estudio de estabilidad de la suspensión de transfersomas (MBnv) a lo largo de una semana, midiendo el porcentaje de retrodispersión de luz (backscattering, %) de la luz a lo alto de una celda de 40 mm. 20 mL fueron empleados, y medidos con un equipo *Turbiscan Lab[®] Expert (Formulacion, France)*. En la zona central se observa una disminución de la retrodispersión, fruto de la acumulación en el fondo (aumento del backscattering) por fenómenos de sedimentación que se observa como un pico marcado.

Lo primero que llama la atención del estudio de perfiles es la presencia de un pico de retrodispersión en el fondo de la celda, que evidencia la presencia de fenómenos de precipitación, con la consiguiente disminución de la intensidad de luz dispersada en la zona media de la celda.

Este fenómeno se puede estudiar con profundidad con el cálculo de la velocidad de sedimentación a partir de las curvas de variación de la retrodispersión, gracias al software T_{lab} Expert (v.1.13). El resultado para nuestra suspensión de NVs se muestra en la **figura 23**. Se alcanza un máximo, de 83 $\mu\text{m}/\text{min}$ a las 12 h después de la síntesis, y se vuelve nula a las 27 h. Este cese de la migración de partículas se observa como una estabilización en la forma de los perfiles tras 1 día desde el inicio del análisis.

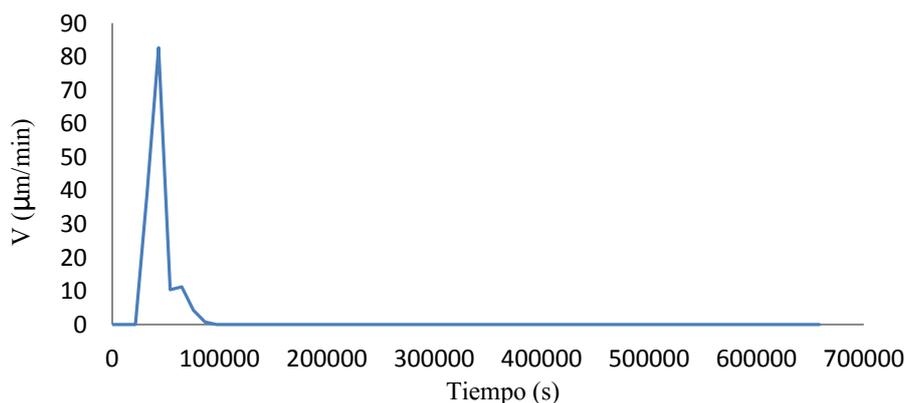


Fig. 23. Velocidad de sedimentación de las nanovesículas en la zona media de la celda, a lo largo de los 7 días en los que se evaluó la estabilidad. La velocidad máxima, 83 $\mu\text{m}/\text{min}$ alcanzada a las 12h tras la síntesis, se calculó mediante el software Tlab Epert v.1.13 a partir de las curvas de retrodispersión de la luz (backscattering) medidas con un equipo Turbiscan Lab® Expert (Formulation, France).

Una muestra tomada a los 5 días (de la zona media) y medida mediante DLS, reveló que efectivamente no se producen cambios en el tamaño medio de los transfersomas ($200 \text{ nm} \pm 1$ para SRBnv y $267 \text{ nm} \pm 4,5$ para MBnv), pero sí una disminución del PDI ($0,274 \pm 0,02$ para SRBnv y $0,250 \pm 0,030$ para MBnv) que muestra una distribución de tamaños más homogénea.

Esta mejora en la distribución de tamaños se debe a la sedimentación, que atribuimos a exceso de Plurol oleique en la formulación debido a su elevada densidad (y al aspecto blanquecino del precipitado). Un resultado similar fue observado por Pando et al. en un análisis de niosomas formados por Plurol y colesterol (Pando, Caddeo et al. 2013). Esto nos lleva a postular, que posibles optimizaciones de la formulación conlleven una disminución en la concentración de este compuesto.

