

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

***DISEÑO DE INMUNOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN
DE BIOMOLÉCULAS MARCADORAS EN EL
DIAGNOSTICO CLÍNICO***

Bioq. Silvina Vanesa Kergaravat

Directora de Tesis: Dra. Silvia Raquel Hernández
Co-directora de Tesis: Dra. María Isabel Pividori

Lugar de realización: Laboratorio de Sensores y Biosensores – Química Analítica I
– Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

-2013-

Quisiera dedicar esta tesis a

“MIS PADRES”

seres maravillosos que me han enseñado el significado de la vida a través de su AMOR, COMPRENSION, RESPETO, SABIDURIA, HUMILDAD; me han estimulado para alcanzar las metas pretendidas; me han acompañado y apoyado en cada decisión difícil; me han hecho sentir la hija más querida en el mundo entero.

Siempre serán mis guías, mis modelos a seguir...

GRACIAS MAMA por estar siempre que te necesito, por alentarme y apoyarme, por fortalecerme en los momentos de debilidades, por brindarme tu inmenso amor;

GRACIAS PAPA por tus consejos, tu comprensión, tu apoyo incondicional, tu ternura. Serás la estrella que iluminará el resto de mi vida.

LOS AMO

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por el espacio edilicio y los instrumentales empleados en el desarrollo de la tesis.

Silvia H. y Mariqui por haberse comprometido con mi trabajo de tesis, brindándome sus conocimientos, sus consejos, su ayuda incondicional, pero principalmente por el cariño, el afecto, el apoyo y el estímulo que me han dado en estos cinco años de arduo trabajo.

Pablo, el amor de mi vida, por ESTAR SIEMPRE A MI LADO apoyándome, consolándome en los momentos difíciles, por tu contención, comprensión y sobre todo, por tu AMOR.

Marisa y Gustavo, mis hermanos-padres, por ayudarme en todo, desde que comencé la facultad hasta el día de hoy. Gracias Marisa por aguantarme en tu casa, por esas conversaciones de consuelo o de apoyo cuando las cosas se ponían difíciles en el estudio. Gracias Gustavo por tu alegría, tus palabras de afecto, por estimularme y alentarme en la toma de decisiones...LOS QUIERO CON TODO MI SER.

Mi familia: cuñados/as, sobrinos/as, suegros, tíos/as, abuela por estar acompañándome en este hermoso camino de la vida, por ser mi sostén en los momentos de debilidad, por darme afecto.

Los AMIGOS: a los de siempre y a los nuevos, porque todos han dejado una huella invaluable y me han permitido compartir momentos maravillosos.

Los compañeros del LSB: Silvia F., Sole, Quela, Mario, Rodrigo, Lucía, José María, todos han contribuido de diversas maneras en mi formación aportado sus conocimientos, compartiendo inquietudes y brindándome su amistad. Especialmente agradecer a Gabo por su predisposición y compromiso en la construcción de diseños y dispositivos que han sido implementados en esta tesis.

Los compañeros de la Cátedra de Química Analítica: en primer lugar quiero agradecer a Victor Mantovani, ya que desde el día que llegué a la cátedra me hizo sentir parte de esta gran familia. Luego agradecer a Caco y Merce por valorar mi trabajo y brindarme posibilidades de crecimiento y formación, haciéndome participe durante 2 años del Laboratorio de Control de Medicamentos. Gracias a Héctor, Marisi, Alicia, Julia, Luciana, Gabi, Agus, Carla, Quela, Gonza, Yami, Romi, Mati y Mili por aguantarme todos los días, por darme su cariño, alegría y sobre todo su amistad.

Grupo de Sensores y Biosensores de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) en España: Mariqui, Susana, Tamara, Sole, Delfina, Rey, Alejandra y también a Ana, Jose y Raquel, porque me hicieron vivir 3 meses maravillosos, me hicieron sentir como en mi hogar...me alegro mucho de haberlos conocido!

Mis amigos nuevos: Bete 1, Bete 2, Celmira, Setareh, Enoy, Alexis, Delfina, por esos viajes increíbles, por los momentos inolvidables vividos, por su buena onda, su alegría, su cariño.

Los profesores de las cátedras de Física (FBCB y FIQ), de Inmunología (FBCB), de Bioquímica Básica de Macromolécula (FBCB), de Matemática y Estadística (FBCB), por brindarme sus conocimientos y responder a mis consultas muy gentilmente. Especialmente agradecer al Dr. Alejandro Beccaria, por su amabilidad y predisposición al momento de solicitar la utilización de las instalaciones edilicias de la cátedra de Microbiología Aplicada (FBCB) para la realización de trabajos experimentales.

Los titulares de cátedra donde desarrollo mis actividades docentes: Javier Lottesberger, Julio Macagno y Rafael Althaus por su colaboración, paciencia, estímulo, comprensión y dedicación en mi función como educadora.

Los Hospitales “Iturraspe” y de Niños “Dr. Alassia” por el aporte de las muestras serológicas, especialmente a los doctores Nidia Garnero, Luis Beltramino, Marta Wagener y Liliana Trotta. Una mención especial a la Dra. Silvia Besaccia, por las gestiones realizadas cuando ejercía sus funciones como Jefa del Laboratorio Central del Hospital Iturraspe.

Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe-Argentina) por el aporte económico a través de la “Beca de Maestría y Doctorado para docentes de la UNL”; de los Proyectos “CAID 2009 N° 8/41” y “CATT 2010 N° 1545”; y del subsidio “PROMAC 2012-2013” que permitió los estudios de investigación en la UAB.

Roberto Aquilano, Subsecretario de Promoción Científica y Tecnológica de la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de Santa Fe, por la predisposición y amabilidad demostradas en el momento de manifestar mis inquietudes.

Soporte financiero para la compra de reactivos de parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid-España) a través del Proyecto “BIO 2007-63300” y “BIO 2010-17566”; de la Generalitat de Catalunya (España) a través del Proyecto “SGR323”; y de la Agencia Española de la Cooperación Internacional a través del Proyecto “A/6488/06” y “A/792/07”.

“Magneto immunofluorescence assay for diagnosis of celiac disease”. Silvina V. Kergaravat, Luis Beltramino, Nidia Garnero, Liliana Trotta, Marta Wagener, Silvia N. Fabiano, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. *Anal. Chim. Acta* 798 (2013) 89-96.

“Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease”. Silvina V. Kergaravat, Luis Beltramino, Nidia Garnero, Liliana Trotta, Marta Wagener, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 203-209.

“Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor”. Silvina V. Kergaravat, Gabriel A. Gómez, Silvia N. Fabiano, Tamara I. Laube Chávez, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. *Talanta* 97 (2012) 484-490.

“Evaluation of seven cosubstrates in the quantification of horseradish peroxidase enzyme by square wave voltammetry”. Silvina V. Kergaravat, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. *Talanta* 88 (2012) 468-476.

PRESENTACIONES EN POSTER A REUNIONES CIENTIFICAS

“Optimización de la respuesta de la peroxidasa en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para el diagnóstico de la enfermedad celíaca”. Silvina V. Kergaravat, Silvia R. Hernández, María Isabel Pividori. V Congreso Argentino de Química Analítica 2009. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

“Empleo de un bioensayo electroquímico con sensor magnético para la detección de biotina en suplementos dietarios y formulaciones lácteas”. Silvina V. Kergaravat, Silvia F. Fabiano, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. XXVIII Congreso Argentino de Química 2010. Lanús, Buenos Aires, Argentina.

“Determinación de biotina en suplementos dietarios mediante biomagnetoensayo electroquímico”. Silvina V. Kergaravat, Silvia N. Fabiano, Silvia R. Hernández, María Isabel Pividori. 7TH Ibero-American Congress on Sensors 2010. Lisbon, Portugal.

“Diseño de inmunosensores electroquímicos para la detección de biomoléculas marcadoras en el diagnóstico clínico”. Silvina V. Kergaravat, Gabriel Gómez, Silvia N. Fabiano, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. VI Congreso Argentino de Química Analítica 2011. Santa Fe, Argentina.

“Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-transglutaminase antibodies in celiac patients”. Silvina V. Kergaravat, Tamara Laube Chávez, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. XVII Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors 2012. Tarragona, España.

“Magneto ELISA fluorescente para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa en enfermos celíacos”. Silvina V. Kergaravat, Gabriel Gómez, Luis Beltramino, Nidia Garnero, Liliana Trotta, Marta Wagener, Silvia N. Fabiano, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica – II Congreso Uruguayo de Química Analítica 2012. Montevideo, Uruguay.

“Magneto inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa en enfermos celíacos”. Silvina V. Kergaravat, Gabriel Gómez, Luis Beltramino, Nidia Garnero, Liliana Trotta, Marta Wagener, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica – II Congreso Uruguayo de Química Analítica 2012. Montevideo, Uruguay.

“Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease”. Silvina V. Kergaravat, Salvador Alegret, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. 8th Ibero-American Congress on Sensors Ibersensors 2012. Carolina, Puerto Rico.

