

ANÁLISIS DE MARCADORES CARDIOPÁTICOS MEDIANTE MARCAJE MAGNÉTICO

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD

María Salvador Fernández

DEPARTAMENTO DE FÍSICA/DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Dña. MARÍA DEL CARMEN BLANCO LÓPEZ, profesora titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, y codirectora del grupo de investigación de “Nanovesículas y Bioanálisis”, y Dña. MONTSERRAT RIVAS ARDISANA, profesora titular del Departamento de Física de la misma universidad,

CERTIFICAN: que MARÍA SALVADOR, ingeniera química y estudiante del Máster de Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud de la Universidad de Oviedo, ha realizado en sus laboratorios de investigación y bajo su supervisión el Trabajo de Fin de Master titulado ANÁLISIS DE MARCADORES CARDIOPÁTICOS MEDIANTE MARCAJE MAGNÉTICO y que el mismo tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe a tal efecto.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Oviedo a 14 de julio de 2016.

Handwritten signature of Carmen Blanco in blue ink, underlined.

Fdo. Dra. María del Carmen Blanco López

Handwritten signature of Montserrat Rivas Ardisana in blue ink, underlined.

Fdo. Dra. Montserrat Rivas Ardisana

Resumen

Actualmente, la troponina es considerada como la mejor opción a la hora de seleccionar un biomarcador que indique el daño cardíaco gracias a su alta cardioespecificidad. Esta proteína es un complejo de tres unidades, de las que las troponina I (cTnI) o T (cTnT) son indistintamente medidas en los pacientes que acuden a la sala de urgencias con síntomas de infarto para confirmar el daño cardíaco. Dado que en este tipo de casos, el tiempo es factor crucial para un correcto diagnóstico y tratamiento del paciente, son necesarios métodos que no sólo permitan detectar sino también cuantificar estos marcadores, cumpliendo además características como rapidez y fácil manejo. En este trabajo se propone un inmunoensayo en tiras de flujo lateral con marcaje magnético para la cuantificación de la cTnI. Se recubren nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) con un anticuerpo específico contra cTnI, que junto con otro anticuerpo también específico depositado en la membrana de la tira permitirá obtener un ensayo tipo sándwich. Cuando la muestra sube por la tira, el anticuerpo conjugado a las SPIONs marcadas es retenido en la línea de test, permitiendo obtener una señal óptica y magnética. La cantidad de cTnI presente es evaluada mediante un sensor basado en la variación de impedancia que provocan las SPIONs ahí retenidas. Esta cuantificación fue validada mediante la comparación de la misma con las medidas de reflectancia óptica.

Abstract

Troponin is nowadays considered the best choice as biomarker for the detection of cardiac injury due to its high specificity. From the 3-unit troponin complex, either troponin I (cTnI) or T (cTnT) are measured in patients with coronary symptoms to disclose myocardial damage. Since time is crucial for the correct diagnosis and treatment, fast, user-friendly and specific sensing methods to, not only detect, but quantify such biomarkers are highly desired for first responder and point-of-care use. In this work, an immunomagnetic lateral flow sensor is proposed for cTnI quantification. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were coated with a specific monoclonal antibody which targets cTnI. A sandwich-type immunoassay was prepared by printing a second anti-troponin antibody onto a nitrocellulose membrane strip. When the sample flows along the strip, the SPION-labelled proteins are immobilized at the test line, which provides both optical and magnetic signals. The amount of cTnI was then evaluated by an *ad hoc* impedance-based sensor which is sensitive to the SPIONs there withheld. The magnetic quantification was validated by optical reflectance measurements.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Enfermedades cardiovasculares	2
1.1.1. Biomarcadores cardiopáticos	5
1.2. Dispositivos ' <i>point of care</i> '	10
1.2.1. Tiras de Flujo Lateral	10
1.3. NPSensor: principios magnéticos y funcionamiento	14
2. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. METODOLOGÍA DE TRABAJO	17
3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro	17
i. Síntesis de Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	17
ii. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas	18
3.2. Desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral para la detección de troponina I	18
i. Montaje de las tiras de flujo lateral	18
ii. Deposición de las líneas de test y control en las tiras de flujo lateral	19
iii. Funcionamiento de las tiras de flujo lateral	19
iv. Validación del inmunoensayo con nanopartículas de oro	20
v. Desarrollo y optimización del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas ..	22
3.3. Cuantificación de la troponina mediante el NPSensor	26
i. Obtención de la curva de calibrado de las nanopartículas magnéticas	26
ii. Cuantificación de las tiras de flujo lateral	27
3.4. Comparación de las medidas magnéticas con medidas de reflectancia	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro	29
➤ Tamaño y morfología de las partículas	29
➤ Concentración de nanopartículas	31
➤ Grupos funcionales. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier	32
➤ Magnetización y susceptibilidad magnética	33
4.2. Desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral para la detección de troponina I	34
i. Desarrollo del inmunoensayo con nanopartículas de oro	34
ii. Desarrollo y optimización del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas ..	35
4.3. Cuantificación de la troponina mediante el NPSensor	42
i. Obtención de la curva de calibrado de las nanopartículas magnéticas	42

ii. Cuantificación de las tiras de flujo lateral	43
4.4. Comparación de las medidas magnéticas con medidas de reflectancia	47
5. CONCLUSIONES.....	49
6. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	50
7. BIBLIOGRAFÍA	1
Agradecimientos.....	1

1. INTRODUCCIÓN

El considerable avance de las técnicas bioquímicas en los últimos años ha hecho que tanto la detección como la cuantificación de diversas y diferentes entidades biológicas, como virus, bacterias o proteínas, sea de especial interés. La detección rápida y precisa de estas se convierte en una característica esencial de los nuevos métodos y técnicas que se desarrollan, así como que se lleven a cabo con la mayor simplicidad posible y a un coste asumible. Determinante dentro de todo esto es el tiempo necesario para el análisis, ya que de tratarse de un problema de salud o medioambiental es necesario actuar lo antes posible.

Surgen de esta forma los dispositivos denominados ‘*point of care*’, que cumplen todas las características mencionadas anteriormente, y que además, continúan con la tendencia de simplificación y miniaturización de los equipos y/o sus elementos, que permite un manejo mucho más sencillo y sin personal cualificado, y que incluso los hace portátiles en determinados casos.

1.1. Enfermedades cardiovasculares

El corazón es el músculo más importante del cuerpo humano, responsable del bombeo de la sangre que transporta el oxígeno y los nutrientes necesarios a todas las células del mismo. Estos elementos, que también son esenciales para el propio corazón, los recibe gracias a un sistema de arterias coronarias, cuyo funcionamiento es, por tanto, vital.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos que afectan tanto al corazón como a los vasos sanguíneos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV son la primera causa de mortalidad en el mundo, responsables de alrededor de 17,3 millones de defunciones al año [1], el doble de lo que sumaron conjuntamente los fallecimientos por cáncer y más que los provocados por todas las enfermedades transmisibles (ET), maternas, neonatales y desórdenes nutricionales juntos [2]. Además, las previsiones apuntan a un aumento constante hasta alcanzar casi los 24 millones de fallecidos en 2030 [3]. La clasificación de las ECV se muestra en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades cardiovasculares.

ECV debido a arterosclerosis	Otras ECV
- Cardiopatías isquémicas o enfermedades de las arterias coronarias	- Enfermedades cardíacas congénitas
- Enfermedades cerebrovasculares (Ictus)	- Cardiopatías reumáticas
	- Cardiomiopatías

- Enfermedades de la aorta y arterias, incluyendo hipertensión y enfermedad vascular periférica	- Arritmias cardiacas
---	-----------------------

La arterosclerosis es el proceso de deposición de diferentes compuestos como grasas, colesterol o calcio [4] que ocurre en los vasos sanguíneos y que va dificultando el paso de la sangre a medida que la placa depositada aumenta y se endurece, pudiendo ocasionar si se llega a desprender y forma coágulos, problemas graves como ataques cardiacos, accidentes cerebrovasculares e incluso la muerte. De los más de 17 millones de muerte debidas a las ECV, los ataques al corazón son responsables de 7,3 millones, mientras que los accidentes cardiovasculares lo son de 6,2 millones de muertes [5]. Hay diferentes factores de riesgo que aumentan las probabilidades de sufrir arterosclerosis, unos relacionados con el estilo de vida, como tabaco y alcohol, sedentarismo, dieta rica en grasas y sal, otros con desórdenes metabólicos, como la hipertensión, la diabetes, el colesterol y el sobrepeso, y otro tipo de factores de riesgo, como el estatus social, el género, la edad avanzada, factores genéticos, estrés o depresión [5-7].

Aunque las últimas décadas hayan supuesto un avance enorme en la calidad de vida y mejoras importantes en aspectos de salud, todas las sociedades mundiales han vivido, o se encuentran en pleno proceso, lo que en 1971 se denominó como la ‘transición epidemiológica’ [8]. La salud humana ha estado históricamente ligada al nivel de desarrollo social y económico. Fue con la industrialización con la que las principales causas de muerte e incapacidad pasaron de ser problemas nutricionales y enfermedades infecciosas a aquellas enfermedades clasificadas como degenerativas o ‘*man-made*’, ligadas muchas de ellas al estilo de vida moderno, como el cáncer, la diabetes y las ECV.

En la **Figura 1** se puede observar un mapa con la distribución global de la mortalidad de las ECV por 100.000 habitantes. Como puede comprobarse, la incidencia de estas enfermedades es mucho mayor en los países en desarrollo que en los países desarrollados, y es que más del 80% de las muertes relacionadas con sucesos cardiovasculares ocurren en países con índices de ingresos bajos y medios, y a una edad más temprana que en aquellos con índices de ingresos mayores [9]. Es quizás una rápida globalización, industrialización y urbanización, y por ende, una mayor exposición a los factores de riesgo mencionados anteriormente, junto con ciertas predisposiciones genotípicas y

fenotípicas así como las limitaciones económicas locales (Figura 2) lo que provoca que las ECV sean una epidemia a la que no se está prestando la atención requerida en los países subdesarrollados [10]. Se prevé además hasta el año 2020, un aumento de la mortalidad por enfermedad isquémica del corazón del 120% en mujeres y del 137% en hombres de países en desarrollo, alcanzando solo valores de 29% y 48% respectivamente para países desarrollados [6], y lo que es peor, estas proyecciones se basan únicamente en cambios demográficos y no en mayores exposiciones a los factores de riesgo, por lo que probablemente sus valores estén subestimados.

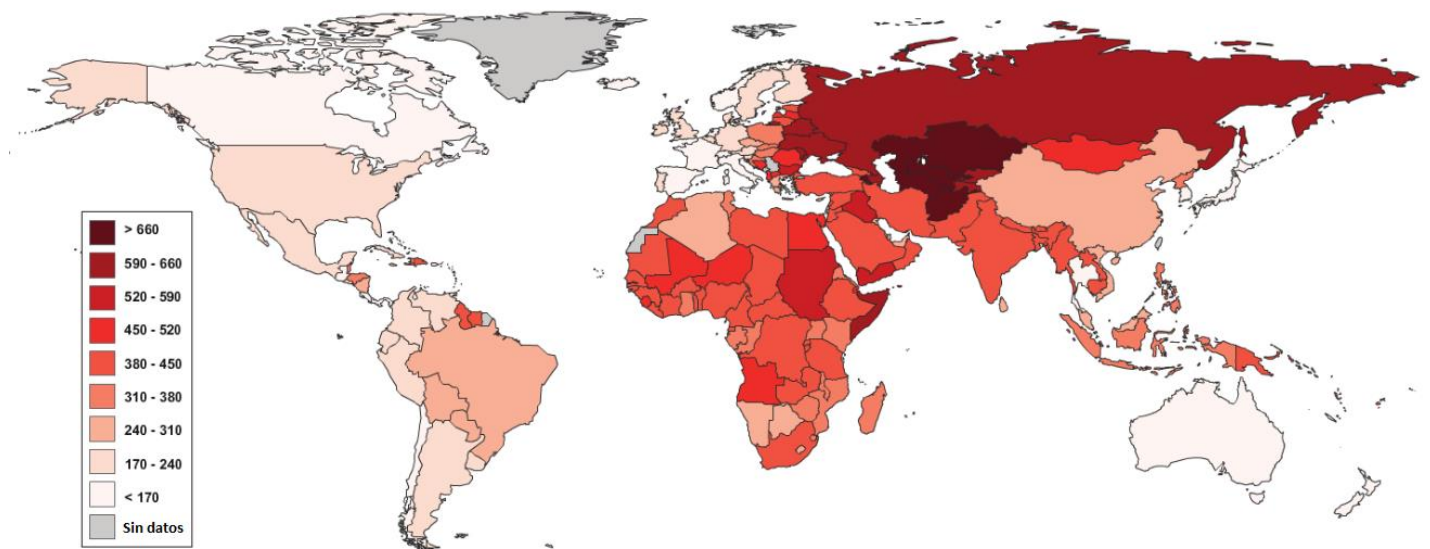


Figura 1. Mapa global de las muertes debidas a las enfermedades cardiovasculares (edad estandarizada, por 100.000 habitantes). Adaptado de [11]

Los costes tanto médicos como socioeconómicos que conllevan las ECV son elevados, y más cuando se atiende a los países subdesarrollados, donde la mayoría de las muertes se producen en individuos en edades jóvenes con una vida laboral activa. Según datos recogidos en un informe publicado por el Foro Mundial Económico en colaboración con la Escuela Harvard de Salud Pública [12], donde se tienen en cuenta los costes asociados con la detección sistemática, la prevención primaria y secundaria, los cuidados hospitalarios y la pérdida de productividad, se obtuvo un coste global de las ECV en 2010 de 863 billones de dólares, que aumentarán hasta los 1.044 billones en 2030. En el gasto actual, el 50% se asocia al gasto médico directo, mientras que el 45% restante a las pérdidas productivas ya sea por muerte o baja temporal.

A la vista de estos datos, surge la necesidad de actuar en diferentes frentes y con diferentes objetivos, que sean capaces de reducir el impacto que las ECV tienen en toda la sociedad. La OMS propone tres pilares en esta lucha, que son la vigilancia epidemiológica, la reducción de la exposición a los factores de riesgo y una atención sanitaria equitativa para las personas que sufren ya de ECV.

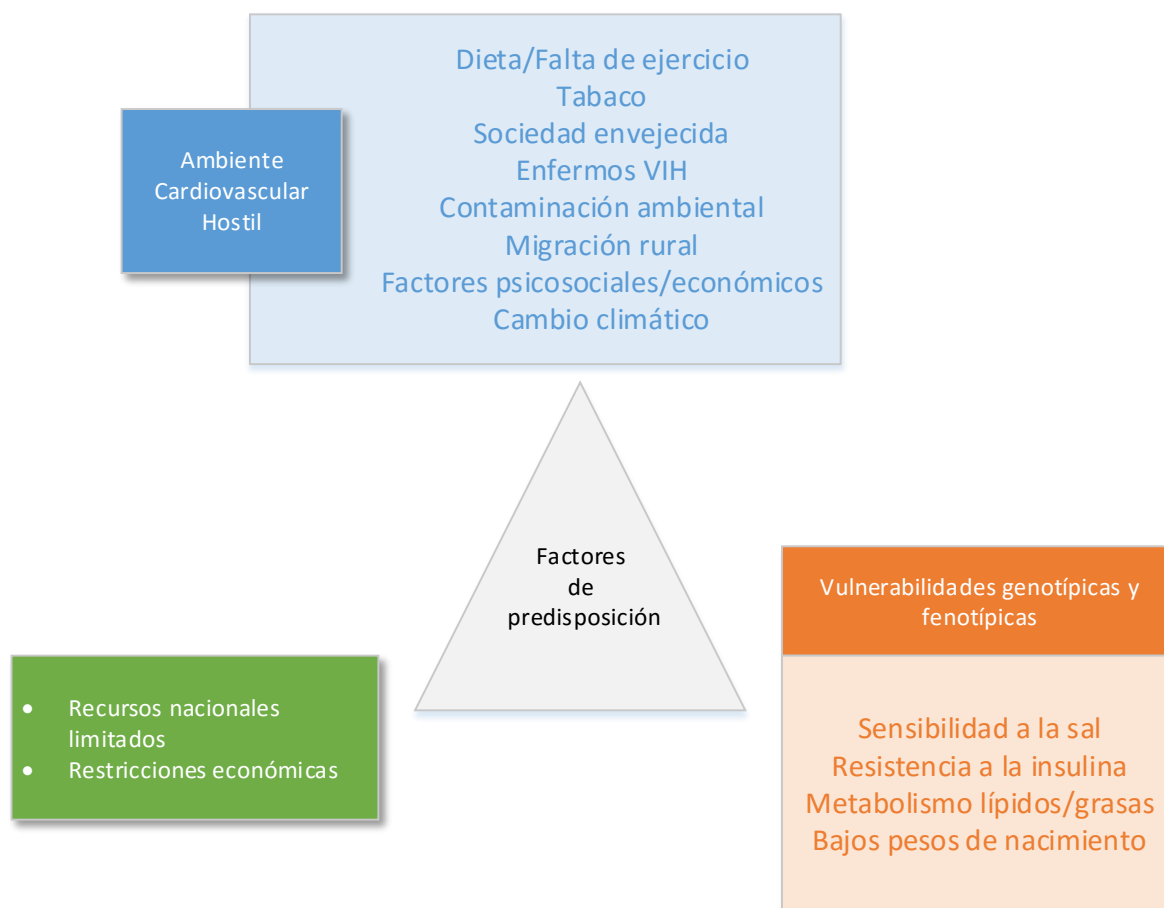


Figura 2. Factores que contribuyen a la epidemia de las ECV en países con bajos y medios ingresos. Adaptado de [9].

1.1.1. Biomarcadores cardiopáticos

Existen muchas definiciones para los marcadores biológicos, comúnmente denominados biomarcadores, aunque todas ellas suelen solaparse. La OMS en colaboración con Naciones Unidas (UN) y la Organización Internacional del Trabajo (OIT) definieron los biomarcadores como cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo humano o cualquiera de sus productos que influye o predice la incidencia y/o el curso de una enfermedad [13].

El infarto de miocardio y los accidentes cerebrovasculares son las enfermedades cardiacas con más prevalencia y ratio de mortalidad, como ya se mencionó anteriormente. La Asociación Europea de Cardiología (AEC), la fundación del Colegio Americano de Cardiología (CAC), la Asociación Americana del Corazón (AAC) y la Federación Mundial del Corazón (FMC) recogen en el documento denominado ‘Tercera definición Universal del Infarto de Miocardio’ [14] que dicha condición se produce cuando hay una privación prolongada e irreversible de oxígeno en el miocardio (tejido muscular del corazón) debida a la reducción del flujo sanguíneo, provocando la muerte celular y la necrosis del tejido. Este suceso puede presentarse como una primera manifestación de enfermedad coronaria o repetidamente en pacientes con la enfermedad ya establecida.

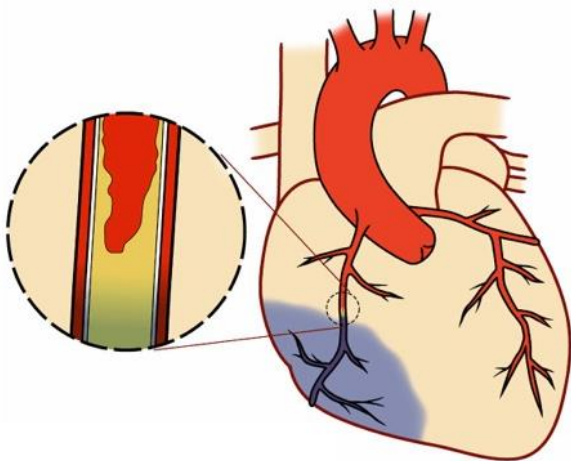


Figura 3. Dibujo representativo del infarto de miocardio, donde se puede observar la placa que dificulta el correcto flujo sanguíneo y el tejido de miocardio dañado, coloreado en morado.