Por otra parte, a pesar de la baja carga que poseen estos transfersomas, permanecen estables en suspensión, resultado que fue igualmente observado por Pando et. al para liposomas formados por PL90, con características morfológicas similares a estos transfersomas ($187 \text{ nm} \pm 5$, PDI 0.350 y ζ -Potential de $-18\text{mv} \pm 3$). Puesto que el Plurol oleique es un surfactante no iónico, no aporta carga al

transfersoma, por lo que una disminución de su concentración en la formulación conllevaría un aumento de la carga, y una mayor estabilidad.

La eficacia de encapsulación de los transfersomas también fue estudiada. Para ello se midió el área de pico de los compuestos encapsulados en los cromatogramas obtenidos por HPLC de fase reversa (*ver sección 3.2.8 de material y métodos*) con detección Óptica y de Fluorescencia. Esta metodología ya fue empleada en trabajos anteriormente citados y consultados (Gómez-Hens and Manuel Fernández-Romero 2005; Duangjit, Opanasopit et al. 2011; Pando, Caddeo et al. 2013; Pando, Beltrán et al. 2014).

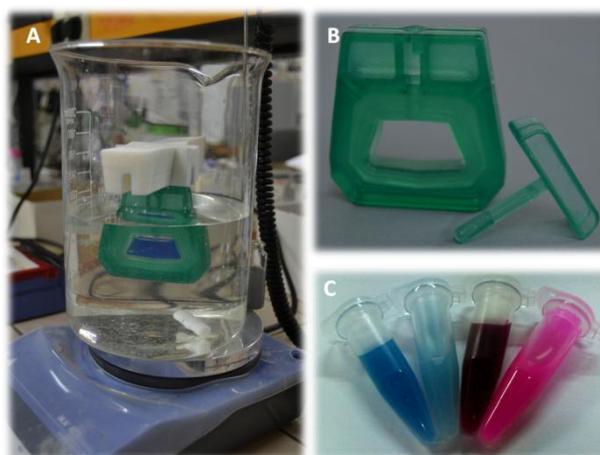


Fig. 24. A) Proceso de diálisis de las nanovesículas (MBnv en este caso) en un cartucho (B) Slide-A-Lyzer[®] Dialysis cassette 7000MWCO (*Thermo Scientific*). La cantidad máxima que admite son 4mL. C) Aspecto antes y después de la diálisis de las nanovesículas MBnv y SRBnv respectivamente.

Para ello este cálculo, la eficacia de encapsulación (EE, %) se calcula con la expresión que se muestra a continuación, donde A_D es el área de pico dializado y A_{SD} es el área de pico sin dializar (Edwards and Baumner 2006). El proceso y resultado de diálisis puede observarse en la **figura 24**.

$$EE = \frac{A_D}{A_{SD}} \times 100$$

Previo a la realización de las medidas, se pincharon dos patrones para conocer el T_r de los compuestos, midiendo por DAD y Fluorescencia, ésta última sólo para el caso de SRB. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Resultado de las cromatografías de los transfersomas dializados y no dializados mediante HPLC de fase reversa en columna C18 empleando Metanol/Agua como fases móviles.

Tipo de muestra	Detección	T _r del pico (min)	Área de pico
Patrón de SRB (150mM) 1:1000 en metanol	DAD	5,025	240,1
	Fluorescencia	5,074	1066,7
SRBnv no dializados lisados en metanol 1:10	DAD	5,399	113,4
	Fluorescencia	5,393	504,5
SRBnv dializados lisados en metanol 1:10	DAD	5,24	16,6
	Fluorescencia	5,196	79
Patrón de MB (30mM) 1:100 en metanol	DAD	3,803	1842,7
MBnv no dializados lisados en metanol 1:10	DAD	3,741	581,3
MBnv dializados lisados en metanol 1:10	DAD	3,691	456,80

Observamos una gran diferencia de EE entre ambos tipos de transfersomas, siendo la EE de las MBnv superior al de las SRBnv (78% frente a 16%). En el caso de la SRB, se obtiene el mismo resultado para las medidas de absorbancia y de fluorescencia, confirmando la calidad de las medidas.