“Electrochemical magneto immunosensors for antibodies in Celiac disease”. Silvina V. Kergaravat, María Isabel Pividori, Silvia R. Hernández. 3rd International Conference on BIO-SENSING TECHNOLOGY 2013. Sitges, España.

“Aplicación de magnetos inmunosensores electroquímicos a anticuerpos presentes en los enfermos celíacos”. Silvina V. Kergaravat, Silvia R. Hernández, María Isabel Pividori. 7º Congreso Argentino de Química Analítica 2013. Mendoza, Argentina.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
\bar{X}_{blanco}	Promedio de la señal del blanco
+LR	Razón de verosimilitud de un ensayo positivo
A	Superficie de contacto entre el electrodo
ABC	Área bajo la curva ROC
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AGA	Anticuerpos anti-gliadina
A_{imm}	Área de inmovilización
ANOVA	Análisis de varianza (siglas en inglés)
antiIgA humana-HRP	Anticuerpo anti-IgA humana rotulado con peroxidasa
antiIgG cabra -HRP	Anticuerpo anti-IgG cabra rotulado con peroxidasa
antiIgG humana -HRP	Anticuerpo anti-IgG humana rotulado con peroxidasa
antiIg-HRP	Anticuerpo anti-Ig rotulado con peroxidasa
AOAC	Asociación oficial de Químicos Analíticos (siglas en inglés)
APDG	Anticuerpos anti-péptidos deaminados de gliadina
ARN	Ácido ribonucleico
ATG ₂	Anticuerpos anti-transglutaminasa
ATP	Trifosfato de adenosina (siglas en inglés)
b	Pendiente de la curva de regresión lineal
BSA	Albúmina Sérica Bovina (siglas en inglés)
CE ₅₀	Concentración del analito que produce el 50% de la respuesta máxima
c-GEC	Compósito grafito-epoxi con conector magnético (siglas en inglés)
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CLAR-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución- Espectroscopía masa/masa
CMC	Carboximetilcelulosa
C_O	Concentración de la especie O en la interfaz
CPA	Células presentadoras de antígenos
C_R	Concentración de la especie R en la interfaz
CV%	Coefficiente de variación porcentual
D	Pendiente del punto de inflexión de la curva sigmoidea
DAP	2,3-Diaminofenazina (siglas en inglés)
DCC	Diseño Central Compuesto
DE	Desviación estándar

DE _b	Desviación estándar de la pendiente
DE _{blanco}	Desviación estándar del ensayo blanco
DG	Deseabilidad global
E	Potencial
E.A.	Electrodo auxiliar
E.R.	Electrodo de referencia
E.T.	Electrodo de trabajo
E _o '	Potencial normal del par rédox
E _{e-s}	El potencial en la interfaz electrodo-solución
Ef	Eficiencia catalítica
EIE	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica
ELISA	Enzimoimmunoanálisis (siglas en inglés)
EMA	Anticuerpos anti-endomisio
ERB	Elemento de Reconocimiento Biológico
ES	Especificidad
ESPGHAN	Sociedad Europea para Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (siglas en inglés)
E _{voc}	Amplitud de la onda cuadrada
F	Constante de Faraday
F(ab) ₂	Dos fragmentos Fab
f _o	Frecuencia resonante
Fab	Fragmentos de unión al antígeno (siglas en inglés)
Fc	Región constante
fn	Falsos negativos
fp	Falsos positivos
Fv	Región variable
Fv	Fragmentos variables del anticuerpo
f _{voc}	Frecuencia de onda cuadrada
GEC	Compósito grafito-epoxi (siglas en inglés)
HLA	Antígeno leucocitario humano (siglas en inglés)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (siglas en inglés)
i	Corriente que atraviesa la interfaz electrodo-solución
IC	Intensidad de Corriente
IC _{max}	Respuesta electroquímica máxima
IC _{min}	Respuesta electroquímica mínima
IF	Intensidad de fluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta

IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquinas
INF- γ	Interferón-gamma
IR	Índices de refracción
J	Índice Youden
K	Constante de equilibrio de una reacción
K'm	Constante aparente de Michaelis
k _o	Constante de velocidad de la reacción estándar
Ka	Constante de asociación
Kcat	Constante catalítica
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LGC	Máquina láser de grabado y corte
LIE	Linfocitos intraepiteliales
-LR	Razón de verosimilitud de un ensayo negativo
m	Masa
MCC	Microbalanza de Cristal de cuarzo
m-GEC	Magneto compósito grafito-epoxi (siglas en inglés)
MSR	Metodología de Superficie Respuesta
n	Número total de determinaciones
NAD ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido
n _e	Número de electrones involucrados en la reacción
OLS	Cuadrados mínimos ordinarios (siglas en inglés)
OPD	o-fenilendiamina (siglas en inglés)
PBS	Solución tampón de fosfato 0,01 M, 0,15 M NaCl, pH 7,4
PBST	Solución tampón fosfato 0,01 M, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Tween 20, pH 7,4
PDG	Péptidos deaminados de gliadina
PFN	Probabilidad de Falso Negativos
PFP	Probabilidad de Falso Positivos
PM	Partículas magnéticas
PM ₁	Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilos
PM ₂	Partículas magnéticas específicas para unir péptidos
PMQ	Proceso de medida químico

R	Constante universal de los gases ideales
R%	Recuperación porcentual
R ²	Coefficiente de determinación
RIA	Radioinmunoensayo
ROC	Características Operativas del Receptor (siglas en inglés)
RPS	Resonancia de plasmones superficiales
scFv	Fv simple cadena (siglas en inglés)
SE	Sensibilidad
SELEX	Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (siglas en inglés)
SPCE-MWCNTs-	SPE nanoestructurados – nanotubos de carbono multicapas modificados con carboxilos – nanopartículas de oro
NPAus	
SPE	Electrodos monouso impresos (siglas en inglés)
t	Tiempo de medición de corriente
T _d	Tiempo de retardo
TEC	Transistor de efecto campo
TG ₂	Transglutaminasa tisular
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TMR	Tetrametilrosamina
U	Unidades arbitrarias de anticuerpo
UV	Región espectral ultravioleta
V _{max}	Velocidad máxima aparente
VC	Voltametría Cíclica
VG	Valor predictivo global
VIS	Región espectral visible
vn	Muestra verdaderamente negativa
VOC	Voltametría de Onda Cuadrada
vp	Muestra verdaderamente positiva
VPD	Voltametría de Pulso Diferencial
VPN	Voltametría de Pulso Normal
VP _{neg}	Valor predictivo del resultado negativo
VP _{pos}	Valor predictivo del resultado positivo
VRA	Voltametría de Redisolución Anódica
WLS	Cuadrados mínimos ponderados (siglas en inglés)
X	Concentración del analito en estudio
ΔE	Altura entre escalones
α	Coefficiente de transferencia

λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
μ	Módulo de corte del cuarzo
ρ	Densidad
τ	Período de onda cuadrada

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1. RESUMEN	1
SUMMARY	5
2. INTRODUCCION	8
2.1 LOS ANTICUERPOS COMO REACTIVO ANALITICO	9
2.1.1. Estructura general de los anticuerpos	9
2.1.2. Clasificación de los anticuerpos	10
2.1.3. Fragmentos de los anticuerpos	14
2.1.4. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales	15
2.1.5. Interacción Anticuerpo-Antígeno	17
2.1.6 Rotulado de anticuerpos o antígenos	19
2.2. INMUNOSENSORES	20
2.2.1. Los anticuerpos como elementos de bioreconocimiento en inmunosensores	23
2.2.1.1. Procedimiento de inmovilización de anticuerpos	23
2.2.2. Otros bioreceptores de afinidad en biosensores de afinidad	25
2.2.2.1. Aptámeros	25
2.2.2.2. Anticalinos	26
2.2.2.3. Polímeros impresos molecularmente	28
2.2.3. Formatos de la inmunoreacción	28
2.2.4. Transductor electroquímico	30
2.2.4.1. Clasificación de los métodos electroquímicos	31
2.2.4.1.1. Métodos electroquímicos en el seno de la solución	32
2.2.4.1.2. Métodos electroquímicos en la interfaz electrodo-solución	33
2.2.4.1.2.1. Métodos estáticos	33
2.2.4.1.2.2. Métodos dinámicos	35
2.2.4.1.2.2.1. Integración de materiales nanoestructurados en inmunosensores electroquímicos	37
2.2.4.1.2.2.2. Integración de partículas magnéticas en inmunosensores electroquímicos	38
2.2.4.1.2.2.3. Clasificación de las técnicas electroquímicas dinámicas	40
2.2.5. Transductores ópticos	45
2.2.6. Transductores piezoeléctricos	47
2.2.7. Aplicaciones de los inmunosensores	48
2.3. METODOS BIOANALITICOS	51
2.3.1. Validación de metodologías	52
2.3.2. Evaluación de los parámetros de calidad	54