El diagnóstico de un infarto de miocardio se ha basado normalmente en la ocurrencia simultánea del dolor de pecho que presentaba el paciente, los electrocardiogramas que se le realizaban a su llegada al hospital y la elevación de determinados marcadores cardiacos. Sin embargo, no siempre el dolor de pecho se presenta como síntoma y los cambios que se producen en los electrocardiogramas pueden ser también poco concluyentes [15], por lo que el uso de biomarcadores como herramientas de diagnóstico del daño cardiaco ha cobrado mucho interés en las últimas décadas. Además, no solamente pueden utilizarse como diagnóstico, sino que también tienen otras finalidades, como la del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, clasificación de la severidad o como evaluadores del pronóstico de la misma, prediciendo posibles recurrencias, la respuesta a la terapia aplicada y/o la monitorización de la misma [16].

La investigación en biomarcadores de enfermedad cardiaca comenzó su desarrollo cuando en 1954 se publicó el primer estudio en el que se demostraba que una enzima denominada aspartato transaminasa (AST) se encontraba por encima del rango normal en pacientes ingresados con infarto de miocardio [17]. Sin embargo, pronto se descubrió la

poca especificad cardiaca de esta enzima y otras propuestas, como la lactato deshidrogenasa (LDH). El primer avance se dio con el desarrollo de los inmunoensayos con anticuerpos policlonales, pero la verdadera evolución se dio en 1975 con el descubrimiento por Kohler y Milstein de los anticuerpos monoclonales, permitiendo ensayos específicos para biomarcadores como la creatina quinasa (CK) o su isoenzima MB (CK-MB), la mioglobina (MG) o las que vienen centrando más la atención en estos últimos años como las subunidades I y T (cTnI, cTnT) de la proteína cardiaca troponina. Es interesante, por tanto, definir las características ideales que debería presentar el biomarcador ideal para determinar el daño cardiaco [18, 19]:

- Ser específico del tejido de miocardio y encontrarse en una concentración alta en el mismo.
- No encontrarse en ningún otro tejido, ni siquiera en trazas, o bajo condiciones patológicas.
- Ser rápidamente liberado cuando se produzca el suceso cardiaco y en proporcionalidad a la extensión del daño provocado.
- Ser persistente en el torrente sanguíneo incluso después de varios días después del infarto para poder ser detectado.
- Tener una alta sensibilidad y especificidad.
- Las primeras horas son críticas en la prognosis del infarto, por lo que ha de poder ser evaluado de una forma rápida que permita actuar enseguida.

Aunque todas las características descritas anteriormente son esenciales, cabe destacar la última, ya que es de vital importancia el tiempo que se tarde en diagnosticar y seguidamente tratar en función de la gravedad a los pacientes que se presenten con sintomatología de un problema cardiaco, y es que la mortalidad aumenta del 1% para aquellos que son tratados 1 hora después del evento hasta el 10 – 12% cuando se hace después de 6 horas [20].

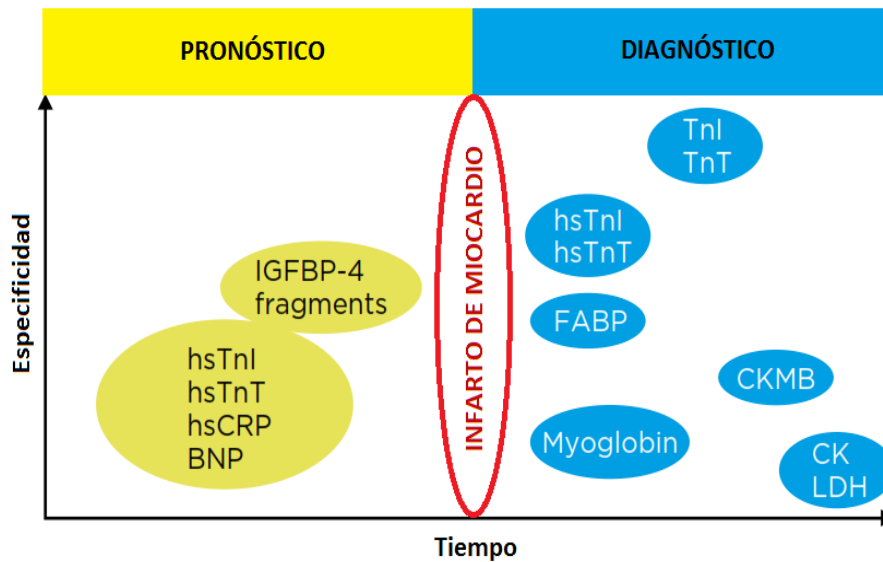


Figura 4. Diferentes biomarcadores cardíacos propuestos en la literatura utilizados tanto para el diagnóstico como para la prognosis del infarto, representados en función del tiempo que tardan en ser detectados y de la especificidad cardíaca que presentan. Adaptado de HyTest Ltd.

Hasta la fecha no existe el biomarcador cardíaco perfecto, que cumpla con todas las finalidades y características mencionadas anteriormente al mismo tiempo. Sin embargo, de los ya citados, las subunidades I y T del complejo proteico troponina son los biomarcadores específicos de daño cardíaco que muestran un aumento en su concentración estrictamente después del incidente y proporcional a la extensión del mismo, de tal forma que proveen un diagnóstico y pronóstico sólidos y precisos.

La troponina es una molécula proteica compleja presente en el músculo esquelético y cardíaco, y que junto con la tropomiosina está localizada en los filamentos de actina, responsables ambas de las contracciones musculares [21]. Está formada, a su vez, por tres subunidades: troponina C, troponina T y troponina I; cada una de ellas con diferentes funciones. De todas ellas, la subunidad C es similar en ambos tejidos musculares, por lo que no presenta cardioespecificidad y no puede utilizarse como biomarcador de daño cardíaco [22]. En cuanto a las otras dos subunidades, ambas presentan diferentes isoformas que permiten su detección. En particular, para la troponina I y debido a una secuencia de 32 aminoácidos en el bloque N-terminal de la misma que provoca una disimilitud en torno al 40% con las demás isoformas, permite la obtención de anticuerpos específicos para la detección de la misma

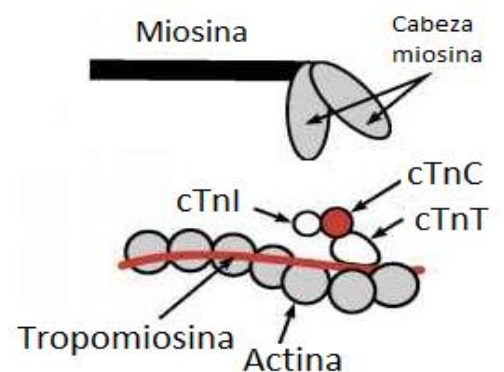


Figura 5. Dibujo representando el complejo de troponina con las subunidades C, T e I, además de la tropomiosina y la actina.

[22, 23]. Sin embargo, ciertos estudios relacionan una elevación de la troponina T en pacientes con fallo renal [24], por lo que el biomarcador elegido para detectar y cuantificar el daño cardiaco suele ser la subunidad I [20, 21].

Cuando se produce un infarto de miocardio, la necrosis producida en los tejidos coronarios provoca la liberación del complejo ternario cTnT-I-C, del binario cTnI-C y cTnT libre, además de diferentes formas oxidadas, reducidas y fosforiladas [25, 26]. El aumento de la proteína en sangre se produce en torno a las 4 ó 6 horas del comienzo de los síntomas, produciendo un pico sobre las 18 – 24 horas y una caída progresiva a partir de aquí, volviendo a sus valores normales a los 6 u 8 días del suceso [22]. Para que esta elevación sea correspondiente con un daño cardiaco ha de ser superior al valor del percentil 99 de una población sana, con un coeficiente de variación inferior al 10% [14, 27] y que dichos valores se repitan en diferentes medidas escalonadas que se realicen al paciente en la sala de urgencia [28]. Aunque se están haciendo muchos esfuerzos para estandarizar estas medidas, la diversidad de anticuerpos utilizados dirigidos a diferentes epítomos hace que no puedan establecerse comparativas entre los test presentes en el mercado, y es esencial que cada uno de éstos se compare con su propia curva de población sana [29]. Como valores de referencia publicados en un estudio reciente se puede tomar como valor límite entre personas sanas y pacientes el rango 0,5 – 2,0 ng/mL, que después del evento cardiaco estos valores pueden alcanzar los 50 ng/mL a las 3 ó 6 horas del mismo [30].

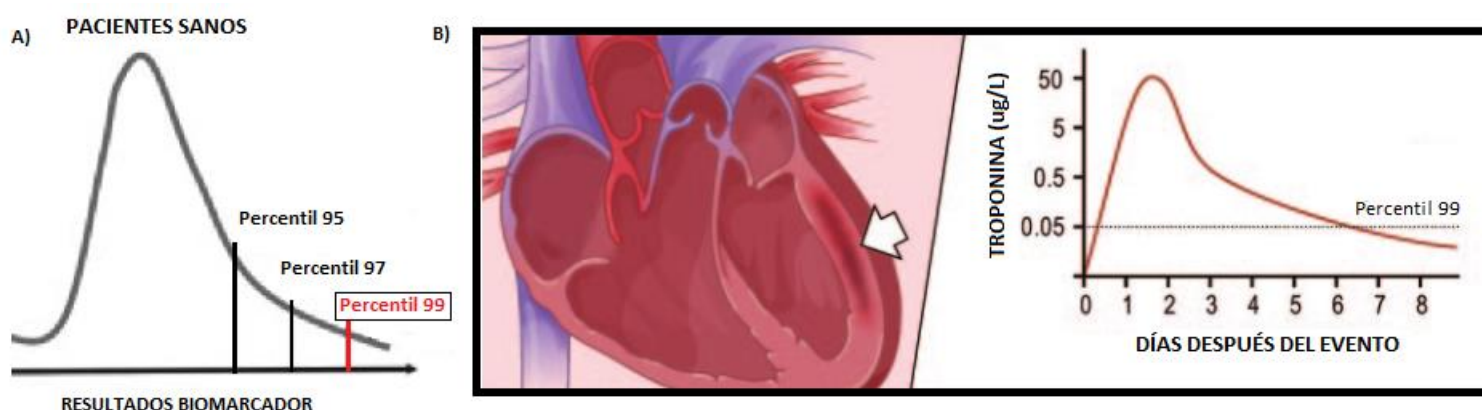


Figura 6. A) Resultados que determinan el valor diagnóstico del percentil 99. B) Evolución de la troponina en sangre después de producirse el infarto de miocardio. Se observa como ésta aumenta considerablemente por encima del valor del percentil 99 a las pocas horas y después decrece gradualmente. Adaptado de [16, 25].

Gracias a la mejora de las técnicas disponibles y del conocimiento de los principios en los que se basan, se han desarrollado en la actualidad unos ensayos que permiten detectar

cantidades muy pequeñas de troponina, denominada en este caso como ‘troponina ultrasensitiva’, que pueden predecir un daño cardíaco mínimo [25]. Son varias las voces que dudan de la utilidad de esta gran sensibilidad en los tests, sobre todo en los que se encuentran en las salas de emergencia, ya que podrían derivar a las mismas a pacientes que realmente no lo necesiten, complicando el trabajo, tiempo y recursos de los hospitales [25, 31].

Por último, resaltar que el tiempo es un factor clave cuando se trata de diagnosticar un posible problema cardíaco, ya que la rápida actuación puede determinar la supervivencia o no del paciente, siendo lo ideal un máximo en torno a 60 – 90 minutos para el comienzo del tratamiento [32].

1.2. Dispositivos ‘point of care’

Los dispositivos denominados ‘point of care’ (POC) son aquellos dispositivos de análisis descentralizado, es decir, que no se encuentran instalados en un laboratorio de análisis sino que están en el lugar donde son requeridos, ya sea en la sala de urgencias, la habitación del paciente o el mismo lugar de un accidente. Además, deben cumplir ciertas características como la sencillez en el diseño y el uso, fiabilidad, robustez y rapidez. Por tanto y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, este tipo de dispositivos puede jugar un papel muy importante en la detección del infarto de miocardio, siendo útil para la detección y diagnóstico de los mismos y permitiendo así una respuesta terapéutica inmediata [33]. Además, dadas las características de los POC es inevitable que se produzca una reducción significativa de los costes del análisis, que podría permitir la introducción de los mismos en los países en vías de desarrollo, donde como se discutió en la sección 1, las cifras de incidencia y mortalidad de las ECV representan una verdadera emergencia sanitaria [3, 34].

1.2.1. Tiras de Flujo Lateral

Una de las modalidades de los dispositivos POC es lo que se conocen como ensayos inmunocromatográficos en tiras de flujo lateral (LFIA)¹, que han cobrado mucho interés en los últimos años, a partir de la comercialización del primero de ellos en 1981 para la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG)² en el archiconocido test de embarazo[35]. A partir de entonces, se han desarrollado en diversos y diferentes

¹ Por sus siglas en inglés: Lateral Flow ImmunoAssay

² Por sus siglas en inglés: Human Chorionic Gonadotropin

campos, como la detección de virus, bacterias, contaminantes medioambientales, drogas, hormonas y proteínas, entre otros [36] debido a las características que presentan al incluirse en los dispositivos POC (sencillez y facilidad de uso, rapidez de respuesta y coste económico). Su desarrollo y aplicación, por tanto, para la obtención de un test capaz de detectar troponina y que cumpla los requerimientos de una rutina clínica tanto de urgencia como de control pero que incluso pueda trasladarse a la casa del paciente con alto riesgo de infarto de miocardio, parece justificada.

La tecnología de los LFIA se basa en la inmunocromatografía [37]. En la [Figura 7](#) se muestran las diferentes partes que componen una tira. El soporte es el encargado de sostener y mantener unidos todos los elementos. La membrana, que será por donde fluyan todos los componentes de la muestra y debido a las interacciones específicas queden o no retenidos en las líneas de test y control correspondientes, suele estar fabricada con nitrocelulosa microporosa. Esta es de carácter hidrofóbico y se usa cuando se requiere un alto anclaje de proteínas. También existe la posibilidad de que sea de acetato de celulosa, también hidrofóbico pero para el caso de que se requiera un bajo anclaje de proteínas, y por último, de fibra de vidrio, cuando no se desea que haya ningún anclaje proteico [38]. En cuanto a la zona de muestra o *conjugate*, es la primera zona de la tira en tomar contacto con la muestra y ha de ser capaz de absorber toda la misma y liberarla a la membrana con un flujo constante. Por último, la almohadilla absorbente o simplemente *absorbent*, que se encuentra colocada al final de la tira, es la encargada de que el volumen total de la muestra ascienda por la membrana por capilaridad. Es importante, por tanto, el tamaño y capacidad de absorción del mismo, que condicionará el volumen total absorbido. Normalmente, los materiales con los que se fabrican estos elementos son de filtros de celulosa [39].

El formato utilizado en este trabajo difiere un poco del habitual, donde se coloca una almohadilla que tiene inmovilizado el anticuerpo conjugado con las nanopartículas en estado seco. En este caso, y tal y como se comentará más adelante, esta almohadilla se elimina y el conjugado se añade en el tubo con la muestra. En disolución, la etapa de reacción entre el antígeno y el conjugado es más favorable y así la cinética del inmunoensayo se incrementa:

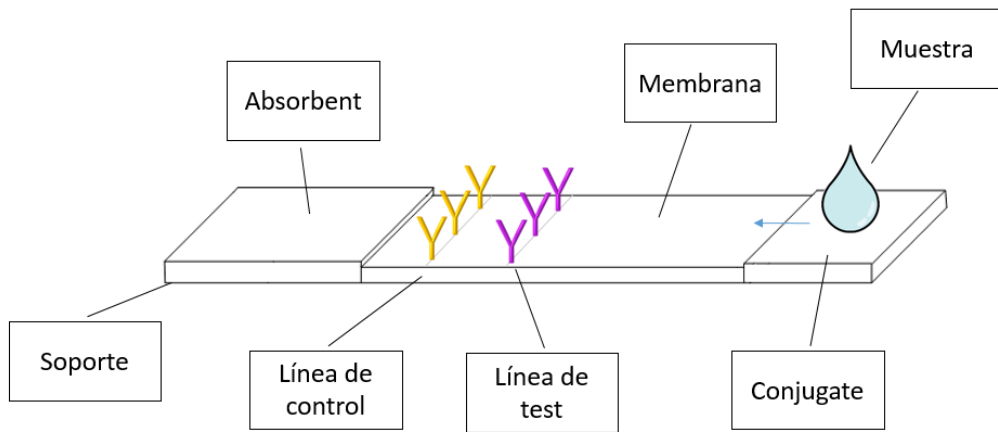


Figura 7. Esquema básico de una tira de flujo lateral con cada uno de sus componentes y la dirección de flujo de la muestra.

Existen dos diferentes estrategias posibles en los LFIA, denominadas no competitiva o tipo sándwich y competitiva. La primera de ellas se utiliza cuando se desean detectar analitos voluminosos y que poseen varios epítomos (sitios de unión a los anticuerpos) [36, 38]. En esta configuración, en la línea de test se deposita un anticuerpo específico contra la molécula a detectar (anticuerpo de captura) mientras que la marca utilizada se funcionalizará con otro anticuerpo específico para el analito (anticuerpo de detección), pero dirigido a otro epítomo del mismo. Durante el ensayo cromatográfico, al fluir la muestra empujada por capilaridad, el analito quedará encerrado entre el anticuerpo de captura y el de detección, retenido en la línea de test y facilitando una respuesta proporcional a la cantidad del mismo. Si no hay presencia de analito en la muestra, el anticuerpo marcado con las nanopartículas seguirá fluyendo hacia la línea de control, resultando en una interacción inespecífica entre ellos si para el control se ha usado un antiIgG genérico de la especie en la que se han desarrollado los anticuerpos de captura. Esta señal garantiza que el ensayo ha transcurrido de forma válida, de manera que si no aparece señal en la línea de test, se descarta la posibilidad de que el flujo se haya interrumpido. Por otro lado, el formato competitivo es la opción cuando la molécula o entidad que se desea detectar es pequeña (hapteno) y posee únicamente un sitio de unión o epítomo [36, 38]. En este caso, la estrategia a seguir se basa en la

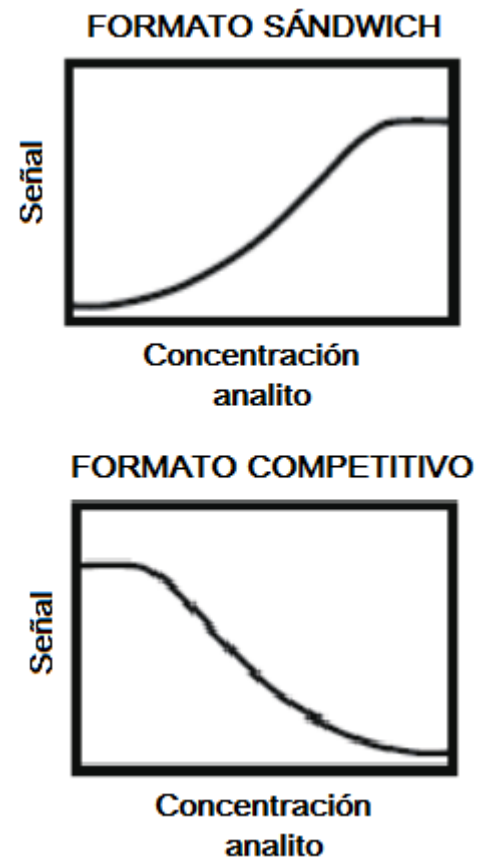


Figura 8. Señales que se obtendrían con los diferentes formatos disponibles en los LFIA.

competición que se da entre el anticuerpo unido a la marca utilizada y el antígeno, que se encuentra presente tanto en la muestra líquida como inmovilizado en la línea de test. De haber mucho antígeno en la muestra, este se unirá completamente al anticuerpo marcado, bloqueando los sitios de unión posibles para que quede retenido en la línea de test. En el caso contrario, cuando no hay antígeno en la muestra, todos los sitios de unión están disponibles, reteniéndose las partículas marcadas en el antígeno retenido. Esto provoca que la respuesta obtenida se correlacione negativamente con la cantidad de analito presente en la muestra [40].