Estos datos llamativos de EE se deben a la existencia de fenómenos de permeación (*leaking*) del contenido de la NVs, ya que con el almacenaje se observa que el color de las soluciones se intensifica como consecuencia de la salida del colorante desde el interior de las nanovesículas. Estos fenómenos se encuentran citados como una consecuencia del proceso de diálisis, mediante el cual, se crean gradientes de concentración entre el interior y el exterior de la nanovesícula (Rongen, Bult et al. 1997; Edwards and Baemner 2006).

Puesto que la SRB se encuentra a una concentración muy superior a la de MB, 150 mM frente a 30 mM, en las SRBnv se genera un gradiente superior, por lo tanto, una mayor pérdida durante el proceso diálisis respecto a las MBnv. Además, un mayor tamaño de los transfersomas de MB respecto a los de SRB explica que existan diferencias en cuanto a la encapsulación de ambos colorante, ya que al ser mayores también contienen una mayor cantidad de colorante.

Este problema se puede solucionar optimizando la formulación. Por ejemplo, el empleo de mayores concentraciones de colesterol y/o el empleo de fosfolípidos saturados, que permiten una mayor compactación de los mismos que genere membranas menos permeables (Rongen, Bult et al. 1997).

4.4.2 Funcionalización de las nanovesículas y evaluación de su funcionalidad en las tiras de flujo lateral

Una vez caracterizados los transfersomas, se procedió a probar su funcionalidad sobre las tiras. Para ello, se llevó a cabo su conjugación con el Ac 9A6.12 como en el caso de las AuNPs, para proceder con el mismo formato de inmunoensayo.

Puesto que los transfersomas se habían sintetizado añadiendo a la formulación un fosfolípido modificado con polietilenglicol con un grupo carboxilo terminal, se procedió a su activación mediante EDC/sulfo-NHS para posteriormente reaccionar con grupos amino de las moléculas de Ac.

Esta reacción se llevó a cabo bajo los consejos sugeridos para el empleo de este tipo de compuesto (Hermanson 2008). Con el uso de (sulfo)NHS se busca aumentar el rendimiento del proceso, ya que el carboxilo activado con EDC sufre en la mayoría de los casos una hidrólisis espontánea que revierte la activación. Este hecho se evita añadiendo (sulfo)NHS a la mezcla de activación, con la consiguiente formación de un éster de (sulfo)NHS que posee una mayor estabilidad a hidrólisis, y permite la formación de un enlace amida tal como lo hace el EDC. Por otra parte, puesto que los Ac poseen ambas funcionalidades, para evitar la formación de dímeros se recomienda realizar la reacción en dos fases: una de activación del carboxilo, y posteriormente la adición del otro componente a conjugar (con el grupo amino).

Debido a la reacción de los grupos amino, no es posible usar buffers aminados (como el TRIS). Por contrario, se aconseja emplear HEPES, PBS y MEM. El EDC funciona correctamente hasta pH 8.5, sin embargo, para mantener los transfersomas íntegros, se prefiere el empleo de los mismos en buffers de pH próximo al del medio en el que se sintetizaron, en nuestro caso HEPES 10 mM, pH 7,4.

De acuerdo al protocolo explicado en la *sección 3.2.7 de material y métodos*, se conjugaron transfersomas para una posterior evaluación en las tiras montadas tal cual se explica en la *sección 3.2.6*.

Para ello se empleó buffer PBS 10 mM, pH 7,4 (90 μ L/tira) en tubos *Eppendorff* al que se añadieron 10 μ L de solución de Transfersomas en el caso de los Blancos. Por otra parte, se prepararon tubos con PBS (80 μ L), la misma cantidad de muestra, pero se añadió 10 μ L de Troponina 1 μ g/mL para que quedase una concentración final de 100 ng/mL. Tras la preparación de las soluciones, se introdujeron las tiras en las mismas y se esperó 10 min para leer el resultado. Éste puede observarse de forma gráfica en la **figura 25**.