2.3.3. Evaluación de las pruebas diagnósticas	56
2.3.3.1. Las curvas ROC	60
2.4. LA ENFERMEDAD CELIACA	62
2.4.1. Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca	63
2.4.2. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca	64
2.4.3. Inmunosensores en el diagnóstico de la enfermedad celíaca	67
3. OBJETIVOS	69
4. MATERIALES Y METODOS	72
4.1. EVALUACION DE SIETE COSUSTRATOS EN LA CUANTIFICACION DE LA ENZIMA PEROXIDASA POR VOLTAMETRIA DE ONDA CUADRADA	73
4.1.1. Reactivos y soluciones	73
4.1.2. Instrumental	73
4.1.3. Comportamiento electroquímico de los cosustratos	74
4.1.4. Optimización de las condiciones experimentales	74
4.1.5. Detección electroquímica	74
4.1.5.1. Amperometría	74
4.1.5.2. Voltametría de onda cuadrada	75
4.1.6. Determinación de las constantes aparentes de Michaelis	77
4.1.7. Curvas de calibración para la determinación de la concentración enzimática	77
4.2. DETERMINACION DE BIOTINA EN ALIMENTOS SUPLEMENTARIOS MEDIANTE UN MAGNETO BIOSENSOR ELECTROQUIMICO	77
4.2.1. Reactivos y soluciones	77
4.2.2. Instrumental	78
4.2.3. Análisis estadístico	78
4.2.4. Magneto biosensor electroquímico para la cuantificación de biotina en suplemento dietario y formulación infantil	78
4.3. ENSAYO MAGNETO IMMUNOFLUORESCENTE PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA	80
4.3.1. Reactivos y soluciones	80
4.3.2. Instrumental	81
4.3.3. Medida fluorescente	83
4.3.4. Magneto inmunoensayo fluorescente	83
4.3.5. Ensayos de validación	84
4.3.6. Ensayos serológicos	85
4.4. MAGNETO INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG ₂ EN ENFERMOS CELIACOS	85
4.4.1. Reactivos y soluciones	85

4.4.2. Instrumental	86
4.4.3. Celdas electroquímicas	86
4.4.4. Magneto inmunosensor electroquímico	88
4.4.5. Ensayos de validación	90
4.4.6. Ensayos serológicos	91
4.5. MAGNETOS INMUNOSENSORES ELECTROQUIMICOS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG ₂ Y ANTI-PDG EN ENFERMOS CELIACOS	91
4.5.1. Reactivos y soluciones	91
4.5.2. Instrumental	91
4.5.3. Inmunoensayos para la deteccion de anti-TG ₂ y anti-PDG	92
4.5.4. Ensayos serológicos	93
5. RESULTADOS Y DISCUSION	94
5.1. EVALUACION DE SIETE COSUSTRATOS EN LA CUANTIFICACION DE LA ENZIMA PEROXIDASA POR VOLTAMETRIA DE ONDA CUADRADA	95
5.1.1. Comportamiento electroquímico de los cosustratos	95
5.1.2. Optimización de las condiciones experimentales	101
5.1.3. Determinación de las constantes aparentes de Michaelis	108
5.1.4. Curvas de calibración para la determinación de la concentración enzimática	115
5.2. DETERMINACION DE BIOTINA EN ALIMENTOS SUPLEMENTARIOS MEDIANTE UN MAGNETO BIOSENSOR ELECTROQUIMICO	117
5.2.1. Optimización del magneto biosensor electroquímico	117
5.2.2. Curva de calibración para la determinación de biotina	123
5.2.3. Biotina en muestras alimentarias: efecto matriz, estudios de exactitud y efectos de interferencias	126
5.3. MAGNETO INMUNOENSAYO FLUORESCENTE PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA	131
5.3.1. Inmovilización de TG ₂ a las partículas magnéticas	131
5.3.2. Optimización de la medida de fluorescencia	135
5.3.3. Optimización del magneto inmunoensayo fluorescente	143
5.3.4. Ensayos de validación	148
5.3.4.1. Calibración estándar y cifras de mérito	148
5.3.4.2. Precisión inter- e intra-ensayo	149
5.3.4.3. Precisión intermedia	149
5.3.4.4. Ensayos de interferencia por efecto matriz	150
5.3.5. Ensayos serológicos	151
5.4. MAGNETO INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG ₂ EN ENFERMOS CELIACOS	156

5.4.1. Caracterización de los electrodos de trabajo	156
5.4.2. Optimización del magneto inmunosensor electroquímico	162
5.4.3. Ensayos de validación	165
5.4.4. Ensayos serológicos	169
5.5. MAGNETOS INMUNOSENSORES ELECTROQUIMICOS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG ₂ Y ANTI-PDG EN ENFERMOS CELIACOS	175
5.5.1. Inmovilización de PDG a las PM	175
5.5.2. Optimización de los magnetos inmunosensores electroquímicos	179
5.5.3. Curvas de calibración de los magnetos inmunosensores electroquímicos	184
5.5.4. Ensayos serológicos	187
6. CONCLUSIONES	194
7.PERSPECTIVAS	200
8. BIBLIOGRAFIA	202

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 2.1. Propiedades de las inmunoglobulinas (Davies y Metzger, 1983)	14
Tabla 2.2. Rótulos comúnmete usados para la detección del inmunoensayo antígeno-anticuerpo	20
Tabla 2.3. Características de las técnicas electroquímicas (Wang, 2001)	44
Tabla 2.4. Ventajas y desventajas de los inmunosensores según el tipo de transductor (Ricci y col., 2007)	49
Tabla 2.5. Aplicaciones de los inmunosensores	50
Tabla 2.6. Parámetros de calidad para métodos cuali y cuantitativos	53
Tabla 2.7. Ventajas y Desventajas de las curvas ROC	61
Tabla 4.1. Condiciones de los siete sistemas HRP-cosutrato-H ₂ O ₂ en voltametría hidrodinámica y VOC	76
Tabla 5.1. Resultados del DCC y las respuestas obtenidas experimentalmente para cada sistema	104
Tabla 5.2. Parámetros cinéticos de HRP con concentraciones variables de cosustratos a una concentración constante de H ₂ O ₂ y concentraciones variables de H ₂ O ₂ a concentraciones constantes de cosustratos	114
Tabla 5.3. Parámetros analíticos de las curvas de regresión de HRP mediante WLS	116
Tabla 5.4. Estudios de precisión realizados con el magneto biosensor electroquímico para una solución estándar de biotina de $1,8 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	125
Tabla 5.5. Métodos electroquímicos para determinar biotina	126
Tabla 5.6. Estudios de efecto matriz en una leche en polvo libre de biotina	127
Tabla 5.7. Valores de recuperación para estudios de exactitud en muestras alimentarias basadas en el magneto biosensor electroquímico	128
Tabla 5.8. Ensayos de optimización de un factor para los sistemas con OPD y TMB como cosustratos	139
Tabla 5.9. MSR para los sistemas HRP-OPD-H ₂ O ₂ y HRP-TMB-H ₂ O ₂	143
Tabla 5.10. Precisión intra- e inter-ensayo para los títulos de ATG ₂	149
Tabla 5.11. Resultados de los estudios de precisión intermedia	150
Tabla 5.12. Ensayos de recuperación de título de ATG ₂ en matrices de suero y plasma	151
Tabla 5.13. Tabla de contingencia para la detección de enfermedad celíaca mediante el ELISA y el magneto inmunoensayo fluorescente (valor de corte de ATG ₂ = 8,1 U)	156
Tabla 5.14. Precisión intra- e inter-ensayo para los títulos de ATG ₂	166
Tabla 5.15. Ensayos de recuperación de títulos de ATG ₂ en matrices de suero y plasma	167
Tabla 5.16. Respuestas electroquímicas obtenidas mediante los transductores c-GEC y	169

SPE

Tabla 5.17. Tabla de contingencia para la detección de la enfermedad celíaca mediante el ELISA y el magneto inmunosensor electroquímico (valor de corte de ATG2 = 16,95 U)	173
Tabla 5.18. Comparación de métodos de inmunoensayos desarrollados para ATG2 con el magneto inmunosensor electroquímico	174
Tabla 5.19. Parámetros analíticos para los tres magnetos inmunosensores electroquímicos	185
Tabla 5.20. Precisión intra- e inter-ensayo para las soluciones calibradores de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2	186
Tabla 5.21. Análisis de los datos mediante la curva ROC. Los intervalos de confianza para el 95% aparecen entre paréntesis	189
Tabla 5.22. Tablas de contingencia	190
Tabla 5.23. Métodos basados en inmunoensayos desarrollados para APDG	191
Tabla 5.24. Métodos electroquímicos de diagnóstico de la enfermedad celíaca	193