Actualmente, los test de LFIA disponibles o bajo desarrollo confían en tres diferentes tipos de nanopartículas como marcas para la detección del analito, como son partículas coloreadas (nanopartículas de oro, nanopartículas de carbón o nanopartículas de látex), luminiscentes (*quantum dots*) o nanopartículas magnéticas (SPIONs) [41].

Hasta ahora los LFIA han proporcionado una respuesta cualitativa, es decir, de test positivo o negativo [42, 43], interesante desde el punto de vista de la detección de las entidades biológicas correspondientes. Sin embargo, se están haciendo muchos esfuerzos por desarrollar tests que proporcionen una medida cuantitativa del elemento a reconocer, expandiendo las posibilidades de estas herramientas de análisis. Actualmente, existen sensores que proporcionan medidas semicuantitativas, basados principalmente en variaciones de propiedades ópticas, como la fluorescencia o la reflectancia [41, 44], pero siguen siendo muchas las limitaciones de los mismos. Por ejemplo, en ellos, la señal procede sólo de las partículas en la zona superficial aun cuando la membrana tiene un espesor considerable [45], por lo que aproximadamente el 90% del analito no se detecta [42]. También podría destacarse como hándicap que las medidas ópticas pierden intensidad a medida que pasa el tiempo, por lo que el control de los parámetros a medir podría sufrir fluctuaciones que afectasen seriamente la precisión de las medidas.

Aunque se han propuesto varias alternativas, toman cada vez más interés el uso de las ya mencionadas anteriormente SPIONs como marcaje, ya que permitirían además de la cuantificación del analito debido a diferentes principios magnéticos, sobrepasar las limitaciones comentadas anteriormente y además, mejorar los límites de detección, ya que existiría la posibilidad de someter a la muestra a una preconcentración mediante gradientes magnéticos antes de llevar a cabo el test [46]. Son tres los principios magnéticos que en la actualidad permiten cuantificar los resultados obtenidos,

magnetoresistencia gigante (GMR)³ [47], efecto Hall [48, 49] e inducción electromagnética [50, 51]. Todos ellos necesitan que los campos magnéticos aplicados para la obtención de la señal tengan altas frecuencias y/o amplitudes elevadas, lo que todavía dificulta su traslado a los dispositivos POC.

1.3. NPSensor: principios magnéticos y funcionamiento

Las partículas magnéticas han sido utilizadas a lo largo de estos últimos años en biomedicina, con aplicaciones como son la separación magnética de entidades biológicas marcadas, la liberación asistida de fármacos, la hipertermia y como agentes de contraste en las imágenes magnéticas de resonancia (MRI)⁴ [52], aunque su desarrollo y aplicación se extiende también en otros terrenos como la biotecnología, la catálisis o la remediación medioambiental [53].

Como se ha comentado en la sección precedente, el uso de partículas magnéticas como marcas depende para su cuantificación de sensores que requieren en general grandes frecuencias y/o amplitudes de campos magnéticos excitadores. Recientemente, se ha desarrollado en el grupo de investigación de Desarrollo de Materiales Magnéticos de la Universidad de Oviedo un sensor basado en un nuevo principio de medida que permite cuantificar nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs), denominado NPSensor [54, 55]. Este sistema no requiere la aplicación de campo excitador, lo que simplifica notablemente su diseño y manejo.

Normalmente, las SPIONs utilizadas consisten en un núcleo de óxido de hierro (magnetita) recubierto de un compuesto que eleva su biocompatibilidad o que es requerido para su posterior aplicación. El tamaño de las mismas es uno de los parámetros claves, ya que de ello depende su superparamagnetismo. Brevemente, el superparamagnetismo es un tipo de comportamiento magnético que se da en nanomateriales ferro o ferrimagéticos, lo que implica un tamaño alrededor de los 10 nanómetros. Este pequeño tamaño hace que estas nanopartículas posean un carácter superparamagnético, es decir, su momento no es observable, ya que la temperatura ambiente es suficiente para hacer que éste oscile constantemente a una velocidad elevada. Sin embargo, genera a su alrededor un campo magnético de muy alta frecuencia, capaz de provocar corrientes parasitas sobre un material conductor. Si por este conductor ya se

³ Por sus siglas en inglés: Giant Magneto Resistance

⁴ Por sus siglas en inglés: Magnetic Resonance Imaging

encuentra establecida una corriente de frecuencia alterna, las corrientes parasitas formadas van a obstaculizar el paso de la misma, provocando una variación en la impedancia. Esta variación es fácilmente medible, y no requiere excitar magnéticamente las SPIONs, por lo que permitiría la creación de un sensor portátil y económico, con la gran ventaja de que puede cuantificar la cantidad de nanopartículas presentes. Esta última característica es esencial desde el punto de vista del desarrollo de los LFIA comentados anteriormente, ya que permitirían el paso hacia los ensayos cuantitativos. Para ello, es necesario que las SPIONs utilizadas se funcionalicen específicamente para el analito requerido, mediante la unión al recubrimiento superficial de las mismas de otras entidades biológicas que permitan el reconocimiento biológico, pudiendo ser estas anticuerpos, aptámeros, etc [56].

Por tanto, la cuantificación de las entidades biológicas deseadas se puede llevar a cabo gracias a las SPIONs empleadas como marcaje de las mismas y debido a la inducción electromagnética que su presencia produce en el elemento sensor del NPSensor.

2. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general del presente trabajo de fin de máster es el desarrollo de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral con nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas como marca del mismo, que permita detectar la subunidad I de la proteína troponina, utilizada como biomarcador del daño celular específico que se produce en un infarto agudo de miocardio, y que además, y gracias al marcaje magnético con dichas nanopartículas, permita su cuantificación mediante el acople de estas tiras a un sensor, capaz de relacionar la variación que se produce en la impedancia de un circuito de cobre debido a la presencia de estas nanopartículas. La variación de esta variable, por tanto, está directamente relacionada con la cantidad de troponina presente en la muestra.

2.1. Objetivos específicos

Dentro del trabajo global mencionado anteriormente, se encuentran los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis y caracterización de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con un tamaño alrededor de los 10 nanómetros. El control del tamaño y la estabilización de las nanopartículas se llevará a cabo mediante la adición de ácido poliacrílico, que permitirá su posterior funcionalización y uso.
- Desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral en el formato tipo sandwich y con las nanopartículas superparamagnéticas como marca que permita la detección de la troponina I.
- Cuantificación de la troponina mediante el sensor magnético basado en medidas de impedancia.
- Comparación de los resultados obtenidos en el NPSensor con medidas de un sensor óptico basado en medidas de reflectancia y validación del método.

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro

Las marcas utilizadas para este trabajo son, como se ha mencionado anteriormente, SPIONs de magnetita. Debido a que sus propiedades y aplicación dependen ampliamente de las características físicas que presenten, especialmente el tamaño, y del recubrimiento de las mismas, tener un control propio sobre estos parámetros resulta muy interesante, por lo que durante este trabajo se llevó a cabo la síntesis en el laboratorio de las mismas.

i. Síntesis de Nanopartículas de Fe_3O_4

La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación de sales de hierro en medio ácido. El control del tamaño y la estabilización de las mismas se llevan a cabo mediante la adición de ácido poliacrílico, que formará el recubrimiento superficial. Se realizaron tres procedimientos de síntesis, en los que se estudió la influencia de una atmósfera inerte de nitrógeno en las características finales que presentan las nanopartículas. Las diferentes pruebas que se realizaron se numeran como lotes, y se muestran en la [Tabla 2](#) junto con las condiciones bajo las que se realizaron.

Tabla 2. Diferentes lotes de nanopartículas sintetizadas con sus condiciones de síntesis.

	Lote I	Lote II	Lote III
Síntesis	Atmósfera oxidante	Atmósfera oxidante	Atmósfera de N_2
Recubrimiento	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico

- En un balón de 500 mL y con tres bocas se disuelven 24,3 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (VWR International BVBA, Bélgica) y 16,7 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (VWR International BVBA, Bélgica) en 200 mL de HCl 0,01 M (VWR International BVBA), calentándose en un baño de agua con placa calefactora (C-MAG HS7, IKA) a 60°C durante 30 minutos y agitándose con un agitador mecánico (MS 3 Digital, IKA) de pala plana a 300 rpm aproximadamente.
- Se añaden 60 mL de NH_3 al 28% (VWR International BVBA, Bélgica) y a los 30 segundos se adiciona una disolución de 3,9 g de ácido poliacrílico (Sigma-Aldrich, EEUU), otros 4 mL de NH_3 y 40 mL de agua destilada, dejando la reacción madurar durante 1 hora.

- Se añade nuevamente HCl hasta conseguir un pH aproximado de 4 que permita la separación de las nanopartículas formadas mediante la aplicación de un imán (Superior a 1 Tesla). Se elimina el sobrenadante y se redispersa en 400 mL de agua destilada. Este proceso ha de repetirse dos veces.
- En el precipitado del último lavado se añaden 8 mL de NH₃ al 28% y se redispersa en 500 mL de agua destilada.

ii. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas

La caracterización de las nanopartículas sintetizadas se llevó a cabo mediante diferentes técnicas: Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)⁵ (JEOL JEM-2100, 200kV), Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)⁶ (Varian 620-IR), Análisis Termogravimétrico (TGA)⁷ (STAR SW 9.30), y Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM)⁸ (EV9 VSM, Temperatura ambiente), de las que todas ellas se realizaron en los correspondientes Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo.

3.2. Desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral para la detección de troponina I

i. Montaje de las tiras de flujo lateral

Como se ha descrito anteriormente, las tiras de flujo lateral están formadas por diferentes componentes, todos ellos cumpliendo una función determinada. Cada uno de los elementos se adquiere por separado, para poder así elegir las propiedades más adecuadas en su uso final, especialmente de la membrana, que será la que determine mayoritariamente el flujo. En este caso, ésta es de nitrocelulosa (Unistart 95 CN, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania).

El primer paso en el montaje de las tiras es la colocación de la membrana en el soporte (KN-V1080, Kenoshatapes, Holanda). Una vez colocada, se han de situar tanto la almohadilla conjugada o *absorbent* (Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) como la almohadilla de muestra o *conjugate* (Fibra de vidrio, Millipore Corporation, Massachusetts, EEUU), de forma que se sobrepongan unos 5 mm en la superficie de la membrana, permitiendo así un flujo continuo.

⁵ Por sus siglas en inglés: Transmission Electron Microscopy

⁶ Por sus siglas en inglés: Fourier Transform Infrared Spectrometry

⁷ Por sus siglas en inglés: Thermo Gravimetric Analysis

⁸ Por sus siglas en inglés: Vibrating Sample Magnetometer

ii. Deposición de las líneas de test y control en las tiras de flujo lateral

Una vez montadas las tiras de flujo lateral, se procede a la deposición de los anticuerpos que conformarán las líneas de test y control. En la línea de control, se deposita siempre una antiIgG de ratón (Sigma-Aldrich, EEUU), capaz de reconocer el anticuerpo con el que se han funcionalizado las nanopartículas magnéticas (todos ellos monoclonales producidos en ratón) y permitiendo así comprobar que el test se ha llevado a cabo correctamente y ha ascendido la muestra. La deposición de esta línea se realizó mediante dos procedimientos. En el primero de ellos se depositaron 3 gotas de 0,3 μL cada una mientras que en la segunda se depositó únicamente una gota de 0,3 μL . Todas ellas con una concentración de IgG de 1 mg/mL. Por otro lado, en la línea de test se depositarán los anticuerpos de captura con los que se ha trabajado (ver Figura 7), siempre mediante la adición de 3 gotas de 0,3 μL cada una. Cabe mencionar que para evitar problemas de saturación en la línea de test, en las muestras que se realizaron con concentraciones superiores a 330 ng/mL se depositaron en la membrana dos líneas de éstas, una detrás de la otra, con al menos 1 mm de separación.

Una vez depositadas ambas líneas, se introducen en la estufa (D2804 Nabertherm) a 37°C de temperatura durante 1 hora.

iii. Funcionamiento de las tiras de flujo lateral

Para llevar a cabo los ensayos en la tira de flujo lateral, se sigue siempre el mismo procedimiento, ya sea con nanopartículas de oro o magnéticas. La tira se sumerge en un tubo eppendorf con un volumen total de muestra de 100 μL . En dicho volumen se encontrarán el *running buffer*, el anticuerpo de detección conjugado con las nanopartículas correspondientes y las diferentes cantidades de analito, en este caso troponina. La cantidad de anticuerpo conjugado añadida se mantiene fija, mientras que se varía la cantidad de troponina para obtener la concentración necesaria y el *running buffer* para que el volumen final sea el anteriormente mencionado.

Antes de poner la tira en contacto con la muestra para que se lleve a cabo el inmunoensayo, se deberán esperar diez minutos para que se lleve a cabo la reacción entre el anticuerpo de detección que recubre las nanopartículas y la troponina. Una vez transcurrido este tiempo, la tira

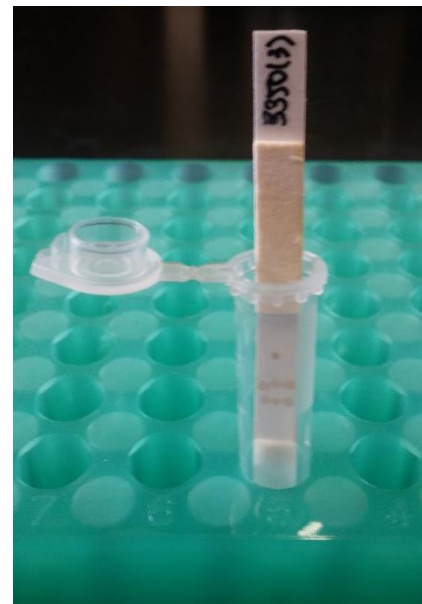


Figura 9. Disposición de las tiras de flujo lateral cuando se va a realizar el test.

es introducida en el eppendorf y se espera a que todo el volumen haya ascendido por la misma y se vea al menos la línea de control.

iv. Validación del inmunoensayo con nanopartículas de oro

El primer paso para el desarrollo del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas es su validación preliminar con nanopartículas de oro. La conjugación de proteínas como son los anticuerpos con éstas nanopartículas se ha detallado ampliamente en la bibliografía [57] y se han convertido prácticamente en un estándar, ya que se conjugan con gran facilidad. Los anticuerpos específicos anti-troponina I de los que se disponía en el laboratorio se encuentran recogidos en la [Tabla 3](#). Como puede verse en esta, hay dos parejas de anticuerpos, una de ellas comercial mientras que la otra se produjo mediante un hibridoma en el propio laboratorio en trabajos anteriores. Por otro lado, en la [Figura 10](#) se pueden ver las diferentes configuraciones del formato tipo sándwich con las que se probó en los inmunoensayos.

Tabla 3. Anticuerpos anti-troponina I utilizados en los diferentes experimentos.

Anticuerpo	Procedencia	Tipo	Producción	Posición
19C7	HyTest Ltd (Finlandia)	Monoclonal	Ratón	Detección/Captura
560	HyTest Ltd (Finlandia)	Monoclonal	Ratón	Captura/Detección
9A612	Producción propia	Monoclonal	Ratón	Captura
6E9.182	Producción propia	Monoclonal	Ratón	Captura

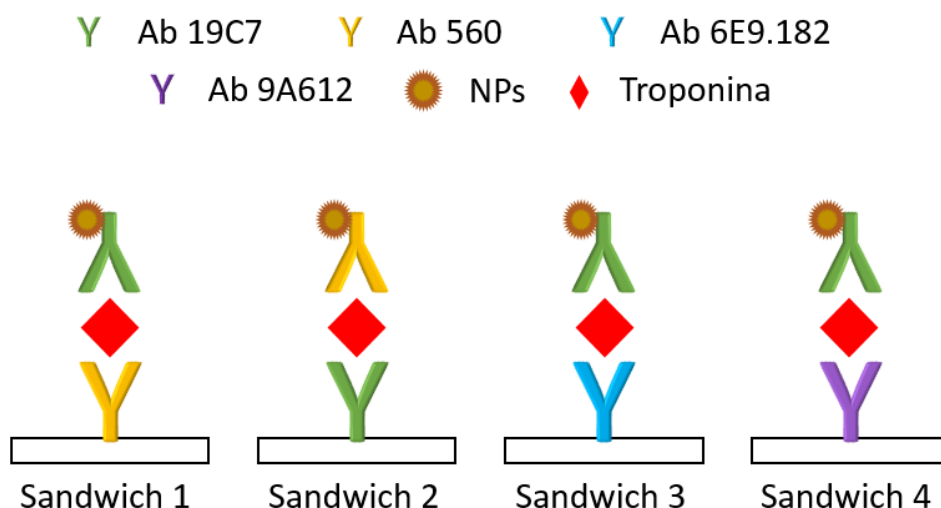


Figura 10. Diferentes formatos tipo sándwich estudiados con los anticuerpos mostrados en [Tabla 3](#).

❖ Funcionalización de las nanopartículas de oro

Para dar lugar a la validación del inmunoensayo se conjugaron nanopartículas de oro (AuNPs) de 40 nanómetros (BBInternational, UK) mediante el protocolo establecido en [57], que se resume a continuación.

- Se añaden 100 μL de disolución del anticuerpo 19C7 con una concentración de 0,2 mg/mL a 1500 μL de la disolución de las AuNPs anteriormente mencionadas, y se dejan bajo agitación mecánica (MSI Minishaker, IKA) a unas 450 rpm durante 30 minutos.
- Se añaden 20 μL de una disolución 1% en peso de albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich, EEUU) para bloquear los posibles sitios activos que queden libres y se mantiene en las mismas condiciones de agitación durante 20 minutos más.
- Se centrifuga (Espresso Centrifuge, Thermo Electron Corporation) a 10000 rpm durante 20 minutos, se eliminan 700 μL del sobrenadante y se añaden 500 μL de buffer fosfato salino (PBS, 10mM, pH 7,4).
- Se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones durante 10 minutos y se eliminan 550 μL del sobrenadante.
- Se añaden 100 μL de una disolución buffer salino de boratos (BBS, 2mM, pH 7,3) que contiene 10% (p/v) de sacarosa (Sigma-Aldrich, EEUU) y 1% (p/v) de BSA, y se almacena en nevera.