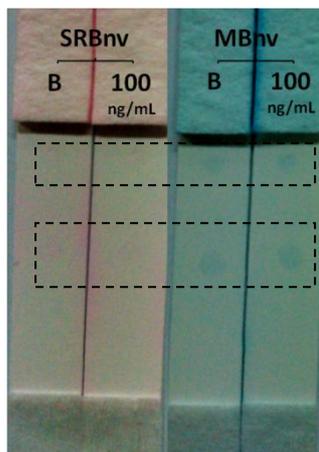


Fig. 25. Resultado visual de las pruebas de funcionalidad de los transfersomas SRBnv (izquierda) y MBnv (derecha) conjugados al Ac 9A6.12 mediante EDC/sulfo-NHS. Se indica si la tira es un Blanco o si se analiza una muestra de 100 ng/mL. Las áreas punteadas corresponden a las regiones donde se observa señal, en este caso tanto en los blancos como en presencia de cTnI.

Se observa una tenue señal de los transfersomas en ambos puntos, Test y Control, y a su vez tanto en los blancos como en presencia de muestra. Por los resultados obtenidos con AuNPs sabemos que no hay fenómenos de adsorciones inespecíficas que provoquen falsos positivos por reconocimiento mutuo de Ac, esto nos llevó a pensar a qué se podía deber estos falsos positivos. Se realizó un corrido de tiras, pero empleando transfersomas no conjugados, y se observó que no se produce señal.

En paralelo, se pensó que podía ser colorante no encapsulado que tiñese a los reactivos de captura, por lo que se corrieron tiras (Blancos y con muestra) con una disolución de colorantes a una concentración aproximada a la de los transfersomas, y de nuevo se volvió a obtener una respuesta negativa: no se observan los puntos.

Todos estos resultados nos llevan a pensar que el problema deriva de la conjugación, ya que únicamente cuando ésta se lleva a cabo, los transfersomas generan señal en las zonas de reactivos de captura. A día de hoy se sigue pensando una explicación a este hecho.

Por otro lado sabemos es que los transfersomas fluyen correctamente por la tira sin romperse ya que, de ser así, la intensidad de color durante el flujo a lo largo de la tira se vería acrecentada por la presencia de colorante no encapsulado. Posteriores trabajos tendrán como primer objetivo dar respuesta a esta reactividad de las nanovesículas conjugadas hacia los reactivos de las zonas de test y de control.

5. Conclusiones

Las siguientes conclusiones pueden ser postuladas en base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental recogido en esta memoria científica de Trabajo de Fin de Máster:

1. El estudio previo, y la posterior monitorización de los principales parámetros y etapas involucradas en el proceso de conjugación de nanopartículas de oro con anticuerpos como elemento de detección en dispositivos basados en Inmunoensayos de Flujo Lateral (LFIA), puede realizarse exitosamente mediante técnicas instrumentales.
 - La *espectroscopía UV/Vis* puede emplearse a la hora de conocer parámetros fundamentales como la sensibilidad de las nanopartículas a la fuerza iónica, y la cantidad mínima de anticuerpo que ha de emplearse en la conjugación.
 - Por otro lado, la técnica de *Isoelectroenfoque* ofrece resultados fiables sobre el Punto Isoeléctrico de los Anticuerpos.
 - En conjunto con ambas técnicas se pueden optimizar los tres parámetros fundamentales de la conjugación: Tipo de buffer y fuerza iónica, pH del buffer en el que se añadan los Anticuerpos y Concentración de anticuerpo.
 - Por último la técnica *Dynamic Light Scattering* puede ser empleada con éxito para monitorizar el proceso de conjugación.
2. Se ha diseñado un inmunoensayo de flujo lateral de tipo Sandwich para la detección del biomarcador de infarto cardiaco Troponina-I cardiaca, llegando a detectar 10 ng/mL empleando como elemento de detección nanopartículas de oro conjugadas a un anticuerpo monoclonal.
3. Se ha iniciado la investigación sobre nanovesículas de nueva formulación, como los transfersomas, como marca para Inmunoensayos de Flujo Lateral (LFIA) y ha producido sus primeros resultados, con los que se ha caracterizado morfológica y funcionalmente el producto de emplear una formulación 1:1:1 de PL90, Plurol Oleique y Colesterol. Mediante la química de la carbodiimida se consiguió conjugar los transfersomas a un anticuerpo monoclonal frente Troponina-I cardiaca. Trabajos futuros se centrarán en un primer lugar en la optimización del proceso de conjugación para evitar la reactividad del producto generado.