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 2.1. Estructura genérica de una inmunoglobulina.	10
Figura 2.2. Organización estructural de los isotipos de las diferentes inmunoglobulinas.	12
Figura 2.3. Diferentes fracciones de los anticuerpos usando proteasas y técnicas de ADN recombinante, Fab: fragmentos de unión al antígeno, por sus siglas en inglés; F(ab) ₂ : 2 fragmentos Fab; Fv: fragmento variable; scFv: Fv simple cadena, por sus siglas en inglés.	15
Figura 2.4. Obtención de anticuerpos policlonales.	16
Figura 2.5. Producción de anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma (Michnick y Sidhu, 2008).	17
Figura 2.6. Esquema de un diseño general de un inmunosensor.	22
Figura 2.7. Ejemplo de un aptámero de unión a tetrametilrosamina (TMR) unido a TMR (color rojo) a través de un bucle (<i>loop</i> , en inglés) formado por dos pares de bases (amarillo y naranja) ubicadas a cada lado del ligando. (Buskirk y col., 2004).	26
Figura 2.8. Arquitectura molecular de las lipocalinas humanas y variabilidad estructural de sus sitios de unión. Representación de las estructuras cristalinas de cuatro lipocalinas humanas: (a) proteína de unión del retinol, (b) apolipoproteína D, (c) lipocalina fragmentada, y (d) lipocalina asociada a neutrófilo gelatinoso. Las lipocalinas forman un barril- β conservado de ocho cadenas- β antiparalelas (color cian). Los cuatro bucles expuestos en su extremo abierto (color rojo) forman los sitios de unión al ligando y exhiben gran variabilidad estructural. (Skerra, 2008).	27
Figura 2.9. Principios de la impresión molecular (Mahony y col., 2005).	28
Figura 2.10. Formatos de los inmunoensayos donde se busca detectar en la muestra, (a) un antígeno o (b) un anticuerpo.	29
Figura 2.11. Clasificación de los métodos electroquímicos.	32
Figura 2.12. Diagrama esquemático de una celda electroquímica para medidas potenciométricas.	34
Figura 2.13. Esquema de una celda amperométrica con la configuración general de un inmunosensor potencioestático (Bojorge-Ramirez y col., 2007).	35
Figura 2.14. (a) Estructura general de una partícula magnética, y (b) posibles grupos funcionales que pueden encontrarse sobre su superficie.	39
Figura 2.15. Amperograma en el cual se registra la corriente de reducción de un analito en función del tiempo al aplicar el potencial adecuado para el sistema.	40
Figura 2.16. (a) Gráfica de potencial en función del tiempo, y (b) voltamograma cronoamperométrico de corriente en función del tiempo (Wang, 2001).	41
Figura 2.17. (a) La forma de la onda cuadrada muestra la amplitud (E_{VOC}); altura entre	42

escalones (ΔE); el período de onda cuadrada (τ); el tiempo de retardo (T_d); y tiempos de medición de corriente, 1 y 2, y (b) voltamograma de onda cuadrada de un sistema rédox reversible, donde A es la corriente directa; B es la curva inversa; C es la curva neta. (Wang, 2001).

Figura 2.18. (a) Señal de excitación potencial-tiempo en una voltametría cíclica, y (b) voltamograma cíclico típico del proceso rédox reversible $O + ne^- > R$ (Wang, 2001).

43

Figura 2.19. (a) Sensor de Resonancia Plasmódica Superficial: Una fina capa de metal noble (oro) es inmovilizado en un prisma de vidrio para crear la superficie del biosensor. Los anticuerpos u otros ligandos son inmovilizados en la superficie del sensor. La capa de metal posee electrones móviles en la superficie, que se ven perturbados por el haz de luz entrante en un cierto ángulo de incidencia, lo cual modifica la onda de plasmones superficiales. (b) Gráfica del cambio del índice de refracción en función del ángulo de resonancia cuando se une la biomolécula (Shpacovitch, 2012).

46

Figura 2.20. (a) Microbalanza de cristal de cuarzo (Skládal, 2003), y (b) cambio de la frecuencia en tiempo real del sensor piezoeléctrico a diferentes concentraciones de dimetil metilfosfonato (Ying y col., 2007).

47

Figura 2.21. Representación esquemática de las tres etapas del PMQ (Varcálcer Cases, 2000).

51

Figura 2.22. Ejemplo de una Tabla de contingencia. vp: muestra verdaderamente positiva; fp: muestra falso positiva; fn: muestra falsa negativa; vn: muestra verdaderamente negativa; n: número total de determinaciones (Trullols y col., 2004).

54

Figura 2.23. Prueba de Hipótesis Estadística para métodos de análisis cualitativo provistos por una respuesta instrumental (Trullols y col., 2004).

55

Figura 2.24. Curva de Característica de funcionamiento. Probabilidad de respuestas positivas: $P(x)$, y probabilidad de respuestas inconclusas y positivas: $P(x) + I(x)$, fueron graficadas en función de la concentración del analito. (1) $= fp = P(x)$; (2) $X_{0,05}$, donde la especificidad $= N(x) = 100 - (P(x) + I(x))$; (3) $X_{0,95}$, valor de corte, LD; (4) $fn = 100 - (P(x) + I(x))$; (5) Sensibilidad $= P(x) = 100 - \beta$. (Trullols y col., 2004).

56

Figura 2.25. Curva ROC.

60

Figura 2.26. Patogénesis de la enfermedad celíaca. Los péptidos del gluten en la dieta son altamente resistentes a hidrólisis por las proteasas intestinales. Se cree que ellos atraviesan el epitelio intestinal mediante rutas trans-celular (mediada por receptores) y para-celular (a través de uniones estrechas abiertas). Una vez en la lámina propia, ellos son deaminados por la TG2, produciendo epitopes altamente inmunogénicos. Estos epitopes son presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) mediante HLA DQ2 o DQ8 a los linfocitos T $CD4^+$. La activación de estos linfocitos permite la producción de citoquinas inflamatorias y aumenta los linfocitos intraepiteliales (LIE),

64

permitiendo eventualmente la remodelación de la mucosa con hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades. Además, la activación de los linfocitos B y la pérdida de tolerancia posibilita la producción de anticuerpos anti-TG₂ (Crespo Pérez y col., 2012).

Figura 4.1. Soporte magnético construido para las placas de microtitulación de 96 pocillos. (a) Vista lateral en la cual se observa la plataforma acrílica donde 8 magnetos se colocaron en la zona central para luego servir de soporte a las placas; (b) Vista superior en la cual la placa ha sido posicionada sobre el soporte magnético de tal manera que los magnetos queden en la zona central de dos filas de pocillos, mejorando así la extracción del sobrenadante en cada etapa de reacción inmunológica sin aspiración de las partículas magnéticas modificadas.

82

Figura 4.2. Representación esquemática de la reacción inmunológica sobre la superficie de las partículas magnéticas localizadas en los viales de las placas de microtitulación.

84

Figura 4.3. Construcción del electrodo c-GEC. (a) Partes constituyentes del electrodo c-GEC y (b) electrodo c-GEC ensamblado.

87

Figura 4.4. Conector para SPE. (a) Partes que constituyen el conector para SPE y el SPE, siendo E.R. = electrodo de referencia, E.T. = electrodo de trabajo, E.A. = electrodo auxiliar; (b) SPE ensamblado en el conector y listo para usar.

88

Figura 4.5. Esquema del protocolo del magneto inmunosensor electroquímico utilizando los sistemas de tres electrodos y SPE como transductores.

89

Figura 4.6. Esquema del protocolo del magneto inmunosensor electroquímico destinado a la detección de ATG₂.

92

Figura 5.1. (a) Mecanismo enzimático de HRP sobre la superficie del electrodo, y (b) Estructuras químicas de los cosustratos de HRP.

96

Figura 5.2. Voltametría Hidrodinámica. En la **Tabla 4.1** se muestran las condiciones experimentales para los siete sistemas HRP-cosustrato-H₂O₂.

99

Figura 5.3. Voltametría de onda cuadrada y amperometría. En la **Tabla 4.1** se muestran las condiciones experimentales para los siete sistemas HRP-cosustrato-H₂O₂.

100

Figura 5.4. Estudios cinéticos de la reacción enzimática con hidroquinona-H₂O₂ como sustratos. El gráfico de la densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) obtenido por VOC en función del tiempo de reacción (s) para $1,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de HRP, 2×10^{-3} mol L⁻¹ de hidroquinona, 2×10^{-3} mol L⁻¹ de H₂O₂ y solución tampón de fosfato 0,1 mol L⁻¹ y KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,50 como medio de reacción. Primero, se evaluaron 10 ciclos consecutivos cada 60 s durante 10 min. En el gráfico inserto, se recolectó la señal electroquímica cada 20 s durante 3 min.

102

Figura 5.5. Gráfico de la respuesta relativa (densidad de corriente/concentración enzimática) en $\mu\text{A cm}^{-2}/10^{-9}$ mol L⁻¹ en función de los sistemas HRP-cosustrato-H₂O₂ para VOC y amperometría. Las condiciones de reacción para el sistema HRP-fenol-H₂O₂

107

fueron $[HRP] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{fenol}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 7,5; para el sistema HRP-OPD- H_2O_2 fueron $[HRP] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{OPD}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-p-clorofenol- H_2O_2 fueron $[HRP] = 1,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{p-clorofenol}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-hidroquinona- H_2O_2 fueron $[HRP] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{hidroquinona}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 7,5; para el sistema HRP-pirocatecol- H_2O_2 fueron $[HRP] = 9,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{pirocatecol}] = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-p-aminofenol- H_2O_2 fueron $[HRP] = 9,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{p-aminofenol}] = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \times 10^{-3}$ a un pH de 5,0. Para todos los sistemas la solución tampón fue fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. La desviación estándar se calculó para $n = 3$.