Los diferentes ensayos que se llevaron a cabo con las tiras de flujo lateral para validar el inmunoensayo se realizaron mediante el procedimiento descrito en la sección anterior Funcionamiento de las tiras de flujo lateral. En la [Tabla 4](#) se encuentran recogidos los diferentes *running buffer* con los que se trabajó en las tiras de flujo lateral.

Tabla 4. Composición de los diferentes *running buffers* utilizados.

<i>Running Buffer 1</i>	<i>Running Buffer 2</i>	<i>Running Buffer 3</i>
PBS (10mM, pH 7,4) 3% (v/v) MeOH 0,1% (v/v) Tween20 1% (p/v) BSA	HEPES 0,05% (v/v) Tween20 1% (p/v) BSA	PBS (10mM, pH 7,4) 0,05 (v/v) Tween20 1% (p/v) BSA

v. Desarrollo y optimización del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas

❖ Funcionalización de las nanopartículas de magnetita

La conjugación de las nanopartículas de magnetita con el anticuerpo de detección correspondiente tiene lugar mediante un enlace covalente, mucho más fuerte que las interacciones que se dan en la conjugación de las AuNPs. Dicho enlace tiene lugar entre el ácido poliacrílico que recubre la superficie de las mismas y los grupos aminos presentes en los anticuerpos correspondientes mediante un enlace amida. Para llevar a cabo esta unión, es necesario activar el ácido poliacrílico mediante el uso de un agente entrecruzante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida (EDC) y como estabilizador N-hidroxisuccinimida (NHS) para que la reacción se lleve a cabo correctamente tal y como se muestra en la [Figura 11](#).

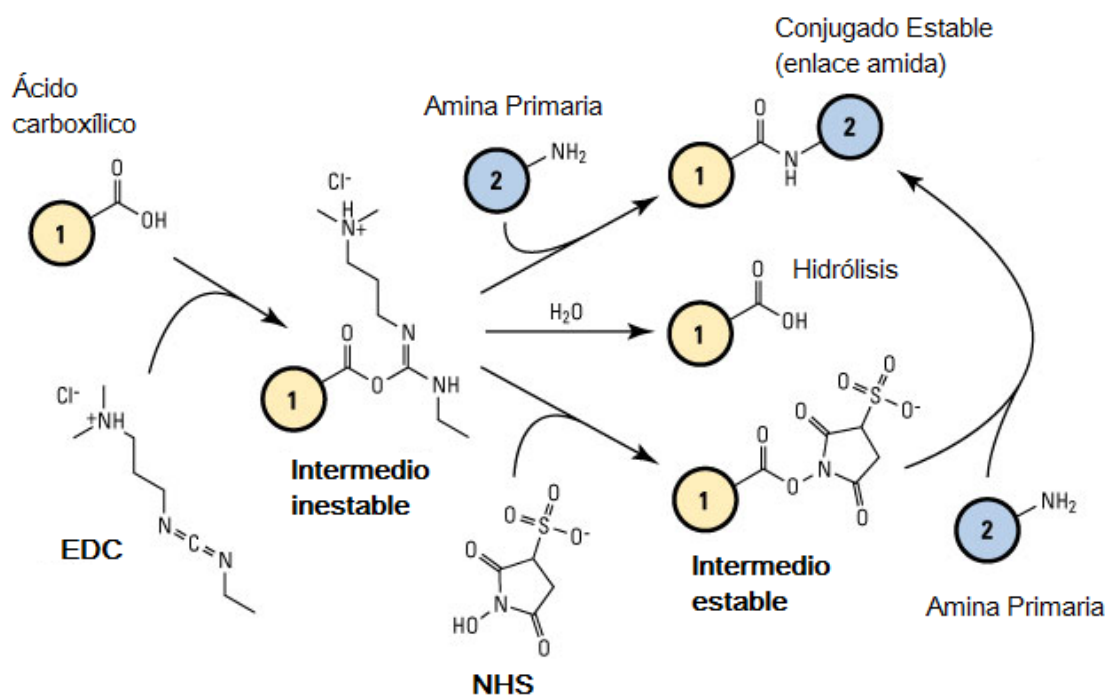


Figura 11. Reacción entre los ácidos carboxílicos de la superficie de las SPIONs y los residuos amina de los anticuerpos de captura durante la conjugación entre ambos. Adaptado de ThermoFisher.

El protocolo general seguido para la funcionalización de las SPIONs se detalla a continuación.

- Se pesan con una balanza analítica (Mettler-Toledo AB54) 0,001g de EDC (Sigma-Aldrich, EEUU) al que se le añaden 1000 μ L de PBS (10mM pH 7,4) y se traspasan a otros 0,001 g de NHS (Sigma-Aldrich, Suiza), disolviendo ambas sales mediante agitación vórtex.

- Se añaden 100 μL de la disolución anterior a un volumen de SPIONs variable y se mantiene en agitación mecánica a 550 rpm durante dos horas.
- Se añade a la mezcla 20 μL de una disolución del anticuerpo de detección deseado con una concentración de 0,20 mg/mL y se continúa en las mismas condiciones de agitación durante dos horas más. Esta etapa es la que se conoce como funcionalización de las nanopartículas.
- La siguiente etapa es el bloqueo de los posibles sitios que hayan quedado libres en la superficie de la nanopartícula, para lo que se añaden 100 μL de una disolución BBS (2mM, pH 7,3) al 1,5% de BSA. Se deja agitando en las mismas condiciones durante una hora más.
- Se centrifuga (Model 2716 Nahita Centrifuge) a 7000 rpm durante 5 minutos y se eliminan 180 μL de sobrenadante, de los cuales se reponen 60 μL de PBS (10mM, pH 7,4).

La comprobación de la conjugación del anticuerpo de detección a las SPIONs se llevó a cabo mediante el análisis de la muestra correspondiente en el DLS (ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments).

❖ Evaluación del lavado de las membranas

Como se ha comentado anteriormente las membranas están compuestas de nitrocelulosa, que es hidrofóbica, y por esto se le añaden determinados compuestos (detergentes y surfactantes) que ayudan al flujo de la muestra por la misma. Las casas comerciales no suelen indicar qué tipos de compuestos utilizan, por lo que se llevó a cabo el lavado de la membrana para ver la influencia de los aditivos añadidos. El protocolo de lavado consiste en la sumersión de la membrana en agua miliQ durante una hora, por dos veces, y su secado en estufa durante al menos 48 horas.

❖ Elección del sándwich más adecuado para el inmunoensayo

De todos los anticuerpos de los que se disponía, únicamente se trabajó con la pareja comercial cuando se llevó a cabo el inmunoensayo usando las partículas magnéticas. Por tanto, de todos los posibles formatos de la [Figura 10](#) se llevaron a cabo solamente el Sándwich 1 (19C7 como anticuerpo de detección y 560 de captura) y Sándwich 2 (560 como anticuerpo de detección y 19C7 como captura). El procedimiento, tanto de deposición del anticuerpo de captura en la tira como el de funcionalización de las

nanopartículas se encuentra detallado más arriba (ver Deposición de las líneas de test y control y *Funcionalización de las nanopartículas de magnetita*, respectivamente).

❖ Selección del *running buffer* más adecuado para el inmunoensayo

Se hicieron, al igual que para el caso de las AuNPs, diferentes pruebas con los diferentes *running buffer*, que se encuentran recogidos en la [Tabla 4](#). De todos ellos se seleccionó uno para realizar los siguientes estudios.

❖ Estudio de los diferentes agentes de bloqueo durante la funcionalización de las nanopartículas

Hay diferentes agentes que son comúnmente utilizados en la funcionalización, durante la etapa de bloqueo, para eliminar los sitios activos que puedan quedar aun libres y evitar las posibles interacciones inespecíficas que estos puedan ocasionar. Se realizaron diferentes pruebas con dos de ellos, caseína (Sigma-Aldrich, EEUU) y BSA, para ver con cuál se obtenían mejores resultados en las tiras de flujo lateral. Para ello, se siguió el mismo protocolo de funcionalización (ver *Funcionalización de las nanopartículas de magnetita*), pero en este caso, en la etapa de bloqueo se añadieron 100 μL de cada una de las dos disoluciones que se muestran en la [Tabla 5](#).

Tabla 5. Disoluciones de bloqueo utilizadas en la funcionalización.

Bloqueo con BSA	Bloqueo con Caseína
BBS (2mM, pH 7,3)	BBS (2mM, pH 7,3)
1,5% (p/v) BSA	1% (p/v) Caseína

❖ Optimización de la cantidad de nanopartículas magnéticas en la funcionalización

Se realizaron diferentes pruebas variando la cantidad de nanopartículas que se añadían durante el proceso de funcionalización en la primera etapa de funcionalización de las mismas (ver *Funcionalización de las nanopartículas de magnetita*). Los volúmenes con los que se trabajó se muestran en la [Tabla 6](#).

Tabla 6. Volumen total de SPIONs añadido durante la funcionalización de las mismas.

Volumen Total (μL)	Volumen Nanopartículas (μL)	Volumen PBS (μL)
3	3	-
5	5	-
20	8	12
20	11	9

❖ Obtención de la curva de calibrado

Una vez optimizados todos los parámetros anteriores se llevó a cabo la obtención de la curva de calibrado, para la que se realizaron las muestras que se ven en la [Tabla 7](#), donde como se puede comprobar que se añadieron cantidades crecientes de troponina al realizar las tiras, para ver su comportamiento en el sensor.

Tabla 7. Muestras realizadas para la obtención de la curva de calibrado de Troponina I.

Muestra	NPs@19C7 (μL)	Troponina ($\mu\text{L} - \text{ng/mL}$)	[Troponina] (ng/mL)	Running Buffer (μL)
Blanco	10	0 – 0	-	90
70	10	2 – 70	3300	88
200	10	6 - 200	3300	84
330	10	10 – 330	3300	80
1000	10	9 - 1000	11000	81
2020	10	18 – 2020	11000	72
3350	10	30 – 3350	11000	60

❖ Estudio de la variación de la señal magnética con la cantidad de anticuerpo de detección utilizada durante la funcionalización

Para ver cómo influye la cantidad de anticuerpo que se usa durante la conjugación con nanopartículas magnéticas, en la señal obtenida posteriormente, se llevó a cabo un pequeño estudio en el que se funcionalizaron las nanopartículas (5 μL de las mismas) mediante el protocolo habitual (ver *Funcionalización de las nanopartículas de magnetita*), en el que en vez de añadir 20 μL del anticuerpo de detección 19C7 (con concentración 1mg/mL) se añadieron 35 μL del mismo a igual concentración. Con estas nanopartículas se realizaron las tiras correspondientes que se muestran en la [Tabla 8](#).

Tabla 8. Muestras realizadas para el estudio de la influencia de la cantidad de anticuerpo utilizado en la funcionalización de las nanopartículas.

Muestra	NPs@19C7 (μL)	Troponina ($\mu\text{L} - \text{ng/mL}$)	[Troponina] (ng/mL)	Running Buffer (μL)
Blanco	10	0 – 0	-	90
70	10	10 – 70	3300	80
330	10	18 – 2020	3300	72
3350	10	30 – 3350	11000	60

❖ Estudio de la variación de la señal magnética con la concentración del anticuerpo de captura depositado en la tira

Se llevó a cabo un estudio para ver la variación que podría existir en la señal magnética al variar la concentración del anticuerpo de captura que se deposita previamente en las tiras. Para ello, se depositaron mediante el procedimiento habitual (ver Deposición de las líneas de test y control), las mismas cantidades de anticuerpo 560, pero en este caso doblando su concentración, es decir, pasando de 1 mg/mL a 2 mg/mL. Las cantidades correspondientes que se utilizaron en las tiras para estas pruebas se encuentran recogidas en la [Tabla 9](#).

Tabla 9. Muestras realizadas para el estudio de la influencia de la concentración del anticuerpo de captura.

Muestra	NPs@19C7 (μL)	Troponina (μL – ng/mL)	[Troponina] (ng/mL)	Running Buffer (μL)
Blanco	10	0 – 0	-	90
330	10	10 – 330	3300	80
2020	10	18 – 2020	11000	72

3.3. Cuantificación de la troponina mediante el NPSensor

El sensor que se utiliza para la cuantificación magnética de la troponina presente en las tiras se ha desarrollado mediante la adaptación de una impresora 3D, que permite un movimiento controlado tanto de la cabeza sensora como del portamuestras, posibilitando la medida de las muestras mediante un barrido de la membrana.

i. Obtención de la curva de calibrado de las nanopartículas magnéticas

Para la obtención de la curva de calibrado de la señal que proporcionan las nanopartículas en el sensor se depositaron diferentes cantidades de las mismas en una tira de membrana de nitrocelulosa de dimensiones 2 mm x 3 mm, se dejaron secar, se embebieron en celo y se procedió a su medida con el sensor. Las diferentes cantidades que se realizaron se encuentran recogidas en la siguiente tabla. Para la obtención de las mismas se tuvo en cuenta que las nanopartículas que se utilizaron para el desarrollo del inmunoensayo tienen una concentración de 38 μg/μL.

Tabla 10. Cantidades de NPs utilizadas en la obtención de la curva de calibrado.

Muestra	Volumen (μL)	Masa Nanopartículas (μg)
1	2,5	95
2	5	190

3	7,5	285
4	10	380

ii. Cuantificación de las tiras de flujo lateral

En la [Figura 12](#) se puede observar toda la estructura del NPSensor, con el soporte de la cabeza sensora, donde se encuentra situado el circuito de cobre, y el portamuestras, donde se ha de colocar la tira de flujo lateral que se desee medir. Este es un paso fundamental, ya que ésta debe de estar en íntimo contacto con el circuito, por lo que se deberá aproximar el máximo posible al mismo.

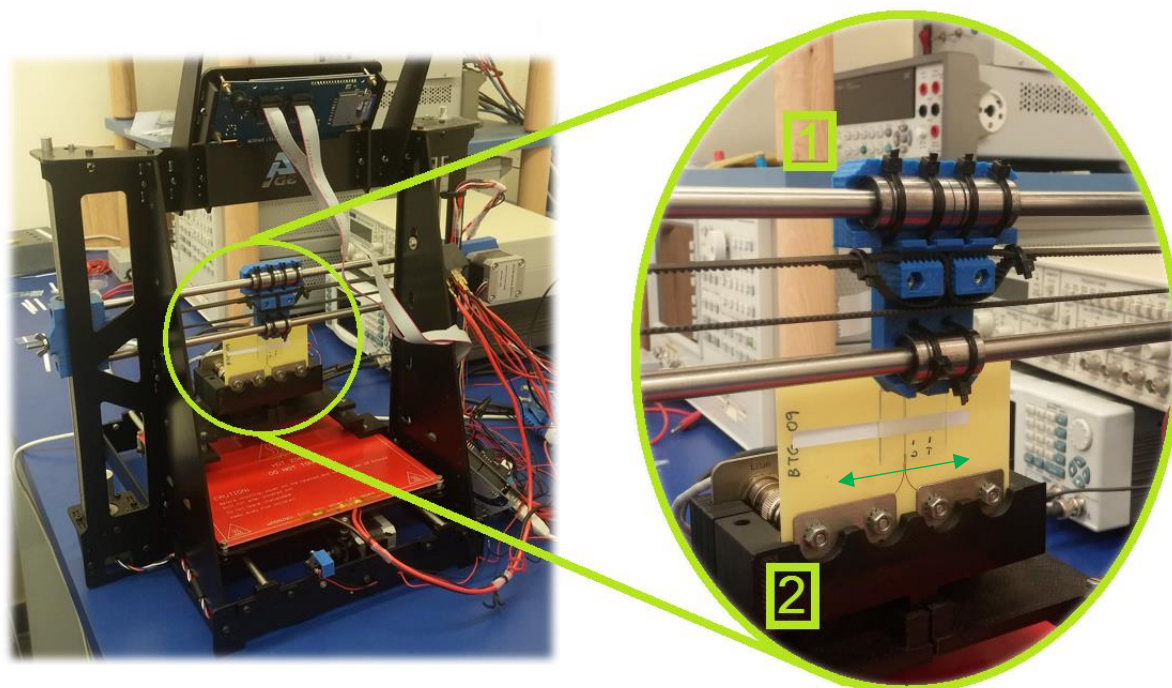


Figura 12. Detalle del portamuestras (1) y de la cabeza sensora (2) del NPSensor. En la imagen de la derecha también puede observarse como se desplazaría el portamuestras en ambos sentidos de la tira (flecha verde), obteniendo señal en todo el recorrido.

Son varios los parámetros que se ajustaron durante las primeras medidas y que se muestran en la [Figura 13](#). De todos ellos, especialmente importantes son los puntos de barrido y la frecuencia de trabajo. Por otro lado, la superficie de membrana que se analice viene determinada por el desplazamiento (en mm) y el total de puntos de dicho desplazamiento.

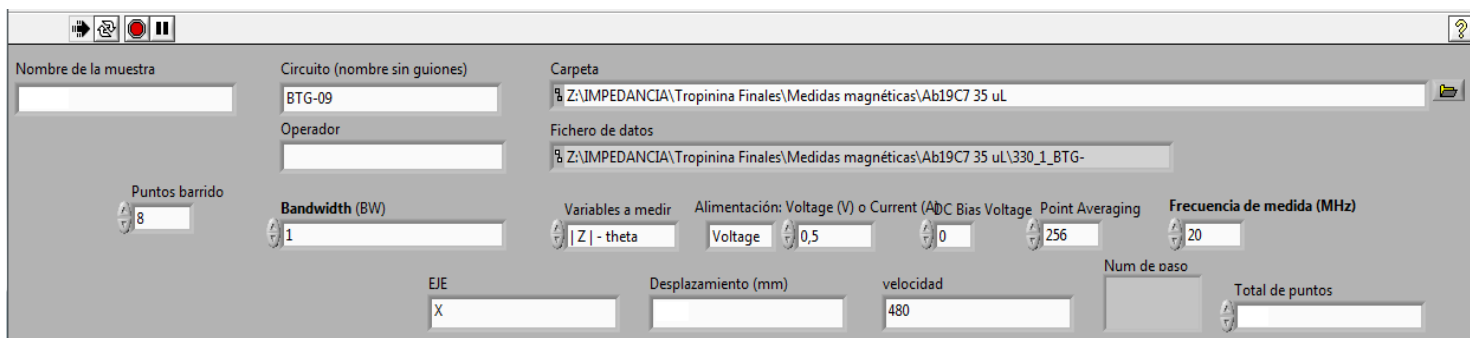


Figura 13. Parámetros establecidos para la toma de medidas en el NPSensor.

Las medidas se llevaron a cabo para cada una de las muestras obtenidas, realizando cuatro barridos de las líneas de test y control de la membrana. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Matlab, del que se obtiene el área debajo del pico (ver Figura 31) que produce la señal de la variación de impedancia, mediante la integral acumulativa de los mismos.

3.4. Comparación de las medidas magnéticas con medidas de reflectancia

Las medidas ópticas se realizaron con un sensor óptico (ESEQuant LR3, Qiagen) basado en la reflectancia. Para obtenerlas, se situaron las muestras cuando todavía están mojadas y al mismo tiempo para todas ellas después de haber terminado el test (10 minutos), de forma que se tengan las mismas condiciones para el análisis. Los datos obtenidos son analizados con el software propio del instrumento, y del mismo modo que en el caso del análisis de los datos magnéticos, se obtiene el área bajo la curva de la señal obtenida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro

La síntesis de nanopartículas magnéticas se llevó a cabo en diferentes ocasiones y bajo diferentes condiciones de síntesis, tal y como se ha mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos en los diferentes análisis de caracterización que se realizaron de las mismas se muestran a continuación.