Bibliografía

- Azzazy, H. M. E. and R. H. Christenson (2002). "Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing?" Clinical Biochemistry **35**(1): 13-27.
- Bell, N. C., C. Minelli, et al. (2013). "Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement." Analytical Methods **5**(18): 4591-4601.
- Blanco Covián, L. (2013). Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de PSA. Departamento de Química Física y Analítica Oviedo, Universidad de Oviedo.
- Brown, M. C. (2009). Antibodies: key to a robust lateral flow immunoassay. Lateral Flow Immunoassay. R. C. Wong and H. Y. Tse. New York, Springer.
- Cruz, D. A., M. C. Rodríguez, et al. (2012). "Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda." Av. cien. ing. **3**(2): 67-78.
- Chen, C.-S., A. J. Baeumner, et al. (2005). "Protein G-liposomal nanovesicles as universal reagents for immunoassays." Talanta **67**: 205-211.
- Chin, C. D., V. Linder, et al. (2012). "Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices." Lab on a Chip **12**(12): 2118-2134.
- Choi, D. H., S. K. Lee, et al. (2010). "A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I." Biosens Bioelectron **25**(8): 1999-2002.
- de la Escosura-Muñiz, A., C. Parolo, et al. (2010). "Immunosensing using nanoparticles." Materials Today **13**(7-8): 24-34.
- Duangjit, S., P. Opanasopit, et al. (2011). "Characterization and in vivo skin permeation of meloxicam-loaded liposomes versus transfersomes." Journal of drug delivery **2011**(1): 1-9.
- Edwards, K. A. and A. J. Baeumner (2006). "Analysis of liposomes." Talanta **68**(5): 1432-1441.
- Edwards, K. A. and A. J. Baeumner (2006). "Liposomes in analyses." Talanta **68**(5): 1421-1431.
- Edwards, K. A. and A. J. Baeumner (2006). "Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridation." Anal Bioanal Chem **386**: 1335-1343.
- Gómez-Hens, A. and J. Manuel Fernández-Romero (2005). "The role of liposomes in analytical processes." TrAC Trends in Analytical Chemistry **24**(1): 9-19.

- Goryacheva, I. Y., P. Lenain, et al. (2013). "Nanosized labels for rapid immunotests." TrAC Trends in Analytical Chemistry **46**(0): 30-43.
- Gubala, V., L. F. Harris, et al. (2011). "Point of Care Diagnostics: Status and Future." Analytical Chemistry **84**(2): 487-515.
- Hermanson, G. T. (2008). Microparticles and nanoparticles. Bioconjugate Techniques. USA, Academic Press. Elsevier.
- Hermanson, G. T. (2008). Preparation of colloidal gold-labeled proteins. Bioconjugate Techniques. USA, Academic Press. Elsevier.
- Ho, J. A. A. and R. D. Wauchope (2002). "A strip liposome immunoassay for Aflatoxin B1." Analytical Chemistry **74**(7): 1493-1496.
- Ho, J. A. A., S.-C. Zeng, et al. (2008). "Liposome-based immunostrip for the rapid detection of Salmonella." Anal Bioanal Chem **391**: 479-485.
- Holchleitner, K. (2012). Lateral Flow rapid tests: material selection, material properties and basic troubleshooting. Webminar disponible on-line consultado el 25/11/2013, Innova Biosciences ltd. .
- Ijeh, M. (2011). Covalent gold nanoparticle-antibody conjugates for sensitivity improvement in LFIA. Mathematics, Informatics and Natural Sciences Faculty. Hamburgo, Hamburg University.
- Jans, H., X. Liu, et al. (2009). "Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies." Analytical Chemistry **81**(22): 9425-9432.
- Linares, E. M., L. T. Kubota, et al. (2012). "Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates." J Immunol Methods **375**(1-2): 264-270.
- Liu, Q. and B. J. Boyd (2013). "Liposomes in biosensors." Analyst **138**(1): 391-409.
- Ljungblad, J. (2009). Antibody-conjugated Gold Nanoparticles integrated in a Fluorescence based Biochip. Department of Physics, Chemistry and Biology. Linköping, Linköping Universitet.
- Mansfield, M. A. (2009). Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays: A Technical Treatise. Lateral Flow Immunoassay. R. C. Wong and H. Y. Tse. New York, Springer.
- McDonnell, B., S. Hearty, et al. (2009). "Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing." Clinical Biochemistry **42**(7-8): 549-561.