Figura 5.6. Curvas de calibración para el cosustrato oxidado comercial p-benzoquinona (negro) e hidroquinona oxidada electroquímicamente (verde oliva). 109

Figura 5.7. Curva de calibración de la respuesta electroquímica en función de la concentración de los cosustratos oxidados electroquímicamente. 110

Figura 5.8. Curva cinética enzimática para el sistema HRP-OPD- H_2O_2 y gráfico recíproco de Lineweaver-Burk en el gráfico inserto. Condiciones de reacción: solución tampón de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH de 6,0; concentración HRP = $3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. (a) Concentración H_2O_2 constante = $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (b) concentración OPD constante = $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. 112

Figura 5.9. Representación esquemática de tres procedimientos competitivos denominados estrategias 1, 2 y 3 para la determinación de biotina. Etapa A: incubación de biotina con PM-estreptavidina, Etapa B: separación mediante m-GEC y lavado, Etapa C: adición de biotina-HRP e incubación. 119

Figura 5.10. Voltamograma obtenido mediante la VOC para la estrategia 2, cuyas condiciones fueron $2,5 \times 10^{-3}$ y $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de OPD y H_2O_2 , respectivamente, a un pH de 6,0 y 60 s de tiempo de reacción. 121

Figura 5.11. Respuesta electroquímica media con su desviación estándar ($n = 3$) para las diferentes estrategias en la reacción de afinidad. 122

Figura 5.12. Respuesta electroquímica media con desviación estándar ($n = 3$) para cada concentración de biotina-HRP. Las condiciones experimentales fueron PM-estreptavidina de $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ y biotina-HRP desde $3,7 \times 10^{-9}$ a $4,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. 123

Figura 5.13. Curva de regresión de biotina: densidad de corriente en función de la concentración de biotina. Las condiciones experimentales fueron PM-estreptavidina de $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$, biotina-HRP de $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ y biotina desde 4×10^{-8} a $3,57 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. El gráfico inserto incluye cinco voltamogramas típicos mediante VOC. 124

- Figura 5.14.** Recuperación % para muestras con adición de biotina y solución estándar (a) a 12 µg de biotina en 100 g, y (b) a 150 µg de biotina en 100 g, en función del tiempo. Cada columna representa la media de al menos cinco medidas con la desviación estándar. 130
- Figura 5.15:** Inmovilización de TG2 sobre las PM tosilo. 132
- Figura 5.16.** Curva de calibración de BSA en agua milliQ para el ensayo de Bradford. 133
- Figura 5.17.** Espectro de absorción de soluciones evaluadas mediante el método Bradford: ensayo blanco de reactivo (negro), ensayo de BSA (rojo) y ensayo de TG2 (azul), ambos a 0,55 mg mL⁻¹. 133
- Figura 5.18.** Estudio de estabilidad de PM-TG2 analizadas mediante el magneto inmunoensayo fluorescente. Las condiciones experimentales fueron: 0,05 mg mL⁻¹ de PM-TG2, título de ATG2 de 1:8000 y título de antiIgG-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 135
- Figura 5.19.** Reacción de oxidación de OPD. 136
- Figura 5.20.** Reacción de oxidación de TMB. 136
- Figura 5.21.** Espectros de excitación (color verde) y emisión (color oliva) obtenidos mediante el espectrofluorímetro, y espectro de absorción (color rojo) obtenido mediante el espectrofotómetro para (a) DAP y (b) TMB. 138
- Figura 5.22.** (a) Efecto de la adición de Triton. *Ensayo blanco de reactivos:* (1) 2% m/v de Tritón X-100; (2) [PM-TG2] = 0,05 mg mL⁻¹; (3) [PM-TG2] = 0,05 mg mL⁻¹; [OPD] = 1 x 10⁻³ mol L⁻¹; [H₂O₂] = 1 x 10⁻³ mol L⁻¹. *Ensayo sin HRP:* (4) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 1% m/v; (6) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 2% m/v; (8) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 3% m/v y (10) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 4% m/v. *Ensayo con [HRP] = 1.5x10⁻¹⁰ mol L⁻¹:* (5) ensayo N° 4 + HRP, (7) ensayo N° 6 + HRP, (9) ensayo N° 8 + HRP y (11) ensayo N° 10 + HRP. (b) Determinación de la actividad de HRP en ausencia y en presencia de Tritón al 2% m/v. Las barras de error muestran una desviación estándar para n=3. Solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0 y tiempo de reacción = 22 min. 140
- Figura 5.23.** Intensidad de fluorescencia del sistema HRP-OPD-H₂O₂ en presencia y ausencia de Tritón X-100 en color negro y verde, respectivamente. 141
- Figura 5.24.** IF en función del tiempo para el sistema HRP-TMB-H₂O₂. 142
- Figura 5.25.** Curvas de calibración obtenidas mediante dos sistemas de revelación con detección fluorescente: OPD-H₂O₂-Tritón y TMB-H₂O₂. Condiciones de la reacción: 0,5 mg mL⁻¹ de PM-TG2, título de ATG2 desde 1:70000 a 1:300 y título de antiIgG cabra-HRP de 1:20000. Condiciones de los sistemas de detección: (a) OPD 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, H₂O₂ 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ y 2 % v/v de Tritón en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0, y (b) TMB 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ y H₂O₂ 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,2. 145

Figura 5.26. Optimización de la concentración de PM-TG₂. En el ensayo indirecto, el título antiIgG cabra-HRP fue 1:20000. Las barras de error muestran una desviación estándar para n=3. 146

Figura 5.27. Curvas estándares de ATG₂ contra diferentes títulos de anticuerpo antiIgG cabra-HRP: 1:40000 en negro; 1:30000 en rojo; 1:20000 en verde y 1:10000 en azul. Condiciones experimentales: [PM-TG₂] 0,05 mg mL⁻¹; [OPD] de 1×10^{-3} mol L⁻¹; [H₂O₂] de 1×10^{-3} mol L⁻¹; [Tritón X-100] de 2 % m/v; solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 147

Figura 5.28. Curva estándar del título de ATG₂ obtenida mediante el magneto inmunoensayo fluorescente en las condiciones óptimas. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3. 148

Figura 5.29. Curvas de calibración para diferentes matrices obtenidas mediante el magneto inmunoensayo fluorescente. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3. 150

Figura 5.30. Evaluación de la presencia de uniones no específicas. Las condiciones experimentales fueron: [PM-BSA] = 0,05 mg mL⁻¹ y [PM-TG₂] = 0,05 mg mL⁻¹; 1:20000 de antiIgA humana-HRP; [OPD] = 1×10^{-3} mol L⁻¹; [H₂O₂] = 1×10^{-3} mol L⁻¹; [Tritón X-100] = 2% m/v; solución tampón citrato-fosfato de 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3. 152

Figura 5.31. Selección del factor de dilución de la muestra. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3. 154

Figura 5.32. Curva ROC para seleccionar el valor de corte de ATG₂. En diagonal: línea indiferente. 155

Figura 5.33. (a) Resistencia superficial del electrodo c-GEC y E en el pico de reducción de la solución de ferricianuro de potasio de 2 mM y 0,10 mol L⁻¹ de NaCl, y (b) Resistencia superficial del electrodo c-GEC e IC en el pico de reducción de la solución anterior. Se obtuvo el pico de la intensidad de corriente mediante VOC en un rango de E desde 600 a 0 mV contra Ag/AgCl en una solución 3 mol L⁻¹ NaCl como electrodo de referencia. 158

Figura 5.34. Voltamogramas cíclicos obtenidos mediante diferentes electrodos en una solución de ferricianuro de potasio de 2 mM y 0,10 mol L⁻¹ NaCl. Rango de E: -0,4 a 0,8 V en función del electrodo de Ag/AgCl en solución de NaCl de 3 mol L⁻¹ como electrodo de referencia y Ag como electrodo de pseudo-referencia, para c-GEC y SPE respectivamente. Velocidad de barrido: 0,1 V s⁻¹. Electrodo SPE (en verde); electrodo c-GEC desnudo (en rojo); el mismo electrodo c-GEC después de su empleo como transductor del magneto inmunosensor para la detección de ATG₂, y una etapa de pulido subsiguiente (en azul); electrodo c-GEC desnudo en solución de NaCl 0,10 mol L⁻¹ (en negro). Para el inmunoensayo, la solución de PM-TG₂ fue 1,5 mg mL⁻¹, ATG₂ diluido 1:9200 y el 160

anticuerpo antiIgG cabra-HRP diluido 1:20000.