➤ Tamaño y morfología de las partículas

El tamaño y la morfología de las nanopartículas obtenidas se estudiaron mediante imágenes del TEM. Algunas de las fotografías que se obtuvieron se muestran a continuación.

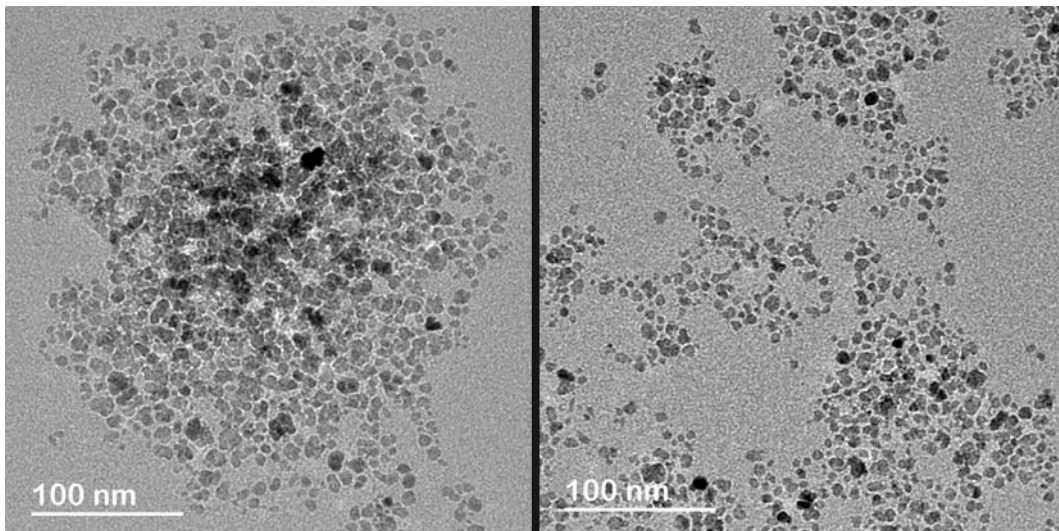


Figura 14. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote I de nanopartículas sintetizadas.

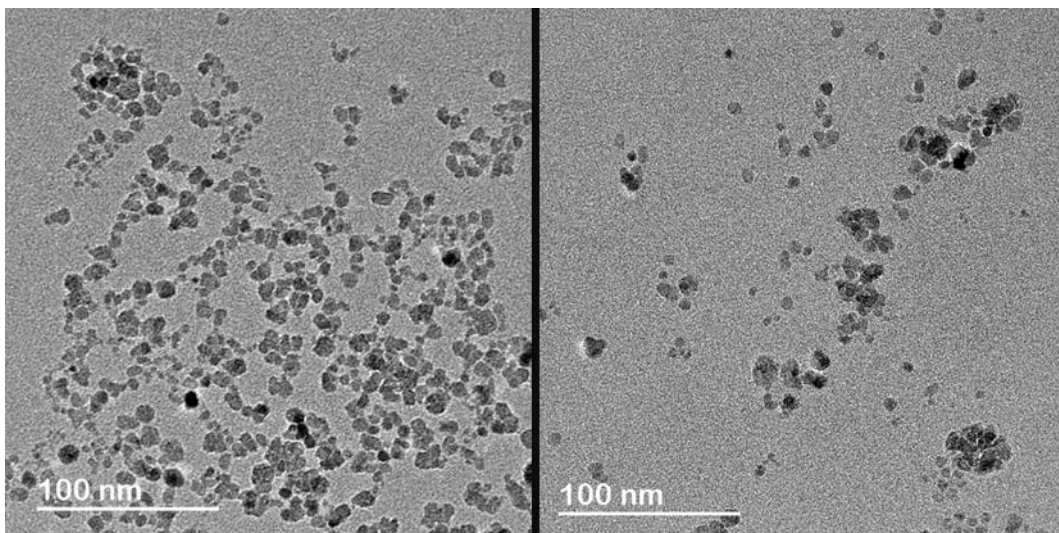


Figura 15. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote II de nanopartículas sintetizadas.

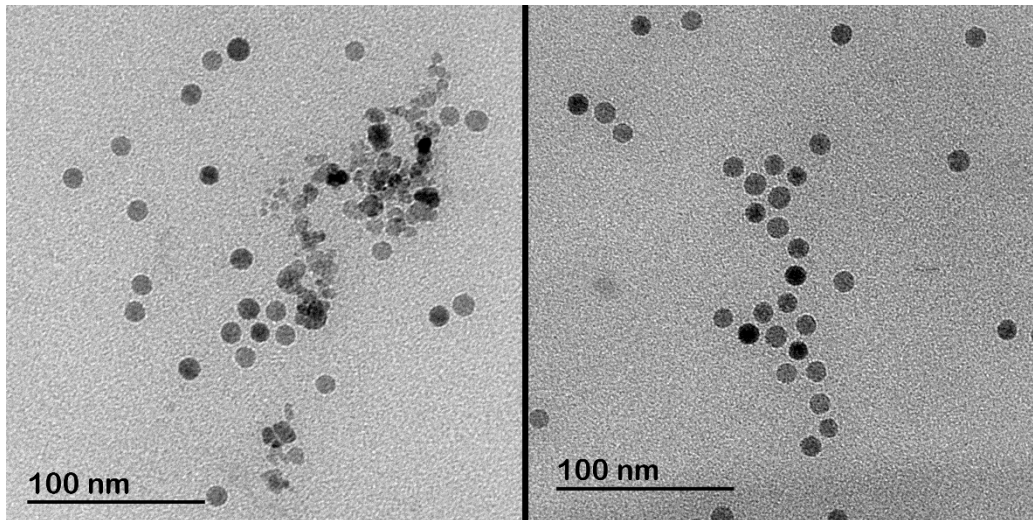


Figura 16. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote III de nanopartículas sintetizadas.

Como puede observarse de las imágenes anteriores, la atmósfera bajo la que se realiza la síntesis de las nanopartículas es determinante en la forma y tamaño de las mismas, influyendo en la homogeneidad de la muestra considerablemente. Si se comparan las imágenes obtenidas de los Lotes I y II con el Lote III se puede observar cómo el tener una atmósfera oxidante (es decir, rica en O_2) provoca una distribución de tamaño de la muestra mucho más heterogénea. Además, las imágenes obtenidas en el Lote III de nanopartículas muestran partículas de forma esférica y monodispersas, aunque bien es verdad que no toda la muestra presentaba estas características, como puede también apreciarse en la imagen de la izquierda de la [Figura 16](#), donde se pueden observar varias nanopartículas irregulares y aglomeradas. De todas formas, no se sabe cuándo se produce esta aglomeración, y podría ocurrir durante el secado para la preparación de los especímenes para el TEM.

Las imágenes del TEM permitieron obtener los tamaños de partícula mediante el uso del software ImageJ y el análisis de los datos mediante Matlab. La comparativa de los resultados se muestra en la [Figura 17](#), y como puede observarse, las deducciones preliminares que se obtuvieron de la observación de las imágenes referentes a la homogeneidad de las muestras quedan confirmadas, ya que la [Figura 17A](#) y [B](#) muestran una campana mucho más ancha que la que se obtiene en la [Figura 17C](#), donde el pico es mucho más pronunciado. Además, también se ve que los dos primeros lotes muestran tamaños medios mucho más pequeños que el lote restante, ya que se encuentran más desplazados hacia la izquierda.

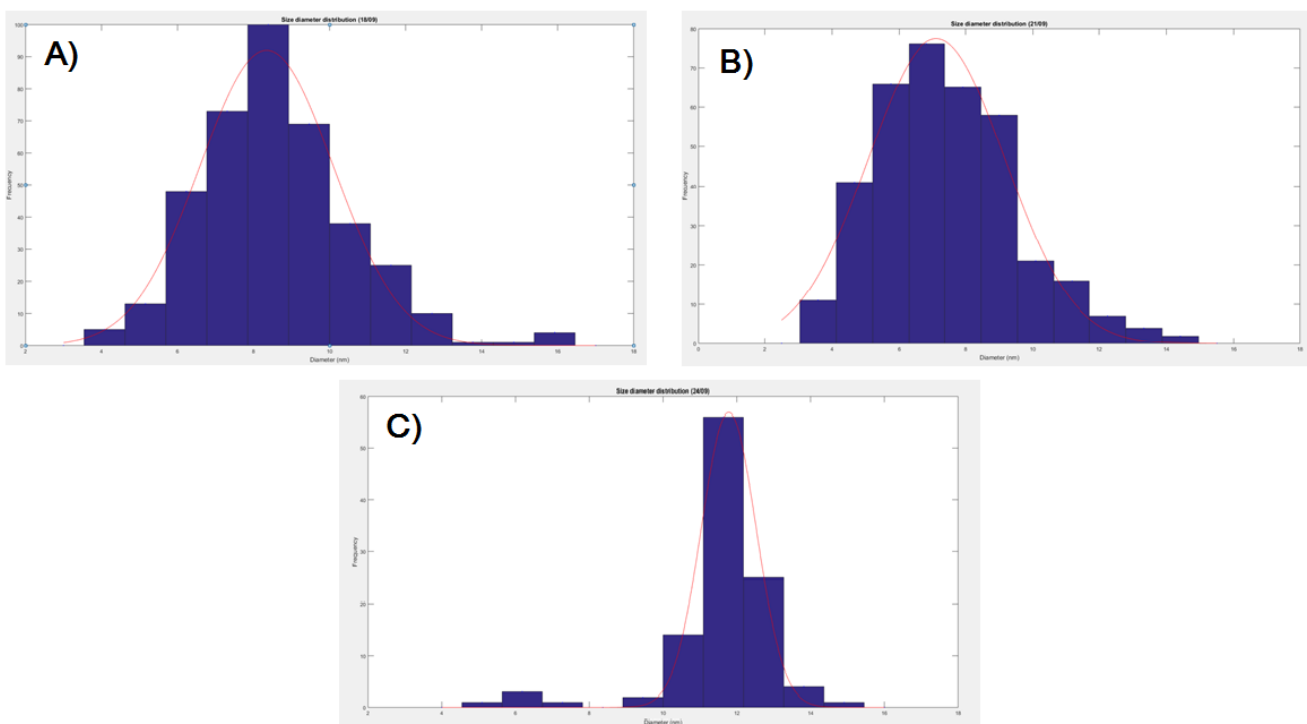


Figura 17. Distribuciones de tamaño (eje x en nanómetros) obtenidas para A) Lote I, B) Lote II y C) Lote III de las nanopartículas sintetizadas.

En la Tabla 11 se recogen los diferentes diámetros medios obtenidos para cada uno de los lotes de nanopartículas analizados. Con estos datos, se ve nuevamente como los dos primeros lotes presentan unas nanopartículas más pequeñas que el último.

Tabla 11. Diámetro medio obtenido para cada uno de los lotes de nanopartículas sintetizadas.

	Lote I	Lote II	Lote III
Síntesis	Atmósfera oxidante	Atmósfera oxidante	Atmósfera de N ₂
Recubrimiento	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico
Diámetro medio (nm)	8.7	7.4	11.5

➤ **Concentración de nanopartículas**

El análisis termogravimétrico permite ir midiendo el peso de una muestra en función del tiempo o la temperatura bajo una atmósfera controlada. Esto permite obtener los valores de la concentración a la que se encuentran las nanopartículas en cada uno de los lotes. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones obtenidas mediante análisis termogravimétrico.

	Lote I	Lote II	Lote III
Concentración (mg/mL)	15 ± 2	18 ± 3	21 ± 3

Como puede observarse, la mayor concentración se logra en el lote III de nanopartículas comparado con los otros lotes, indicando un mayor rendimiento en el proceso de síntesis de las mismas.

➤ **Grupos funcionales. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier**

El FTIR ofrece un análisis cualitativo de muestras orgánicas e inorgánicas, en las que se identifican los enlaces químicos de una molécula gracias a la obtención de un espectro de absorción infrarroja. Dicho espectro produce una huella característica de la muestra, y se usa para detectar los grupos funcionales que se hayan formado y obtener así información de los enlaces covalentes presentes.

En la Figura 18 se pueden observar los espectros obtenidos para los tres lotes de nanopartículas que se sintetizaron. Como primer resultado se puede ver como los tres espectros son muy similares, por lo que la composición de las nanopartículas sintetizadas es muy similar. Por otro lado, en la Figura 19 se puede observar el espectro de referencia del ácido poliacrílico, cuyos picos coinciden con los que se obtienen en los espectros de las nanopartículas, por lo que se puede concluir que el recubrimiento de las nanopartículas con el polímero utilizado, en este caso, ácido poliacrílico, se llevó a cabo de forma satisfactoria.

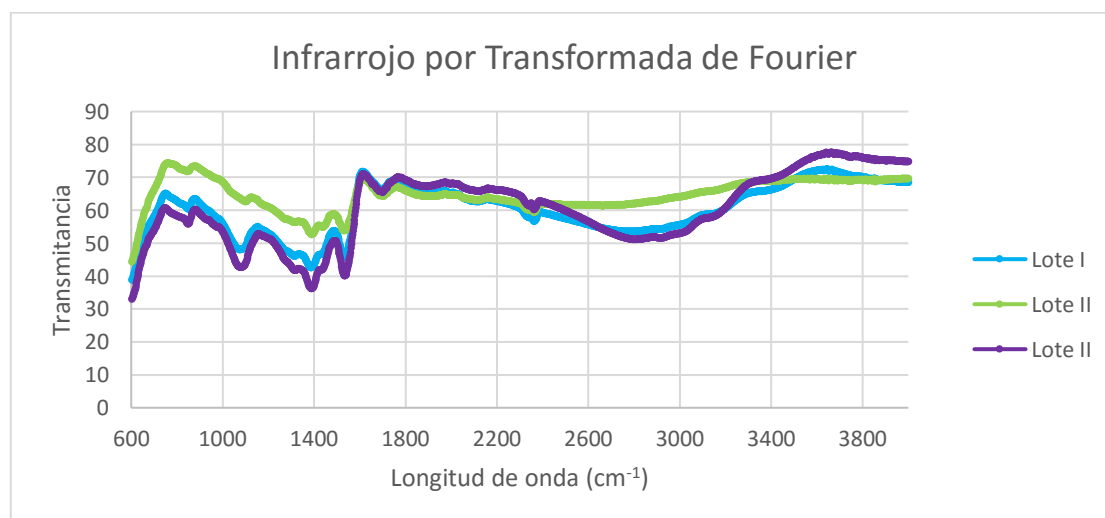


Figura 18. Espectros FTIR obtenidos para los tres lotes de nanopartículas sintetizadas.

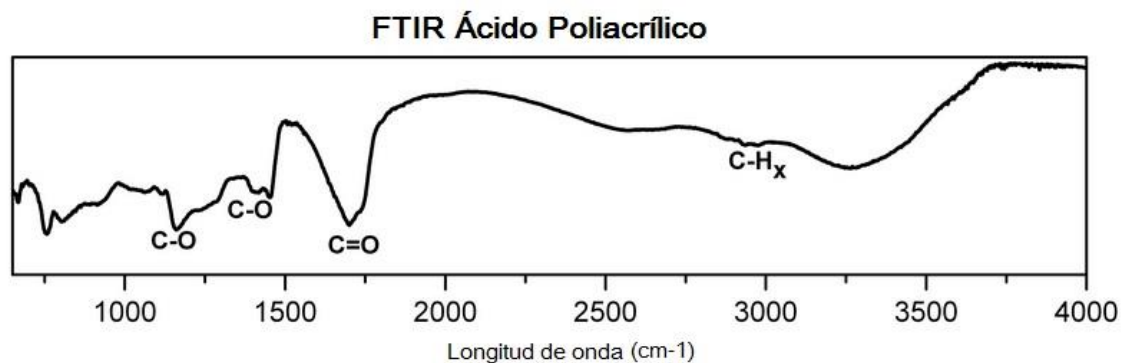


Figura 19. Espectro FTIR de referencia del ácido poliacrílico. Obtenido de [58]

➤ **Magnetización y susceptibilidad magnética**

Para determinar las características magnéticas de las nanopartículas sintetizadas, parámetro muy importante para su posterior aplicación, se utilizó un magnetómetro de muestra vibrante, que mide el momento magnético de la muestra cuando ésta vibra en presencia de un campo magnético estático permitiendo obtener así la magnetización y la susceptibilidad magnética. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20, y como puede observarse en la misma, todos los lotes de nanopartículas sintetizados presentan la curva típica de un material superparamagnético. Esto es importante, ya que es una característica principal que han de cumplir las nanopartículas para su posterior cuantificación en el NPSensor.

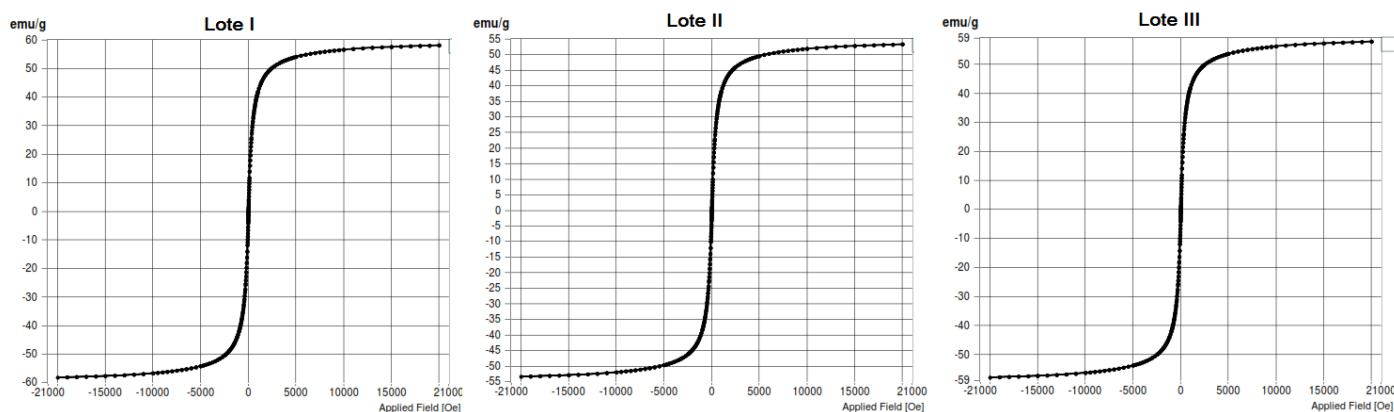


Figura 20. Curvas de histéresis obtenidas para la caracterización magnética de cada una de las nanopartículas sintetizadas en el laboratorio.

4.2. Desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral para la detección de troponina I

i. Desarrollo del inmunoensayo con nanopartículas de oro

Debido al gran color que presentan las nanopartículas de oro, éste ensayo se usó como referencia para seguir visualmente el desarrollo del inmunoensayo.