- Melanson, S. E., M. J. Tanasijevic, et al. (2007). "Cardiac troponin assays: a view from the clinical chemistry laboratory." Circulation **116**(18): e501-504.
- Millipore, C. (2012). Rapid Lateral flow test strips. Considerations for product development. M. Corporation. Billerica, USA.
- O'Farrell, B. (2009). Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. Lateral Flow Immunoassay. R. C. Wong and H. Y. Tse. New York, Springer.
- O'Farrell, B. (2013). Lateral Flow Immunoassay systems: evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. The immunoassay handbook. D. Wild, Elsevier Science.
- Ordóñez Llanos, J. (2009). Métodos de alta sensibilidad para la medida de troponinas cardíacas. III Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, Valencia.
- Pando, D., C. Caddeo, et al. (2013). "Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol." Journal of Pharmacy and Pharmacology **65**(8): 1158-1167.
- Posthuma-Trumpie, G., J. Korf, et al. (2009). "Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey." Analytical and Bioanalytical Chemistry **393**(2): 569-582.
- Qian, S. and H. H. Bau (2004). "Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format." Anal Biochem **326**(2): 211-224.
- Regueiro González, J. R., C. López Larrea, et al. (2005). Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune. Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Rongen, H. A. H., A. Bult, et al. (1997). "Liposomes and immunoassays." Journal of Immunological Methods **204**(2): 105-133.
- Rosen, S. (2009). Market Trends in Lateral Flow Immunoassays. Lateral Flow Immunoassay. R. C. Wong and H. Y. Tse. New York, Springer.
- Ryu, Y., Z. Jin, et al. (2011). "Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody." BioChip Journal **5**(3): 193-198.
- Sapsford, K. E., K. M. Tyner, et al. (2011). "Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques." Analytical Chemistry **83**(12): 4453-4488.
- Seydack, M. (2005). "Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods." Biosensors and Bioelectronics **20**(12): 2454-2469.

- Szymanski, M. S. and R. A. Porter (2013). "Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays." Journal of Immunological Methods **387**(1–2): 262-269.
- Takeda, S., A. Yamashita, et al. (2003). "Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form." Nature **424**(6944): 35-41.
- Tangri, P. and S. Khurana (2011). "Niosomes: formulation and evaluation." International Journal of Biopharmaceutics **2**(1): 47-53.
- Uchegbu, I. F. and S. P. Vyas (1998). "Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **172**(1–2): 33-70.
- Wangoo, N., K. K. Bhasin, et al. (2008). "Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies." Journal of Colloid and Interface Science **323**(2): 247-254.
- Xu, Q., H. Xu, et al. (2009). "Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I." Materials Science and Engineering: C **29**(3): 702-707.
- Zhu, J., N. Zou, et al. (2011). "Simultaneous detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin by modified sandwich lateral flow immunoassay: proof of principle." Clin Chem **57**(12): 1732-1738.