Figura 5.35. Optimización de la concentración de PM-TG2 a 1:20000 de anticuerpo antiIgG cabra-HRP. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 162

Figura 5.36. Optimización de la dilución de antiIgG cabra-HRP a $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG2 y 1:1600 de ATG2. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 163

Figura 5.37. Selección del tiempo de reacción. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 164

Figura 5.38. Curva estándar del título de ATG2 obtenida mediante el magneto inmunosensor electroquímico en las condiciones óptimas. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n=3$). 165

Figura 5.39. Curvas de calibración para diferentes matrices obtenidas mediante el magneto inmunosensor electroquímico. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n=3$. 166

Figura 5.40. Voltamogramas obtenidos mediante VOC para los inmunoensayos con el sistema de tres electrodos (color oliva) y el sistema SPE (color verde). Condiciones de reacción: $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de TG2-MB, 1:2000 de título de ATG2, 1:20000 de antiIgA humana-HRP y $2,5$ y $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de concentraciones de OPD y H_2O_2 en solución tampón a pH 6,0 como medio de reacción. Además se muestra el voltamograma blanco, en ausencia de ATG2 (rojo). 168

Figura 5.41. Detección voltamétrica de los diferentes factores de dilución de suero usando el magneto inmunosensor electroquímico para ATG2-IgA. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 170

Figura 5.42. Concentraciones de ATG2 en los cuatro ensayos para estimar la especificidad del inmunosensor con TG2 (barra negra) y BSA (barra verde) inmovilizadas en PM. Condiciones de la reacción: antiIgA humana-HRP de 1:20000; OPD y H_2O_2 de $2,5$ y $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente a pH 6,0 como medio de reacción. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 171

Figura 5.43. Curva ROC para seleccionar el valor de corte de ATG2. En Diagonal: línea indiferente. 172

Figura 5.44. Selección de la concentración de PDG a inmovilizar sobre PM2. Condiciones experimentales: $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM2-PDG, sueros positivos y negativos diluidos 1:25 confirmados clínicamente, y anticuerpo antiIgA humana-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$. 176

Figura 5.45. Curva de calibración de glicina. El gráfico inserto incluye los espectros para los cinco estándares de glicina analizados. 177

Figura 5.46. Efecto de los diferentes bloqueos a las PM2-PDG sobre el rendimiento del magneto inmunosensor electroquímico para APDG. Condiciones experimentales: $0,1 \text{ mg}$ 178

mL⁻¹ de PM₂-PDG, sueros positivos (SP 1 y 2) y negativos (SN 1 y 2) diluidos 1:25 y anticuerpo antiIgA humana-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

Figura 5.47. Estudio de estabilidad de las PM₂-PDG realizado con el magneto inmmosenor para un suero negativo y otro positivo, confirmados con biopsia. Las barras de error muestran una desviación estándar para n = 3. 179

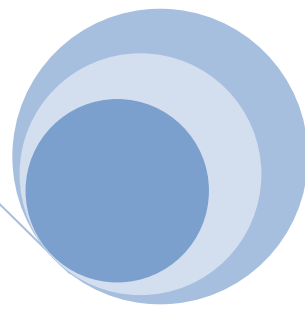
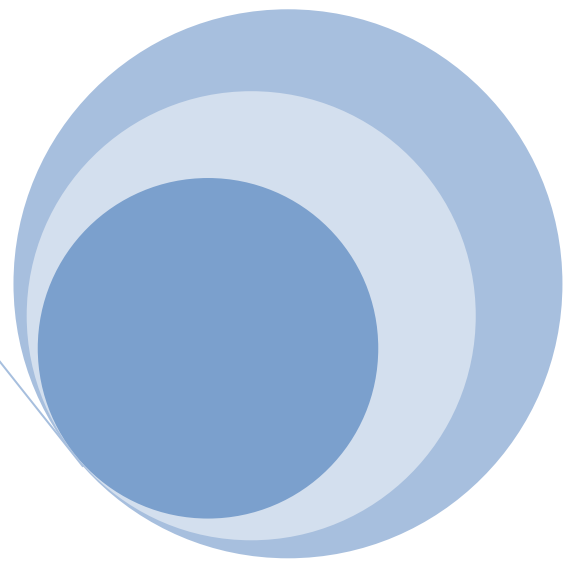
Figura 5.48. Selección del tipo de PM donde inmovilizar a los PDG. Controles positivo fuerte (CPF), positivo débil (CPD) y negativo (CN), sueros positivos (SP 1-5) y negativos (SN 1-3). Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 180

Figura 5.49. Selección de la cantidad de PM₂-PDG por inmunoensayo. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 181

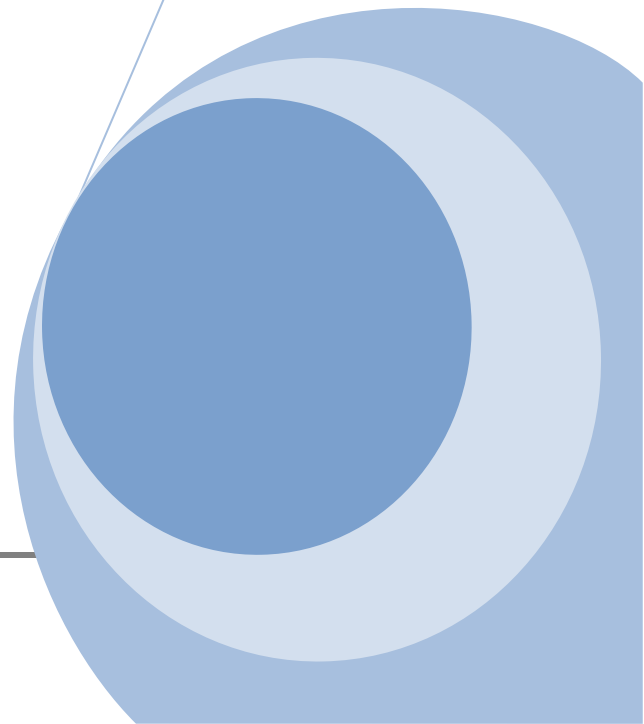
Figura 5.50. Selección de la dilución de suero. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 182

Figura 5.51. Selección del título de anticuerpo antiIg humana-HRP para la detección de APDG del isotipo (a) IgG y (b) IgA. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 183

Figura 5.52. Selección de la concentración de PM₁-TG₂. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3. 184



1. RESUMEN



RESUMEN

RESUMEN

En la presente tesis se optimizaron siete sistemas de detección electroquímicos basados en la respuesta enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP) frente a H_2O_2 como sustrato y diferentes cosustratos: OPD (o-fenilendiamina, por sus siglas en inglés), hidroquinona, fenol, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), p-clorofenol, p-aminofenol y catecol. Primero, el tiempo de reacción, la secuencia de adición de los sustratos, la relación cosustrato: H_2O_2 y la técnica electroquímica se evaluaron mediante ensayos de optimización de un factor para cada sistema HRP-cosustrato- H_2O_2 . Segundo, el pH del medio de reacción, la actividad enzimática y las concentraciones de sustrato y cosustratos se seleccionaron aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR). En las condiciones óptimas para cada sistema se construyó una curva de calibración donde la respuesta electroquímica (intensidad de corriente) se evaluó a diferentes concentraciones de HRP. El sistema que brindó un mayor rendimiento analítico se seleccionó debido a que, posteriormente, se lo aplicó como sistema de revelación de los magnetos sensores de afinidad electroquímicos. El sistema HRP-OPD- H_2O_2 presentó el mejor comportamiento analítico debido a que se logró determinar la concentración de HRP a muy bajo nivel, en un amplio intervalo lineal y con una elevada sensibilidad analítica. Estos resultados suponen una gran ventaja en su posterior aplicación como sistema de revelación, debido a que el analito investigado se encuentra directamente relacionado con la respuesta del producto catalizado por HRP. Además OPD fue el cosustrato que presentó la mayor eficiencia para la enzima HRP teniendo en cuenta su comportamiento cinético.

Con la finalidad de poner a prueba la capacidad de las partículas magnéticas (PM) de preconcentrar y recuperar a un analito de interés a partir de una matriz compleja, se desarrolló un magneto biosensor electroquímico basado en la reacción de alta afinidad de la biotina-estreptavidina. El biosensor se diseñó para la cuantificación de biotina a partir de una matriz muy compleja como son los productos alimentarios. La reacción de afinidad tuvo un formato competitivo, donde biotina estándar o presente en las muestras compitió con biotina marcada con HRP por los sitios de unión de la estreptavidina inmovilizada en la superficie de las PM. Luego las PM modificadas se capturaron mediante el transductor m-GEC (magneto compuesto grafito-epoxi, por sus siglas en inglés) y se realizaron las lecturas electroquímicas con el sistema de revelación de HRP-OPD- H_2O_2 seleccionado anteriormente. Buenas recuperaciones se obtuvieron a partir de dos alimentos, un suplemento dietario y una formulación infantil, con una variabilidad aceptable, menor

RESUMEN

al 15%. Esto sugiere que la simple extracción de biotina a partir de los alimentos se ve favorecida con el uso de las PM como soporte; siendo este un antecedente importante debido a que, posteriormente, se las utilizó en la detección de anticuerpos presentes en sueros humanos.