La conjugación de las AuNPs se llevó a cabo única y exclusivamente con el anticuerpo comercial de HyTest 19C7. Los resultados obtenidos con los diferentes sándwich que se llevaron a cabo posteriormente para la validación del inmunoensayo con nanopartículas de oro se muestran en la [Figura 21](#), donde se pueden ver las tiras obtenidas para un blanco y una muestra (troponina = 1675 ng/mL). Se puede observar tanto en la [Figura 21B](#) como en la [Figura 21C](#), no hay ningún aumento de intensidad en la línea de test cuando se ha puesto troponina en la muestra, indicando que el sándwich no se forma y por tanto no habrá forma de detectar el analito presente, aun cuando el test se ha llevado a cabo correctamente al evidenciarse la línea de control. Ambos formatos son los que incluyen los anticuerpos de producción propia como anticuerpos de captura, por lo que indican que se encuentran en mal estado y/o se han degradado al ser depositados en la membrana de la tira. En cuanto a la [Figura 21A](#), se puede observar un aumento significativo de la intensidad de la línea de test cuando hay troponina en la muestra, indicando que el analito se ha unido al anticuerpo de captura (Ab560) y a su vez al anticuerpo de detección (Ab19C7), formándose el ansiado sándwich. Existiría otra posibilidad de formato que se reflejó en la [Figura 10](#), pero que no se tuvo la posibilidad de realizar para la validación del inmunoensayo con las nanopartículas de oro. Sin embargo, dicha posibilidad se estudió más tarde con las nanopartículas magnéticas.

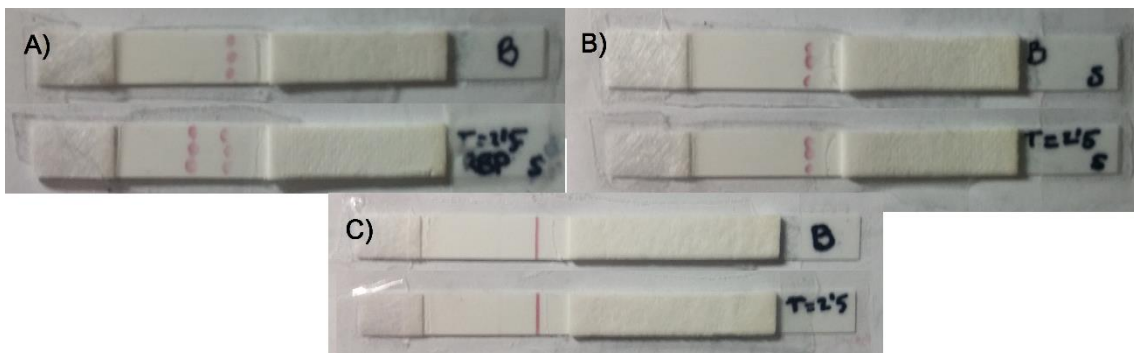


Figura 21. Tiras obtenidas con los diferentes formatos de sandwich con los que se probó: A) Sandwich 1 B) Sandwich 2 y C) Sandwich 3. La tira marcada con una B se corresponde con un blanco (ausencia de troponina en la muestra). La línea de test se encuentra trazada siempre a la izquierda de la figura.

ii. Desarrollo y optimización del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas

Una vez validada la formación del sándwich cuando se usan AuNPs, se comenzó con el desarrollo y optimización del mismo pero utilizando como marca las nanopartículas superparamagnéticas. Aunque el trabajo realizado comprende el proceso global del mismo, que englobaría desde la síntesis de las nanopartículas hasta su uso final, no se pudo llevar a cabo todo el proceso y para éste paso se utilizaron unas nanopartículas de magnetita también superparamagnéticas, con un diámetro medio de 12 nanómetros y recubiertas de ácido poliacrílico cedidas por el Dr. Yury Kolenko del Instituto Internacional de Nanotecnología de Braga (Portugal) en el marco de una colaboración de investigación.

❖ Funcionalización de las nanopartículas de magnetita

La evaluación de la funcionalización de las nanopartículas se llevó a cabo mediante la técnica conocida como DLS⁹, cuyo funcionamiento ya se basa en la medición de la velocidad de las partículas debido al movimiento Browniano y que es detectado mediante las fluctuaciones que produce en un haz láser. El diámetro que mide el DLS se refiere al radio con el que las partículas difunden en un fluido, y se llama por tanto, diámetro hidrodinámico.

Con la funcionalización, lo que se pretende es unir el anticuerpo de detección a la superficie de las nanopartículas mediante un enlace covalente, tal y como se ha comentado anteriormente. Si esta unión se lleva a cabo, se deberá observar un aumento en la distribución de tamaños que presenta la muestra tras la funcionalización. En la [Figura 22](#) se pueden observar los resultados obtenidos en el DLS para las nanopartículas solas (NPs) y para las ya funcionalizadas con el anticuerpo (NP@19C7). Como se observa, se produce un desplazamiento claro de la distribución de tamaños, indicando que los componentes de la muestra son ahora mayores, y por tanto se ha llevado a cabo la funcionalización correctamente.

⁹ Por sus siglas en inglés: Dynamic Light Scattering

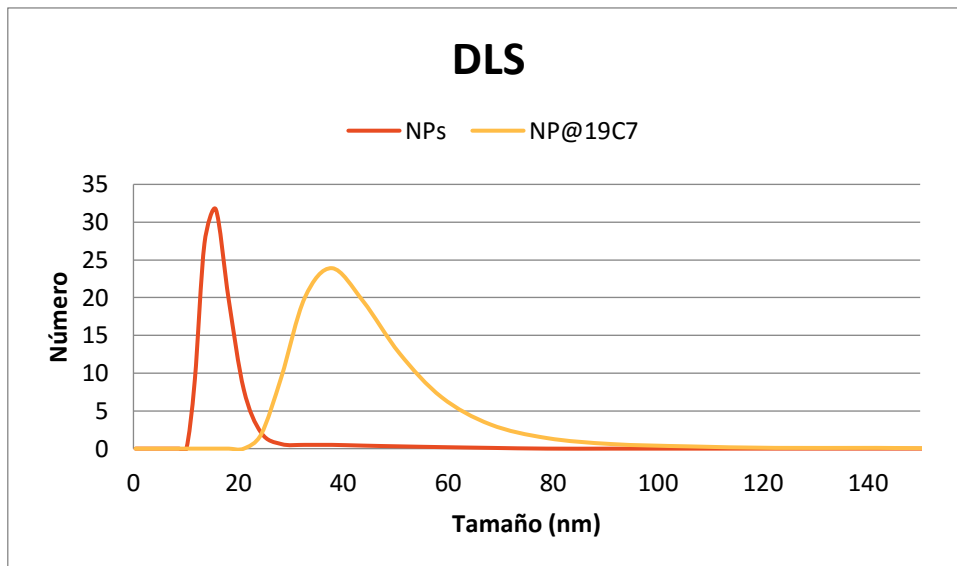


Figura 22. Gráfico de DLS de las nanopartículas obtenido antes y después de la funcionalización de las mismas.

❖ Evaluación del lavado de las membranas

Dado que algunos anticuerpos son poco estables cuando se inmovilizan en las membranas debido a aditivos introducidos por los fabricantes, se decidió probar el efecto del lavado de las membranas para retirar dichos aditivos.

Las tiras obtenidas cuando se llevó a cabo el lavado de las membranas se muestran en la Figura 23, para cada uno de los tres *running buffer* con los que se trabajó. No se observa ningún cambio apreciable en el resultado que se obtiene en las tiras, y es que la señal no disminuye. Sin embargo, cuando se llevaban a cabo cada una de las diferentes muestras se observaba como el flujo de ascenso que se producía en las membranas era completamente irregular en el caso de las membranas lavadas, mientras que cuando no se llevaba a cabo este procedimiento, el frente de ascenso era plano. Como se ha comentado anteriormente, la nitrocelulosa es un material hidrofóbico, al que se le añaden aditivos para contrarrestar este carácter. Con el lavado, dichos aditivos se eliminaban, como se podía comprobar al retirar el agua de lavado con cierta espumilla, y por tanto, se dificultaba el avance de la muestra por la membrana. Con estos hechos, se decidió trabajar con las membranas sin lavar, para tener un mejor frente de ascenso.

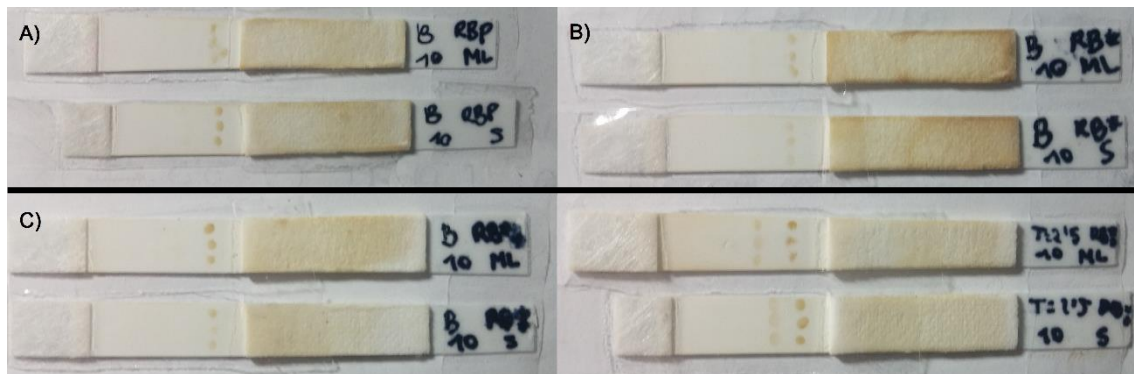


Figura 23. Tiras de flujo lateral obtenidas con las membranas lavadas (ML) y sin lavar (S): A) Blanco con running buffer 1, B) Blanco con running buffer 2 y C) Blanco (izquierda) y muestra (derecha, troponina = 1675 ng/mL) con running buffer 3.

❖ Elección del sándwich más adecuado para el inmunoensayo

Durante la validación del inmunoensayo con las AuNPs, los resultados obtenidos demostraron que los anticuerpos de producción propia de los que se disponía no daban los resultados adecuados, ya que no se consiguió que se formase el sándwich. Esto podría ser debido a que habría interacciones estéricas con el otro anticuerpo, impidiendo la unión al analito o que los anticuerpos ya no se encontrasen en buen estado. Debido a esto se decidió trabajar únicamente con los anticuerpos comerciales, probando diferentes configuraciones de detección o captura. En la [Figura 24](#) se puede ver la secuencia de aminoácidos que forman la troponina I y la secuencia a la que van específicamente dirigidos los anticuerpos 19C7 y 560 de los que se disponía. Como puede observarse, parece una secuencia bastante separada como para que el sándwich se forme.

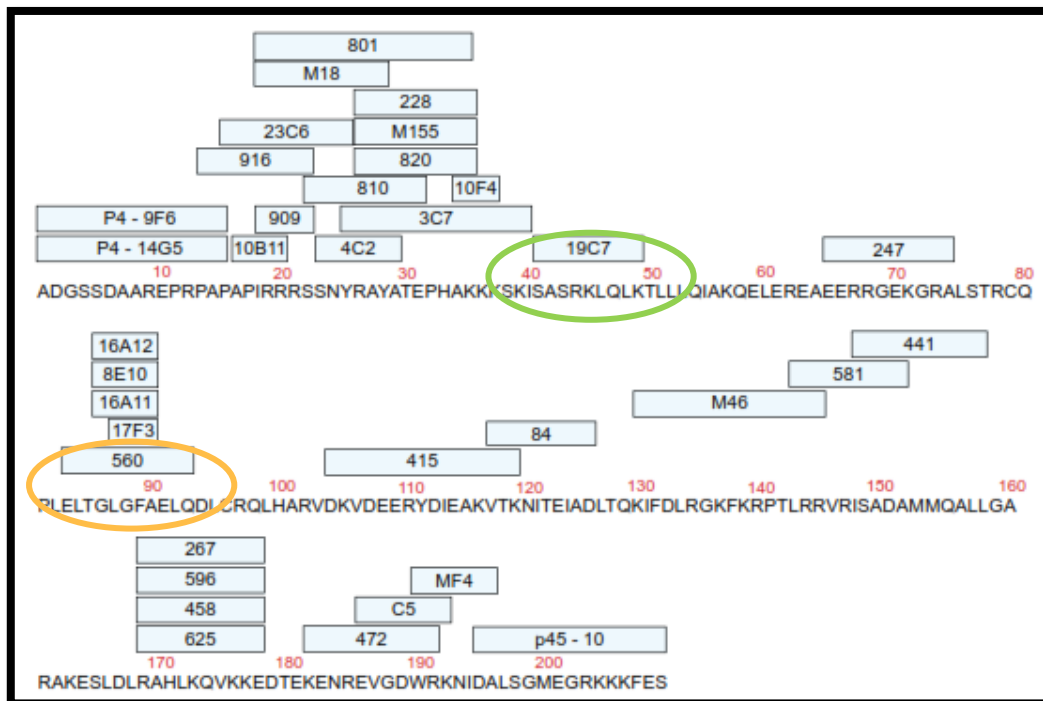


Figura 24. Secuencia de aminoácidos a la que van dirigidos los dos anticuerpos comerciales de los que se disponía durante este trabajo. Imagen obtenida y adaptada de HyTest Ltd.

Los ensayos que se llevaron a cabo se muestran en la Figura 25, donde se pueden observar las tiras obtenidas. En la Figura 25A se observan los resultados para el sándwich 1, formado por el anticuerpo 19C7 como anticuerpo de detección y el 560 como captura, para nanopartículas funcionalizadas con diferentes volúmenes de las mismas (8 y 11 μL respectivamente). En la Figura 25B, sin embargo, los resultados son los obtenidos cuando se invierte el sándwich, es decir, cuando se utiliza el anticuerpo 560 como anticuerpo de detección y el 19C7 como anticuerpo de captura, para los mismos volúmenes de nanopartículas en la funcionalización y denominado sándwich 2. Como puede comprobarse, las interacciones específicas que se dan cuando se trabaja con el sándwich 2 son mucho mayores, ya que los blancos obtenidos son muy grandes, para ambos volúmenes de nanopartículas. Sin embargo, los blancos que se obtuvieron para el sándwich 1 son razonables y podrían intentar reducirse, por ejemplo, mediante la adición de más agentes bloqueantes o subiendo la cantidad de surfactantes de la muestra. Con estos datos se decidió continuar trabajando con el sándwich 1.

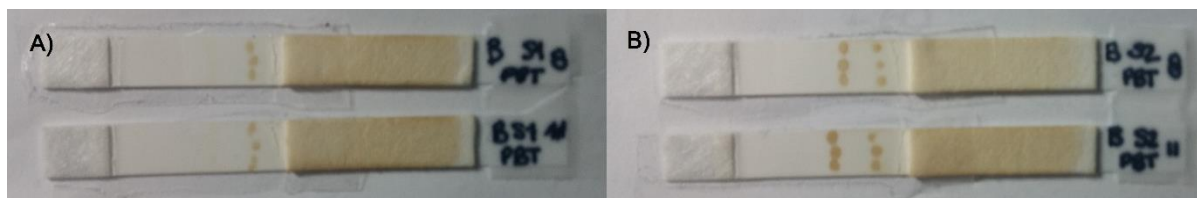


Figura 25. Comparación de las tiras obtenidas para cada uno de los dos sánwich probados: A) Ab de detección: 19C7 Ab de captura: 560 y B) Ab de detección: 560 y Ab de captura: 19C7.

❖ Selección del *running buffer* más adecuado para el inmunoensayo

El fin con el que se usa el medio de medida o *running buffer* en las tiras de flujo lateral es el de poner en contacto los reactivos y la muestra y ayudarles a fluir de la mejor forma posible a lo largo de la membrana, dando lugar así a las interacciones pertinentes entre los componentes de la muestra. Son varios los compuestos que se pueden añadir a éste, principalmente encaminados a la mejora del flujo, que tendrá como consecuencia la reducción de las interacciones inespecíficas. Además, suele ser habitual añadir cierta cantidad de agentes de bloqueo, como los que se usan durante esta etapa en la funcionalización de las nanopartículas, para así reducir también dichas interacciones inespecíficas.

En este trabajo se han utilizado tres medios de medida diferentes, cuya composición se encuentra recogida en la Tabla 4 y cuyos resultados con las tiras de flujo lateral se muestran en la Figura 26. Como se puede observar en dicha figura, el medio que proporcionó mejores resultados fue el tercero, ya que es el que consigue un mejor blanco, es decir, la menor cantidad de interacciones inespecíficas a la vez que permite ver una señal clara cuando en la muestra se encuentra el analito. Entre los otros dos restantes, el *running buffer* 1 también proporciona un buen blanco, aunque el aumento de la señal no es tan claro cuando se añade la troponina. Por último, cuando se usa el medio de medida 1 no se aprecia casi un incremento en la intensidad observable de la línea de test comparándolo con el blanco, por lo que no es recomendable su uso. Con éstos resultados, se eligió para continuar con los ensayos el medio 3, cuya composición se muestra a continuación.

Tabla 13. Composición del *running buffer* seleccionado.

<i>Running Buffer 3</i>
PBS (10mM, pH 7,4)
0,05 (v/v) Tween20
1% (p/v) BSA

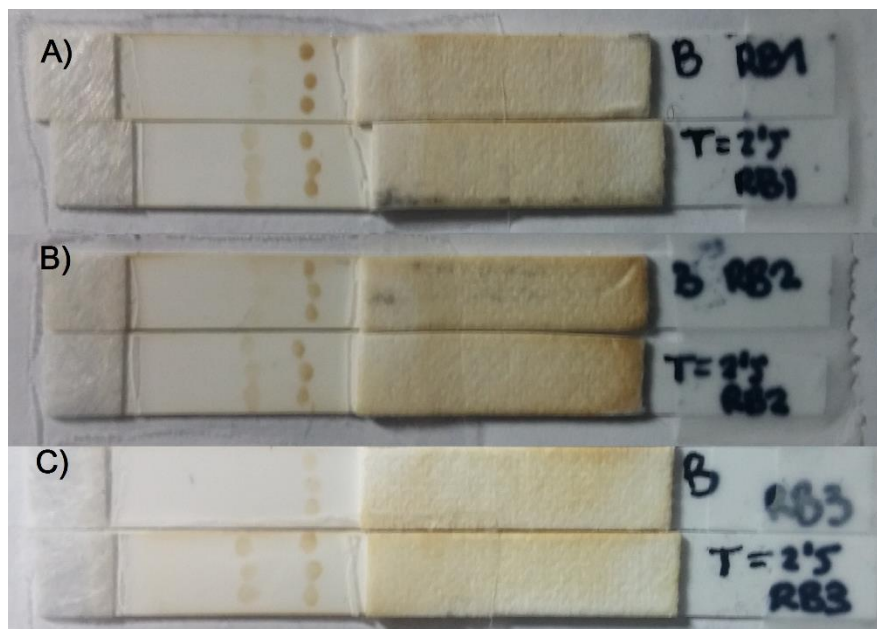


Figura 26. Blanco y muestra (Troponina = 1675 ng/mL) obtenidas con cada uno de los running buffers estudiados. A) Running Buffer 1, B) Running Buffer 2 y C) Running Buffer 3.

A medida que se hacían algunas pruebas más, se llevó a cabo una modificación en la cantidad de surfactante Tween20 que se añadía al *running buffer* elegido anteriormente, incrementándose desde un 0,05% (v/v) a un 0,15% (v/v), ya que como se muestra en la Figura 27, la señal obtenida es mucho más intensa y el blanco apenas se incrementa. Por tanto, la composición final del *running buffer* utilizado se muestra en la Tabla 14.



Figura 27. Tiras de flujo lateral obtenidas con A) 0,05% (v/v) de Tween20 y B) 0,15% (v/v) de Tween20.

Tabla 14. Composición final del running buffer utilizado.