A continuación, el uso de PM como soporte de la reacción de afinidad, acoplado a un sistema de revelación optimizado, se implementó en el desarrollo de magnetos inmunoensayos con detección fluorescente y electroquímica, destinados a la detección de anticuerpos presentes en los enfermos celíacos, con la finalidad de mejorar la sensibilidad de las metodologías utilizadas rutinariamente en los centros de salud para el diagnóstico de dicha patología.

En primer lugar, se elaboró un magneto inmunoensayo fluorescente con la finalidad de determinar los anticuepos anti-transglutaminasa (ATG₂) del isotipo IgA en los enfermos celíacos. Por un lado, se optimizaron dos sistemas de revelación con detección fluorescente para la enzima HRP frente a H₂O₂ como sustrato y OPD o TMB como cosustratos. Luego se diseñó el inmunoensayo en placas de 96 pocillos con formato indirecto para la detección de los ATG₂, el cual consistió en la inmovilización de TG₂ sobre las PM y dos etapas de incubación: la primera con ATG₂ estándar y la segunda con un anticuerpo antiIg rotulado con HRP (antiIg-HRP). La captura de las PM modificadas se realizó mediante la colocación de un potente magneto por debajo de las placas. Posterior a la selección de las concentraciones óptimas de los reactivos involucrados en la inmunoreacción, se aplicó esta metodología para la detección fluorescente de ATG₂ en sueros de pacientes diagnosticados como celíacos o no celíacos. El análisis de los resultados se realizó mediante las curvas de Características Operativas de Receptor (ROC, por sus siglas en inglés), obteniendo elevados valores de sensibilidad (SE) y especificidad (ES) (96,6% y 94,7%, respectivamente). Además estos resultados se compararon con los obtenidos mediante un ensayo enzimoanálisis (ELISA, por sus siglas en inglés) comercial, considerado como método de rutina para los ATG₂, logrando una eficiencia del 93,7 %.

En segundo lugar, se desarrolló un magneto inmunosensor electroquímico para la detección de ATG₂-IgA. El formato fue similar al del inmunoensayo fluorescente, sólo que en el caso del inmunosensor el desarrollo se realizó en tubos Eppendorf y la captura de las PM modificadas se llevó a cabo sobre la superficie del electrodo de trabajo. En esta metodología se utilizó el sistema de revelación electroquímico HRP-OPD-H₂O₂ seleccionado anteriormente. Posteriormente, se evaluaron sueros de pacientes clínicamente clasificados como celíacos y no celíacos y los resultados obtenidos se analizaron mediante las curvas ROC. En este caso se obtuvo una mayor SE y una menor ES (100% y 84%, respectivamente) en comparación al magneto inmunoensayo fluorescente; siendo la eficiencia de igual magnitud en ambas metodologías al ser comparadas con un ensayo ELISA comercial. Las potenciales ventajas que presentan las metodologías con detección electroquímicas consisten en la reducción de costos debido al empleo de un instrumento más económico. Sin

RESUMEN

embargo, ambas metodologías presentan la factibilidad de disminuir el tamaño del instrumental de manera de minimizar el consumo de muestra y reactivos y utilizar un instrumental portátil que pueda ser trasladado a cualquier centro de salud.

En tercer lugar, se diseñaron diversas estrategias basadas en magnetos inmunosensores electroquímicos para detectar anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina (APDG) y ATG2 en los pacientes celíacos con la finalidad de aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad celíaca y disminuir los posibles falsos negativos, especialmente en los niños menores de 2 años, en los cuales los ATG2 pueden estar normales, mientras los APDG se encuentran elevados. Para ello, se optimizaron las condiciones experimentales de los magnetos inmunosensores electroquímicos destinados a la detección de APDG de los isotipos IgA e IgG y ATG2-IgA. Los resultados obtenidos al evaluar 70 sueros mediante las tres metodologías se analizaron con las curvas ROC. Posteriormente, se compararon los rendimientos analíticos obtenidos con cada inmunosensor en la detección de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2-IgA, con los resultados obtenidos mediante los ensayos comerciales ELISA para APDG y APDG/ATG2. El menor rendimiento analítico se obtuvo con el magneto inmunosensor electroquímico para detectar APDG-IgG. Esto puede ser atribuido a un posible efecto matriz causado por anticuerpos IgG no específicos de la enfermedad celíaca; debido a que el isotipo IgG es el más abundante en el suero humano y, además, se encontraba en altas concentraciones, ya que la dilución aplicada a los sueros fue baja (1:25). Por otro lado, APDG mostró un mayor rendimiento analítico que ATG2. Esta parte del trabajo se llevó a cabo en la Universitat Autònoma de Barcelona (España), gracias a la ayuda económica brindada por instituciones gubernamentales de la provincia de Santa Fe y de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe - Argentina) en el marco de las becas de movilidad docente (PROMAC) 2012-2013.

En el transcurso de este trabajo se demostró que el empleo de PM, como soporte de una reacción de afinidad, permite mejorar las recuperaciones de diferentes analitos a partir de matrices complejas, como alimentos o sueros sanguíneos, evitando largos y tediosos pretratamientos. Además, la implementación de sistemas optimizados de revelación enzimática permitió desarrollar metodologías de detección fluorescente y electroquímica con alta sensibilidad. Por otro lado, cuando se trabaja en microescala, los métodos electroquímicos y fluorescentes son seleccionados con respecto a los fotométricos debido a que estos últimos, generalmente, no son lo suficientemente sensibles debido a que el paso óptico se ve reducido por el microcanal. Debido a que otras partes de la configuración electroquímica o fluorescente, como la celda de lectura y el dispositivo de detección, pueden ser miniaturizadas, los dispositivos completos pueden transformarse en portátiles.

SUMMARY

SUMMARY

Seven electrochemical detection systems based on the enzymatic response of the HRP with H_2O_2 as substrate and different cosubstrates (OPD, hydroquinone, phenol, TMB, p-chlorophenol, p-aminophenol and pyrocatechol) were optimized. First, the reaction time, the addition sequence of the substrates, the cosubstrate: H_2O_2 ratio and the electrochemical technique were evaluated by one-factor optimization assays for each system HRP-cosubstrate- H_2O_2 . Second, the buffer pH, the enzymatic activity and cosubstrate and H_2O_2 concentrations were selected simultaneously by response surface methodology. Calibration curves for each system were built in the optimal conditions where the electrochemical response (current intensity) was evaluated at different HRP concentrations. The system with the highest performance was selected due to it would be later applied as revelation system in the electrochemical magneto immunosensors. The HRP-OPD- H_2O_2 system presented the highest performance because it can detect the lowest HRP concentration, in a wide linearity range and with high analytical sensitivity. These results involve a great advantage in the subsequent application as revelation system, due to the analyte is directly related with the product catalized by HRP. Moreover, OPD cosubstrate showed the highest efficiency for the HRP enzyme according their kinetic behavior.

An electrochemical magneto biosensor was developed based in the reaction of high affinity between biotin and streptavidin. Magnetic beads were utilized as affinity reaction support in order to evaluate their preconcentrate and recovery capacity of analytes from complex matrixes. The biosensor was designed for the biotin quantification from alimentary products. The affinity reaction had competitive format where standard biotin or biotin in samples competed with biotinylated HRP by the streptavidin immobilized on the magnetic bead surface. Then the magnetic beads modified were captured by m-GEC and the electrochemical responses were performed with the HRP-OPD- H_2O_2 as revelation system. Excellent recoveries were obtained from the dietary supplement and infantil formula samples with an acceptable variability less to 15 %. Therefore, the extraction simple of biotin from samples was favored by the use of magnetic beads; it was a very important antecedent because then, the magnetic beads were used in the antibody detection from human sera.

SUMMARY

Then, the magnetic beads as affinity reaction support coupled to revelation system optimized were implemented in magneto immunoassays with fluorescent and electrochemical detection for the antibody detection in the celiac disease to improve the sensitivity with respect the routine classical methods used in the health centers.

First, a magneto immunofluorescent assay for the IgA anti-transglutaminase antibody detection in blood of the celiac patients was developed. On the one hand, the fluorescent revelation systems for HRP with H_2O_2 as substrate and OPD or TMB as cosubstrates were optimized. Then, an immunoassay in 96 well microplates was design with indirect format for anti-transglutaminase antibody detection. It consisted in the immobilization of transglutaminase on magnetic beads and then two incubation steps: one with anti-transglutaminase antibody standards and other with anti-Ig antibody labeled with HRP. The capture of magnetic beads was performed with a powerful magneto below the microplates. The optimal conditions of immunoassay were selected and then, this methodology was applied to fluorescent detection of anti-transglutaminase antibodies in sera of patient diagnosed as celiac or no celiac. The results were analyzed with ROC curves, obtaining high sensitivity and specificity values (96.6% and 94.7%, respectively). Moreover, these results were compared with one obtained by a commercial ELISA, considered as routine method for anti-transglutaminase antibody detection, achieving an efficiency of 93.7%.