Running Buffer 3
PBS (10mM, pH 7,4)
0,15 (v/v) Tween20
1% (p/v) BSA

❖ Estudio de los diferentes agentes de bloqueo durante la funcionalización de las nanopartículas

Se ha comentado anteriormente que la etapa de bloqueo es una de las más importantes durante el proceso de funcionalización de las nanopartículas, ya que permite reducir las posibles interacciones inespecíficas que puedan tener lugar cuando la muestra fluye por la membrana, (y que dan lugar a falsos positivos) y disminuir las señales del blanco. Las moléculas añadidas en ésta etapa, conocidas como agentes de bloqueo, tienen como misión la de situarse en los sitios que permanezcan todavía activos o en la superficie no recubierta de las nanopartículas. Normalmente la interacción de los agentes de bloqueo se debe a interacciones por cargas electrostáticas. En los experimentos se probó con BSA y caseína. En la [Figura 28](#) se observan las dos tiras que se obtuvieron, correspondiendo la de la izquierda al bloqueo con BSA mientras que las de la derecha se corresponden con el bloqueo con caseína. Para ambas, la primera tira es el blanco y la segunda una muestra (Troponina = 670 ng/mL). Como puede comprobarse, el bloque con caseína elimina casi por completo la señal obtenida, incluso la de la línea de control, no obteniéndose ningún aumento en la misma cuando hay analito en la muestra. Esto se debe a que quizás, la cantidad de caseína que se usó fue elevada y se bloquearon además de los sitios aun activos, también los sitios de unión, eliminando la posibilidad de formar el sándwich en el inmunoensayo. Con estos datos, se decidió continuar con BSA a lo largo de los demás experimentos, ya que es capaz de reducir el blanco sin afectar considerablemente a la señal.

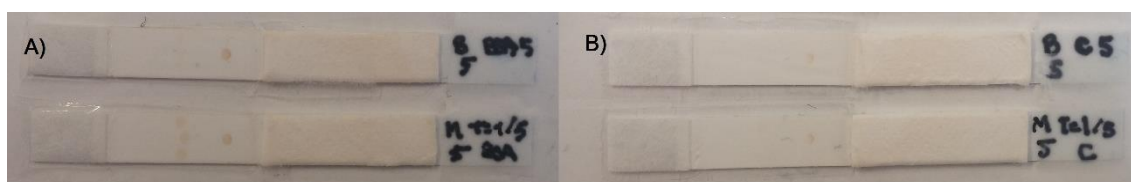


Figura 28. Comparación de las tiras de flujo lateral obtenidas cuando se usan diferentes agentes de bloqueo: A) 1,5% (p/v) BSA y B) 1% (p/v) Caseína.

❖ Optimización de la cantidad de nanopartículas magnéticas en la funcionalización

La cantidad de nanopartículas que se funcionalizan fue el último parámetro que se trató de optimizar para la obtención de los parámetros finales del inmunoensayo. Se probaron con varias cantidades que se reflejaron en la [Tabla 6](#). En la [Figura 29](#) se pueden observar los resultados obtenidos. La primera tira ([Figura 29A](#)) se utilizaron 3 μ L de nanopartículas y puede comprobarse cómo aunque no hay blanco, la línea de control obtenida es muy tenue, indicando que hay muy poca nanopartícula. La [Figura 29B](#), [Figura 29C](#) y [Figura 29D](#)

muestran las tiras que se obtienen cuando se durante la etapa de conjugación del anticuerpo se funcionalizan unos volúmenes de 5, 8 y 11 μL de disolución de nanopartículas, respectivamente. Como puede comprobarse no hay una clara diferencia entre las intensidades de las señales que se obtienen, ya sea para el blanco o la muestra (troponina = 1675 ng/mL), por lo que a la vista de estos resultados se decide trabajar con la menor cantidad de disolución de conjugado que proporcione la mejor señal, siendo en este caso 5 μL .

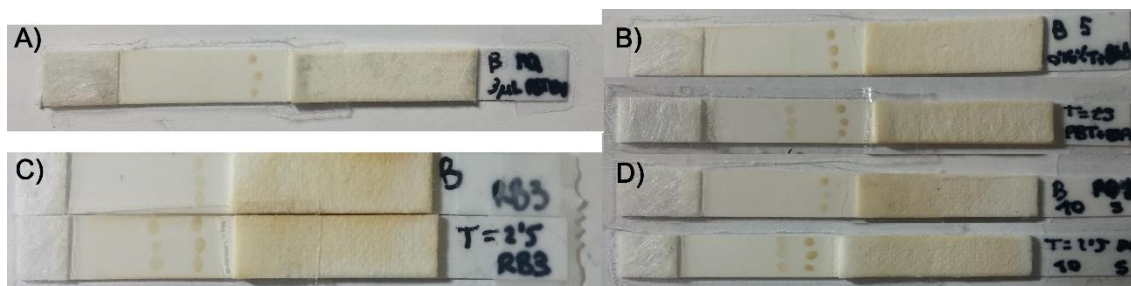


Figura 29. Diferentes tiras obtenidas con las diferentes cantidades de nanopartículas utilizadas para la funcionalización de las mismas: A) 3 μL , B) 5 μL , C) 8 μL y D) 11 μL .

Con todos estos resultados obtenidos para la optimización del inmunoensayo, éste se llevó a cabo con las condiciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 15. Condiciones finales con las que se llevaron a cabo los inmunoensayos.

SÁNDWICH	RUNNING BUFFER	VOLUMEN NPs
Ab detección: 19C7 Ab captura: 560	PBS (10mM, pH 7,4) 0,15 (v/v) Tween20 1% (p/v) BSA	5 μL

4.3. Cuantificación de la troponina mediante el NPSensor

i. Obtención de la curva de calibrado de las nanopartículas magnéticas

La calibración del sensor con las nanopartículas utilizadas para la obtención del inmunoensayo se llevó a cabo, y se obtuvo la gráfica que se muestra en la [Figura 30](#). Como puede comprobarse, a medida que la cantidad de nanopartículas medida aumenta, la señal obtenida también lo hace y de una forma prácticamente lineal.

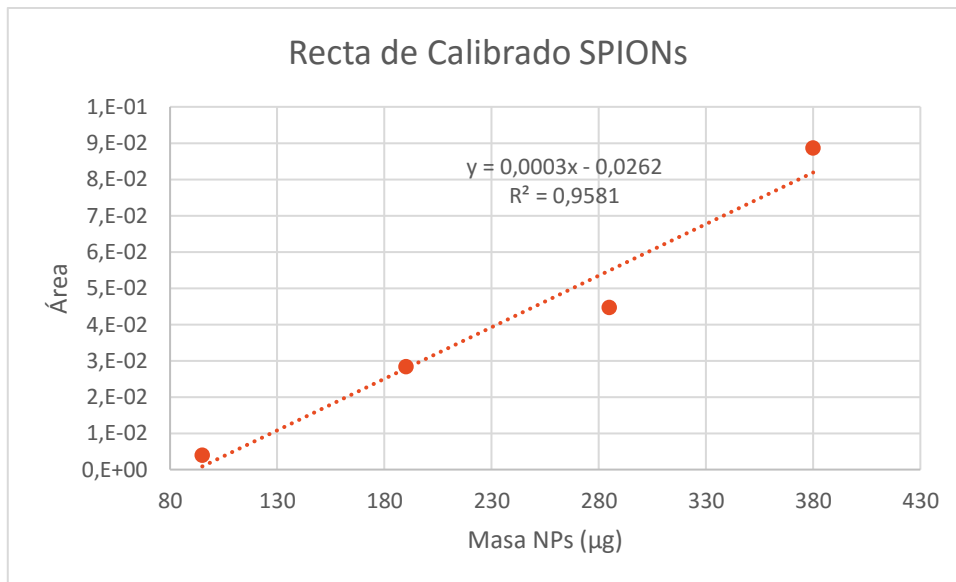


Figura 30. Curva de calibrado de las nanopartículas utilizadas para la obtención del inmunoensayo.

ii. Cuantificación de las tiras de flujo lateral

La cuantificación de las tiras de flujo lateral se llevó a cabo mediante la metodología descrita en secciones anteriores. En la [Figura 31](#) se observa una señal obtenida para una de las tiras (que también se muestra en dicha imagen). La señal obtenida es muy similar a los picos que se obtienen en otras técnicas analíticas y su valor, correspondiente con el área bajo la curva, se obtiene de la integración de la misma.

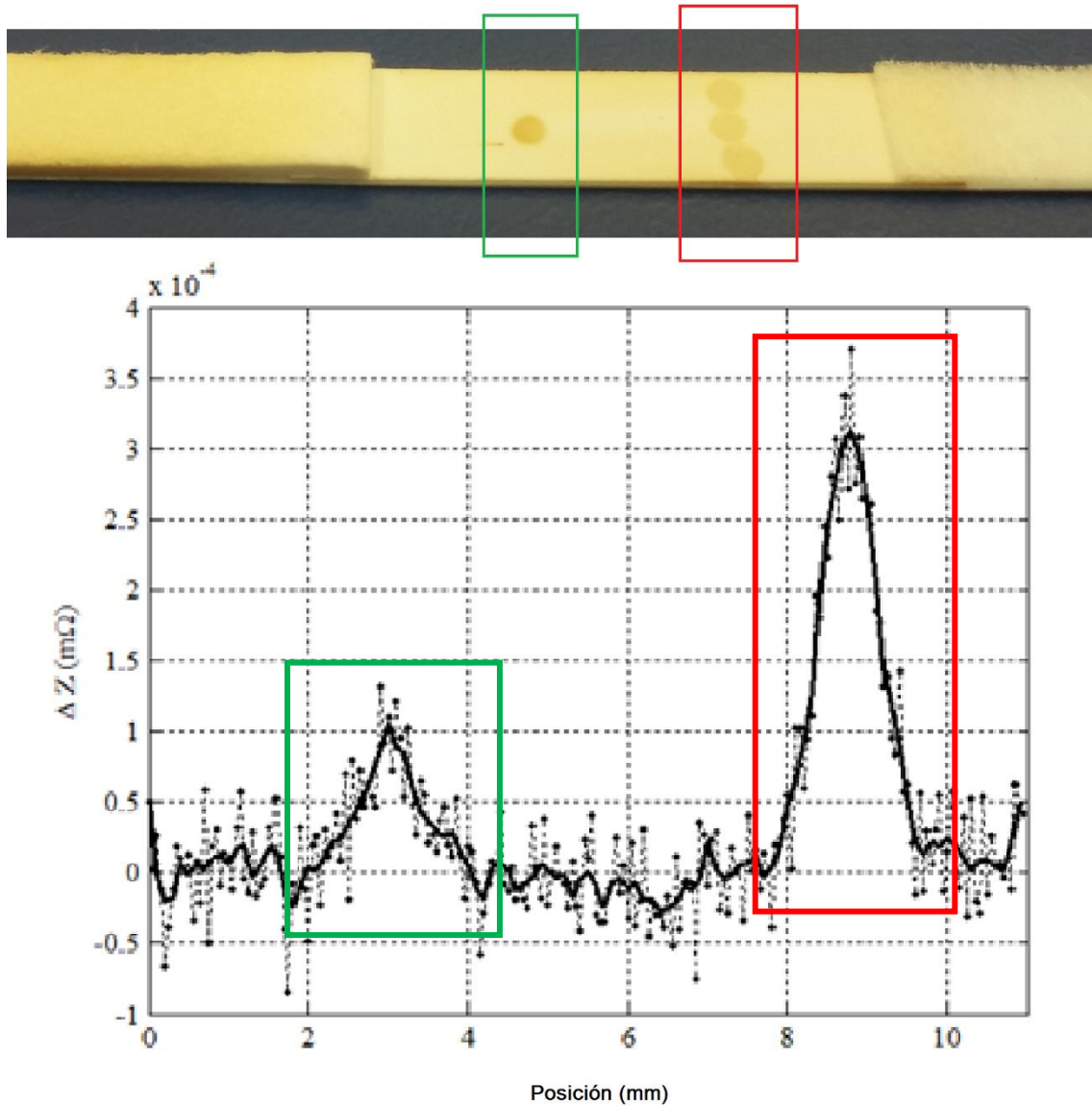


Figura 31. Tira de flujo lateral y la señal correspondiente obtenida tras el barrido de la misma con el NPSensor. En verde, la señal obtenida para la línea de control y en rojo la señal de la línea de test.

La curva que se obtiene después de tratar los datos, en la que se muestran también las barras de errores (desviación estándar de los mismos) se encuentran en la Figura 32. Se puede comprobar que a medida que la cantidad de troponina presente en la muestra aumenta, también lo hace la señal obtenida en el NPSensor. Esto es debido a que a mayor cantidad de analito presente, más se unirá éste tanto al anticuerpo conjugado con las nanopartículas como los anticuerpos específicos de captura, quedando retenido en la línea de test. De esta forma, la señal magnética que se obtiene es cada vez mayor debido a la también cada vez mayor presencia de nanopartículas.

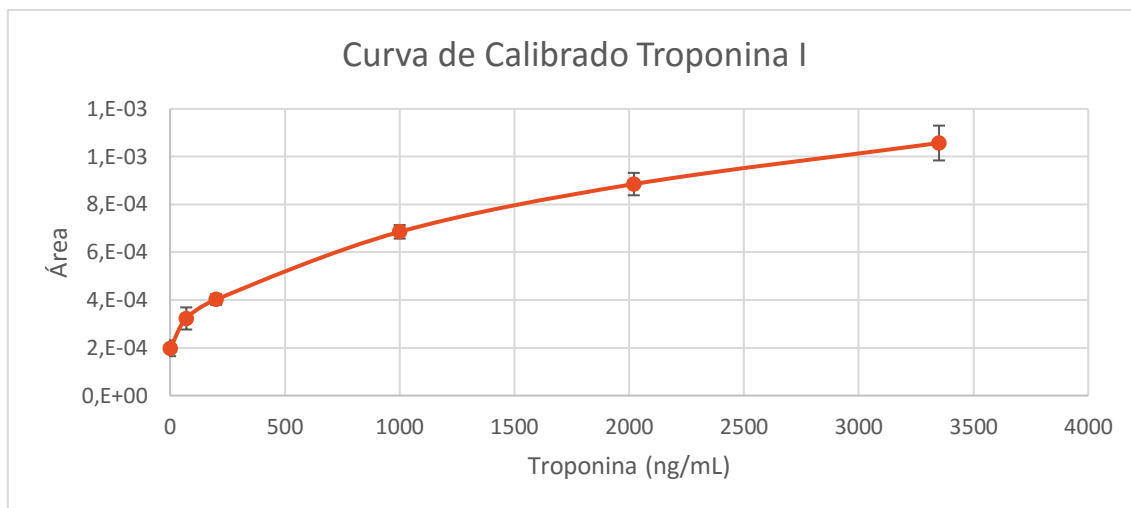


Figura 32. Curva de calibrado obtenida para la Troponina.

También puede comprobarse cómo existe una variación en la señal para cantidades pequeñas de troponina añadidas en la muestra, por lo que el método tiene sensibilidad suficiente en el rango estudiado. Sin embargo, el sistema no distingue cantidades inferiores a éstas lo que nuevamente apoyaría la hipótesis de una mala unión entre el anticuerpo de detección y las nanopartículas por enlace covalente. Es necesario que haya mucha troponina para que ésta se una al paratopo del anticuerpo, por lo parece haber algún impedimento estérico que lo condicione y/o impida. Como mejora de la sensibilidad para rangos más pequeños de concentración se podría actuar en varios frentes, como se comentará más adelante, para incrementar la cantidad de señal magnética. Estas estrategias también deben actuar en la dirección de obtener una relación lineal que no se observa en la [Figura 32](#).

❖ Estudio de la variación de la señal magnética con la cantidad de anticuerpo de detección utilizada durante la funcionalización

Uno de los estudios que se llevó a cabo viendo los resultados obtenidos anteriormente, fue el aumento de la cantidad de anticuerpo que se llevó a cabo durante la funcionalización, para comprobar que la cantidad presente de estos no fuese lo que estuviese limitando la señal de troponina que se obtenía. En la [Figura 33](#) se observan los resultados obtenidos una vez que las tiras se han medido con el NPSensor. Como puede comprobarse, el añadir más anticuerpo o no durante la etapa de conjugación no parece tener una gran relevancia en la señal obtenida.

Uno de los indicios que ya se atisban en este punto del trabajo es que es posible que el enlace covalente entre las nanopartículas y el anticuerpo el que dificulte, debido a la forma

en que se lleva a cabo, la correcta unión específica antígeno – anticuerpo, perdiendo por tanto señal.

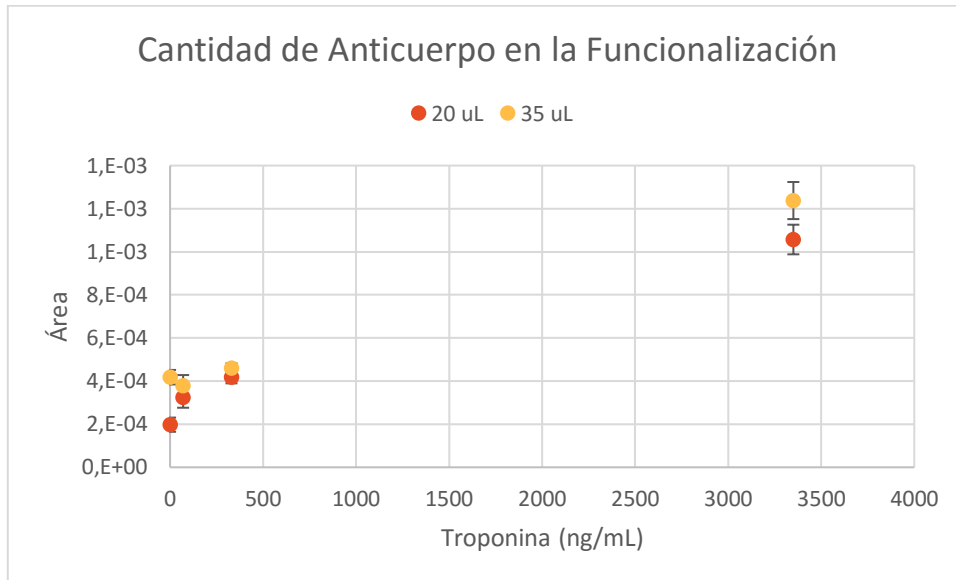


Figura 33. Valores obtenidos para diferentes cantidades de troponina cuando en la funcionalización de las nanopartículas se han utilizado diferentes cantidades de anticuerpo.

❖ Estudio de la variación de la señal magnética con la concentración del anticuerpo de captura depositado en la tira

Por último se realizó un estudio para comprobar cómo varía la señal de las muestras obtenidas cuando se deposita el anticuerpo de captura en la membrana con una concentración mucho mayor, que en este caso se dobló a 2 mg/mL en referencia a con la que se estaba trabajando, 1 mg/mL. Los resultados obtenidos para diferentes muestras de troponina se muestran en la Figura 34, y como puede observarse no se ve mucha diferencia entre ambas señales, por lo que este resultado nuevamente indica que el problema se encuentra en el anticuerpo de detección, y en concreto, en la unión covalente a las nanopartículas. De no ser así, al unirse el analito al anticuerpo de detección y haber más sitios para su unión al anticuerpo de captura, ya que estos se encuentran ahora en mayor proporción, la señal magnética debería aumentar considerablemente, pero no lo hace.

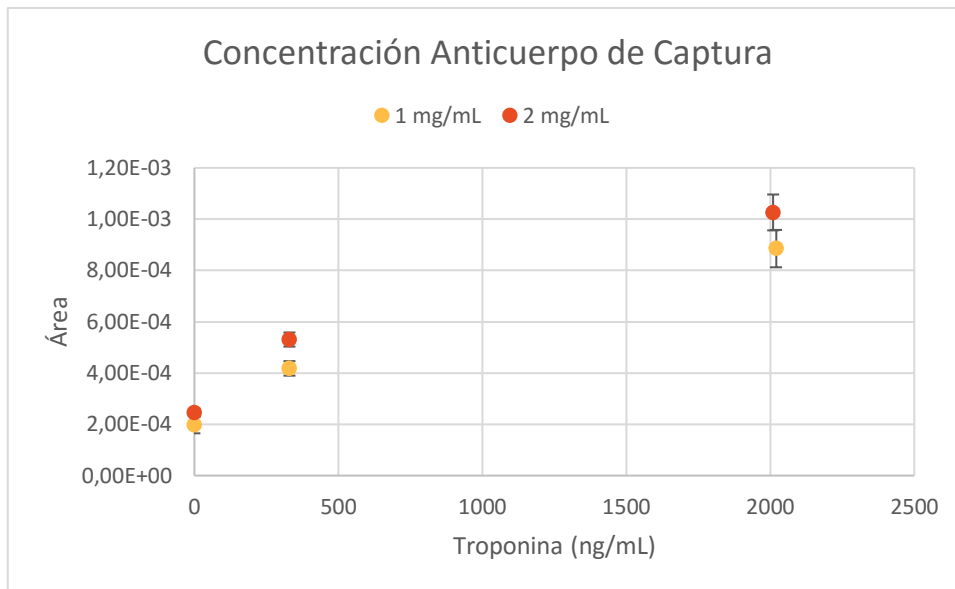


Figura 34. Comparación de las señales obtenidas cuando se varía la concentración del anticuerpo de captura (Ab560) depositado en la membrana de las tiras.

4.4. Comparación de las medidas magnéticas con medidas de reflectancia

Cuando se trabaja con tiras de flujo lateral la cuantificación (aunque suele considerarse todavía como semicuantitativa) mediante sensores ópticos es la opción más habitual. Incluso suele utilizarse como validación cuando se propone un nuevo método. En la [Figura 35](#) se muestran las señales obtenidas para la curva de calibrado realizada para la Troponina cuando son obtenidas con el sensor óptico de reflectancia y con el NPSensor. Como puede observarse, aunque la tendencia que siguen las medidas es idéntica para ambas, se puede comprobar como las medidas ópticas tienen una mayor variabilidad, seguramente debido al hecho de que las condiciones para obtenerlas, como por ejemplo la cantidad de humedad presente todavía en la tira, han de ser siempre las mismas y esto es difícil de conseguir. Las medidas magnéticas sin embargo, muestran mucha menos variabilidad, y por tanto mucha más precisión, indicando que el método magnético desarrollado muestra más robustez que el óptico.

Por otro lado, el método magnético presenta mayor sensibilidad para cantidades pequeñas de troponina comparado con el sensor óptico, ya que los valores obtenidos con éste último muestran una mayor variabilidad ya comentada.

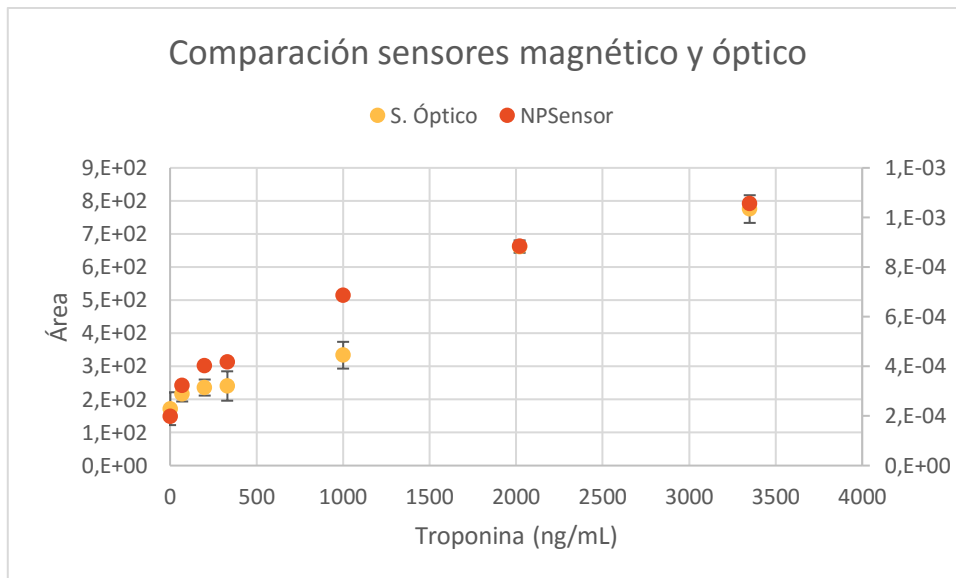


Figura 35. Comparación de las señales obtenidas para la curva de calibrado de Troponina I mediante el sensor óptico y el NPSensor.

5. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Máster se ha llevado a cabo el desarrollo y optimización de un inmunoensayo en tiras de flujo lateral con marcaje de nanopartículas superparamagnéticas, que hacen posible la cuantificación del analito. En este caso, el analito elegido ha sido la subunidad I de la troponina, considerada actualmente como el *golden standard* para la detección, diagnóstico y pronóstico del infarto de miocardio.

Dentro de este proceso de desarrollo, se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, con el fin de tener un control más estrecho sobre las mismas en parámetros tan importantes como el tamaño, la homogeneidad de la muestra y el recubrimiento. Dicha síntesis se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación y se demostró que el uso de una atmósfera reductora tiene gran influencia en los parámetros mencionados anteriormente.

El inmunoensayo se llevó a cabo mediante la funcionalización de las nanopartículas a través de enlace covalente al anticuerpo de detección 19C7, mientras que en las membranas de nitrocelulosa se depositó el anticuerpo de captura 560. También se seleccionó y optimizó el medio de medida, el volumen de nanopartículas y el agente de bloqueo más adecuado en dicha funcionalización.

Posteriormente, se demostró que es posible la cuantificación de la cantidad de analito presente en las tiras de flujo lateral mediante la cuantificación de las mismas en el NPSensor, debido a la variación en la impedancia que provocan las nanopartículas usadas como marca y retenidas en la línea de test al formarse el sándwich entre el anticuerpo de detección unido a su superficie y el anticuerpo de captura depositado.

Por último, se comparó la tendencia de la señal obtenida con la señal óptica obtenida de un sensor de reflectancia, que son con los que actualmente se realizan las medidas semicuantitativas en este tipo de ensayos. Los resultados muestran que tanto la señal magnética como la óptica tienen la misma tendencia, y por tanto validan el método.

6. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Las futuras líneas de investigación deben de estar centradas en dos puntos, principalmente. El primero de ellos es el aumento de la sensibilidad del método. Es necesario aumentar la señal magnética cuando la cantidad de troponina presente es baja y poder apreciar la diferencia entre estos valores. En este sentido hay diferentes técnicas de amplificación de la señal, como los aglomerados de las nanopartículas con los que se han hecho algunos experimentos ya en el laboratorio o la encapsulación de las mismas en lo que se denomina como vesículas, de forma que la señal cuantitativa se obtenga del interior magnético de las mismas y los elementos de reconocimiento vayan en su superficie. Otra de los frentes en los que se puede aumentar la sensibilidad es en la parte del sensor, principalmente en la obtención de circuitos con nuevos diseños que permitan captar la variación de señales mucho más débiles.

Como segunda línea de investigación principal y si la conclusión de que el enlace covalente no es la mejor opción para la unión entre la nanopartícula y el anticuerpo es correcta, se deben investigar nuevas formas que permitan llevar a cabo dicha unión pero que no modifiquen la estructura de la proteína, impidiendo la unión del analito, o que se unan por zonas donde esto no ocurra. Existen en la actualidad diferentes opciones para solucionar este problema, ya que se ha reportado más veces en la bibliografía. La primera de ellas sería el uso de uniones mucho más específicas, como son los aptámeros o los *nanobodies* (fragmentos de anticuerpos de un solo dominio), que permiten una unión estable y muy específica. Sin embargo, hay que tener cuidado con esta posible solución, ya que será necesario también acoplar los aptámeros a las nanopartículas y para ello, o se sintetizan estas recubiertas ya de la propia molécula funcional o será necesario usar nuevamente un enlace covalente. Otra posible opción es el uso de la denominada proteína G, que ya ha sido utilizada para resolver este problema, ya que tiene gran afinidad por el extremo final de las cadenas pesadas de los anticuerpos, por lo que es capaz de orientarlos dejando libre el paratopo, evitando cualquier impedimento estérico posible, y por tanto, favoreciendo la unión con el analito [59].

Por último, cuando todo esto se encuentre bien desarrollado, sería interesante la idea de desarrollar un ensayo en tiras de flujo lateral, pero con el formato conocido como múltiplex, donde se analizan dos compuestos diferentes en dos líneas de test diferentes, cada una con sus anticuerpos específicos correspondientes. Dirigido al tema de los

biomarcadores cardiopáticos, se ha demostrado que más de la mitad de los eventos cardiacos son asintomáticos, y por tanto es necesario buscar nuevos marcadores que predigan y adelanten los posibles acontecimientos, como por ejemplo, los biomarcadores de inflamación, como la proteína C-reactiva [23]. Podría ser interesante, por tanto, desarrollar un dispositivo *point of care* que sea capaz de evaluar tanto la troponina como esta otra proteína, permitiendo una evaluación de pronóstico rápido y mejor diagnóstico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. *Enfermedades cardiovasculares*. 2016 [21/06/2016]; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/.
2. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015*. European Heart Journal, 2015.
3. Alwan, A., *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010*, World Health Organization.
4. Health, N.I.o. *¿Qué es la arterosclerosis?* 2015 [21/06/2106]; USA.gov:[Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/atherosclerosis>.
5. Mendis, S., P. Puska, and B. Norrving, *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. 2011: World Health Organization.
6. Yusuf, S., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases: Part I: General Considerations, the Epidemiologic Transition, Risk Factors, and Impact of Urbanization*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2746-2753.
7. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. The Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-952.
8. Omran, A.R., *The epidemiologic transition. A theory of the Epidemiology of population change. 1971*. Bulletin of the World Health Organization, 2001. **79**(2): p. 161-170.
9. Gersh, B.J., et al., *Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications*. European Heart Journal, 2010. **31**(6): p. 642-8.
10. Fuster, V., et al., *Low Priority of Cardiovascular and Chronic Diseases on the Global Health Agenda: A Cause for Concern*. Circulation, 2007. **116**(17): p. 1966-1970.
11. Fuster, V., B.B. Kelly, and R. Vedanthan, *Promoting Global Cardiovascular Health: Moving Forward*. Circulation, 2011. **123**(15): p. 1671-1678.
12. Bloom, D.E., Cafiero, E.T., Jané-Llopis, E., Abrahams_Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z., & Weinstein, C., *The Global Economic Burden of Non Communicable Diseases*. 2010, World Economic Forum.
13. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are Biomarkers?* Current opinion in HIV and AIDS, 2010. **5**(6): p. 463-466.
14. Thygesen, K., et al., *Third Universal Definition of Myocardial Infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2012. **60**(16): p. 1581-1598.
15. Achar, S.A., S. Kundu, and W.A. Norcross, *Diagnosis of acute coronary syndrome*. Am Fam Physician, 2005. **72**(1): p. 119-26.
16. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. Circulation, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
17. Karmen, A., F. Wroblewski, and J.S. Ladue, *Transaminase activity in human blood*. J Clin Invest, 1955. **34**(1): p. 126-31.
18. Nigam, P.K., *Biochemical markers of myocardial injury*. Indian J Clin Biochem, 2007. **22**(1): p. 10-7.
19. Rajappa, M. and A. Sharma, *Biomarkers of Cardiac Injury: An Update*. Angiology, 2005. **56**(6): p. 677-691.
20. Caragher, T.E., et al., *Evaluation of quantitative cardiac biomarker point-of-care testing in the emergency department*1. The Journal of Emergency Medicine, 2002. **22**(1): p. 1-7.
21. Tiwari, R.P., et al., *Cardiac troponins I and T: molecular markers for early diagnosis, prognosis, and accurate triaging of patients with acute myocardial infarction*. Mol Diagn Ther, 2012. **16**(6): p. 371-81.

22. Babuin, L. and A.S. Jaffe, *Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury*. *Cmaj*, 2005. **173**(10): p. 1191-202.
23. McDonnell, B., et al., *Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing*. *Clinical Biochemistry*, 2009. **42**(7–8): p. 549-561.
24. McLaurin, M.D., et al., *Cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine kinase MB in dialysis patients without ischemic heart disease: evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle*. *Clinical Chemistry*, 1997. **43**(6): p. 976-982.
25. Melanson, S.E.F., M.J. Tanasijevic, and P. Jarolim, *Cardiac Troponin Assays: A View From the Clinical Chemistry Laboratory*. *Circulation*, 2007. **116**(18): p. e501-e504.
26. Wu, A.H.B., et al., *Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I*. *Clinical Chemistry*, 1998. **44**(6): p. 1198-1208.
27. Sandoval, Y. and F.S. Apple, *The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin*. *Clin Chem*, 2014. **60**(3): p. 455-62.
28. de Lemos, J.A., *Increasingly sensitive assays for cardiac troponins: a review*. *Jama*, 2013. **309**(21): p. 2262-9.
29. Panteghini, M., *Current concepts in standardization of cardiac marker immunoassays*. *Clin Chem Lab Med*, 2004. **42**(1): p. 3-8.
30. Han, X., et al., *Recent Development of Cardiac Troponin I Detection*. *ACS Sensors*, 2016. **1**(2): p. 106-114.
31. Lippi, G. and G. Cervellin, *Do we really need high-sensitivity troponin immunoassays in the emergency department? Maybe not*. *Clin Chem Lab Med*, 2014. **52**(2): p. 205-12.
32. *Emergency Department: Rapid Identification and Treatment of Patients With Acute Myocardial Infarction* — National Heart Attack Alert Program Coordinating Committee. *Annals of Emergency Medicine*. **23**(2): p. 311-329.
33. Lippa, P.B., et al., *Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011. **30**(6): p. 887-898.
34. Yager, P., et al., *Microfluidic diagnostic technologies for global public health*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 412-418.
35. Leuvering, J.H.W., et al., *A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin*. *Journal of Immunological Methods*, 1981. **45**(2): p. 183-194.
36. Posthuma-Trumpie, G.A., J. Korf, and A. van Amerongen, *Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. **393**(2): p. 569-582.
37. Zhang, G., J. Guo, and X. Wang, *Immunochemical Lateral Flow Strip Tests, in Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols: Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors*, A. Rasooly and K.E. Herold, Editors. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 169-183.
38. Bangs Laboratories, I., *Lateral Flow Tests*, in *TechNote 303*. 2008: www.bangslabs.com.
39. Corporation, M., *Rapid Lateral Flow Test Strips*, in *Considerations for product development*. 2008.
40. Darwish, I.A., *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2006. **2**(3): p. 217-235.
41. Quesada-González, D. and A. Merkoçi, *Nanoparticle-based lateral flow biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **73**: p. 47-63.
42. Huang, X., et al., *Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **75**: p. 166-180.
43. Tisone, T.C. and B. O'Farrell, *Manufacturing the Next Generation of Highly Sensitive and Reproducible Lateral Flow Immunoassay*, in *Lateral Flow Immunoassay*, R. Wong and H. Tse, Editors. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-26.

44. Warsinke, A., *Point-of-care testing of proteins*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(5): p. 1393-1405.
45. Xu, Q., et al., *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, 2009. **29**(3): p. 702-707.
46. Fisher, M., et al., *A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of Bacillus anthracis spores – assessment in water and dairy products*. Letters in Applied Microbiology, 2009. **48**(4): p. 413-418.
47. Taton, K., et al., *Lateral flow immunoassay using magnetoresistive sensors*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(10): p. 1679-1682.
48. Sandhu, A., et al., *High efficiency Hall effect micro-biosensor platform for detection of magnetically labeled biomolecules*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(9–10): p. 2115-2120.
49. Kiyoshi, T., et al., *High Sensitivity InSb Hall Effect Biosensor Platform for DNA Detection and Biomolecular Recognition Using Functionalized Magnetic Nanobeads*. Japanese Journal of Applied Physics, 2005. **44**(11L): p. L1494.
50. Handali, S., et al., *Development and Evaluation of a Magnetic Immunochromatographic Test To Detect Taenia solium, Which Causes Taeniasis and Neurocysticercosis in Humans*. Clinical and Vaccine Immunology, 2010. **17**(4): p. 631-637.
51. Nikitin, M.P., et al., *Highly sensitive room-temperature method of non-invasive in vivo detection of magnetic nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(10): p. 1658-1661.
52. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R167.
53. Lu, A.H., E.e.L. Salabas, and F. Schüth, *Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(8): p. 1222-1244.
54. Lago-Cachon, D., et al., *Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles*. Nanotechnology, 2013. **24**(24): p. 245501.
55. Rivas, M., et al., *Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits*. Sensors and Actuators A: Physical, 2014. **216**: p. 123-127.
56. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
57. Thobhani, S., et al., *Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins*. Journal of Immunological Methods, 2010. **356**(1–2): p. 60-69.
58. Bywalez, R., et al., *Stabilization of mid-sized silicon nanoparticles by functionalization with acrylic acid*. Nanoscale Research Letters, 2012. **7**(1): p. 1-7.
59. Ryu, Y., et al., *Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody*. BioChip Journal, 2011. **5**(3): p. 193-198.

Agradecimientos

En primer lugar quería agradecer la oportunidad que me dieron mis tutoras, Montserrat Rivas y Carmen Blanco, de empezar un nuevo proyecto en la línea de investigación en la que ellas se encontraban inmersas desde hace tiempo, y en la que tuve la suerte de colaborar mucho antes de comenzar esta aventura mucho más definida que es el Trabajo Fin de Máster. No sólo quiero darles las gracias por esto, sino también por su disponibilidad, su ayuda en cualquier momento y amabilidad en todas las situaciones, pero sobre todo por este último empujón, completamente necesario. En esta línea, también me gustaría agradecer su eficiente ayuda a José Carlos Martínez, porque siempre estaba dispuesto a despegarse de su silla dejando su trabajo y acercarse a ver qué pasaba con el sensor.

Creo que todo lo que he aprendido en estos días en el laboratorio es mucho, pero estoy completamente segura que nada hubiese sido igual si no hubiese tenido una gran compañera en esta andadura como Amanda. Han sido muchas horas y mucho trabajo, siempre en tándem y aprendiendo juntas, por lo que como ya te dicho, mucho de este trabajo es tuyo, y no sé si algún día podré agradecerte toda esta ayuda. Gracias, amiga.

Han sido muchas horas de laboratorio, tanto en Oviedo como en Gijón, y muchas de ellas se han visto amenizadas por Alba, Andrea, Olaya, Fani, Berto, Myriam, Pablo, David y Benjamín, así que gracias por ello y gracias por esas respuestas siempre amables a cualquier preguntilla que me surgía, estúpida o no.

También dar las gracias a Serena, porque tener una compañera con la que compartir los problemas del “lab” cuando llegas a casa y nada sale bien, o ni bien ni mal, porque no sale, no tiene precio. Y por último, pero no menos importante, a mi madre, porque siempre estuvo ahí para darme los buenos días con una sonrisa (aunque sea *emoticonicamente* hablando), y aunque estuviese nublado fuera, así se empiezan mucho mejor los días.