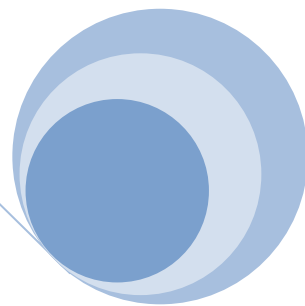
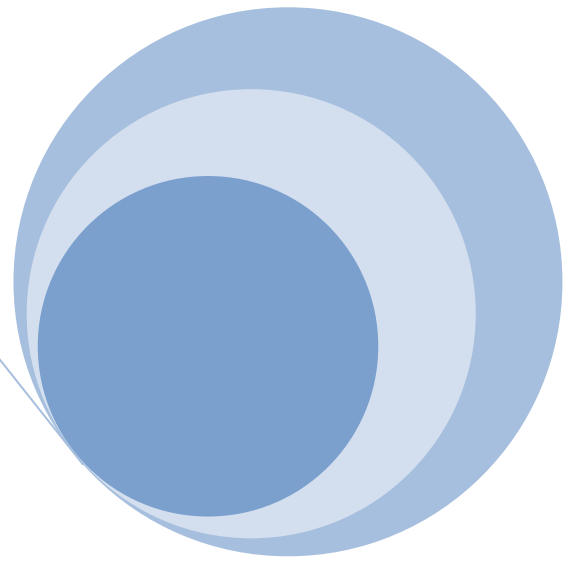
Second, an electrochemical magneto immunosensor for anti-transglutaminase antibody was developed. Both methodologies maintained the same format but the reaction in the immunosensor was performed in the Eppendorf tubes and the modified magnetic bead capture was carried out on the working electrode. The electrochemical revelation system was HRP-OPD- H_2O_2 previously optimized. Posteriori, sera of patient clinically classified as celiac and no celiac were assessed with the electrochemical magneto immunosensor and the results were analyzed by ROC curve. They had higher sensitivity and lower specificity than ones obtained with magneto immunofluorescent assay; while the efficiency compared with the results by commercial ELISA was similar in both methodologies. The main advantage of the electrochemical detection is the cost reduction due to the use of an inexpensive instrument. In addition, the instruments used in both methodologies can be miniaturized and produced in large quantity so as to reduce sample volume, reagent consumption and costs per analysis, ensuring that a portable instrumental could be transported to any health center including those of middle complexity.

Third, several strategies based in electrochemical magneto immunosensors were designed for the anti-deaminated gliadin peptide and anti-transglutaminase antibody detections in celiac disease. These detections increase the sensitivity in their diagnostic and decrease the negative falses especially in children younger than two years old, in which the anti-transglutaminase antibodies can be normal level while the anti-deaminated gliadin peptide antibody would be elevated. In order to

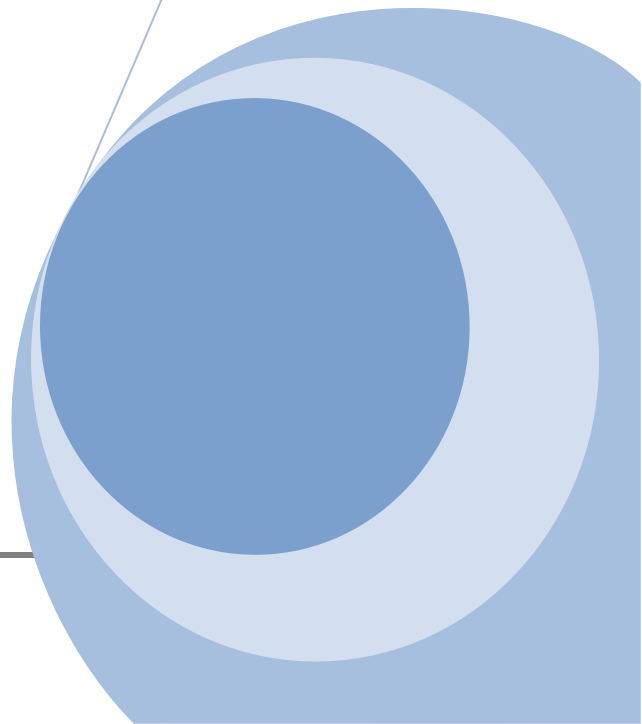
SUMMARY

do that, the experimental conditions of electrochemical magneto immunosensors for IgG and IgA anti-deaminated gliadin peptide and IgA anti-transglutaminase antibodies were optimized. Then, seventy sera of celiac and no celiac patient were evaluated with three methodologies developed and the results were analyzed by ROC curves. After that, the performances of each immunosensor were compared with ones obtained by ELISA for anti-deaminated gliadin peptide and anti-deaminated gliadin peptide/anti-transglutaminase antibodies. The lowest performance was obtained with immunosensor for IgG anti-deaminated gliadin peptide antibodies. This can be attributed to a possible matrix effect caused by non specific IgG antibodies to celiac disease; due to the fact that IgG isotope is the most abundant in human serum and it was also found at high concentrations since the dilution applied to sera was low (1:25). The immunosensor for IgA anti-deaminated gliadin peptide antibodies showed higher performance than immunosensor for IgA anti-transglutaminase antibodies. This third part of PhD thesis was performed in the Universitat Autònoma de Barcelona (España) thanks to financial support of governmental institutions of Santa Fe and Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe - Argentina) in the ambit of becas de movilidad docente (PROMAC) 2012-2013.

This PhD thesis exposed that the use of magnetic beads as affinity reaction support allowed improving the recoveries of different analytes from complex matrixes as food and blood sera samples, avoiding long and tedious pretreatment. Moreover, the implementation of optimized revelation systems in the fluorescent and electrochemical detection offered methodologies with high sensitivity. On the other hand, when working in the microscale, fluorescent and electrochemical methods are selected in respect to photometric ones due to they are generally not sensitive enough to overcome the reduced path length presented by a microchannel. Since other parts of the fluorescence and electrochemical setup, such as the reading cell and detection device, can be miniaturized, the entire devices can be made easily portable.



2. INTRODUCCION



 INTRODUCCION

 INTRODUCCION

2.1. LOS ANTICUERPOS COMO REACTIVO ANALITICO

Los *anticuerpos* son proteínas sintetizadas por las células plasmáticas, es decir los linfocitos B maduros, como respuesta a sustancias extrañas llamadas *antígenos*, las cuales pueden ser proteínas o polisacáridos.

Los antígenos pueden ser clasificados de acuerdo a sus características de unión de valencia (número total de sitios) y su determinante (número de sitios diferentes) en cuatro clases (Mikkelsen y Cortón, 2004):

- i) Unideterminante y univalente: el antígeno posee sólo un simple epítopo en la superficie que es capaz de unirse a un anticuerpo. Un ejemplo son los haptenos.
- ii) Unideterminante y multivalente: el antígeno posee dos o más epítopos de la misma clase.
- iii) Multideterminante y univalente: el antígeno contiene muchos epítopos de diferentes clases, pero sólo uno de cada clase. Ejemplos son la mayoría de los antígenos de proteínas.
- iv) Multideterminante y multivalente: el antígeno contiene muchos epítopos de diferentes clases y más de uno de cada clase por molécula. Ejemplos son las proteínas que contienen múltiples subunidades idénticas, las proteínas polimerizadas y las células completas.

2.1.1. Estructura general de los anticuerpos

Las inmunoglobulinas son moléculas compuestas de cuatro cadenas polipeptídicas unidas covalentemente por uniones disulfuros (**Figura 2.1**). Los cuatro polipéptidos consisten en dos cadenas idénticas con masas moleculares relativas de 23000 Da y 50000 – 75000 Da, denominadas cadenas livianas y pesadas, respectivamente. Cada polipéptido contiene un número de uniones disulfuro que dividen a la cadena polipeptídica en una serie de dominios. Además, las inmunoglobulinas poseen un área conocida como región bisagra que permite la flexibilidad de las cadenas. Al comparar la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de una clase particular de inmunoglobulina revela que, aproximadamente, $\frac{3}{4}$ partes de cada cadena de la región C-terminal muestra una secuencia muy similar (región constante). El otro cuarto de la cadena peptídica (región

INTRODUCCION

variable) muestra una variación considerable en la secuencia de aminoácidos y corresponde a la parte de la cadena asociada con los sitios de unión al antígeno. Regiones constantes y variables similares son también demostrables en las cadenas livianas, a pesar de que éstas impliquen aproximadamente la mitad del péptido. La variación es particularmente perceptible en tres regiones distintas (región hipervariable) de las cadenas pesadas y sugieren que estas regiones cuando se asocian a tres regiones similares en las cadenas livianas son responsables de la actividad del anticuerpo y especificidad de una inmunoglobulina.

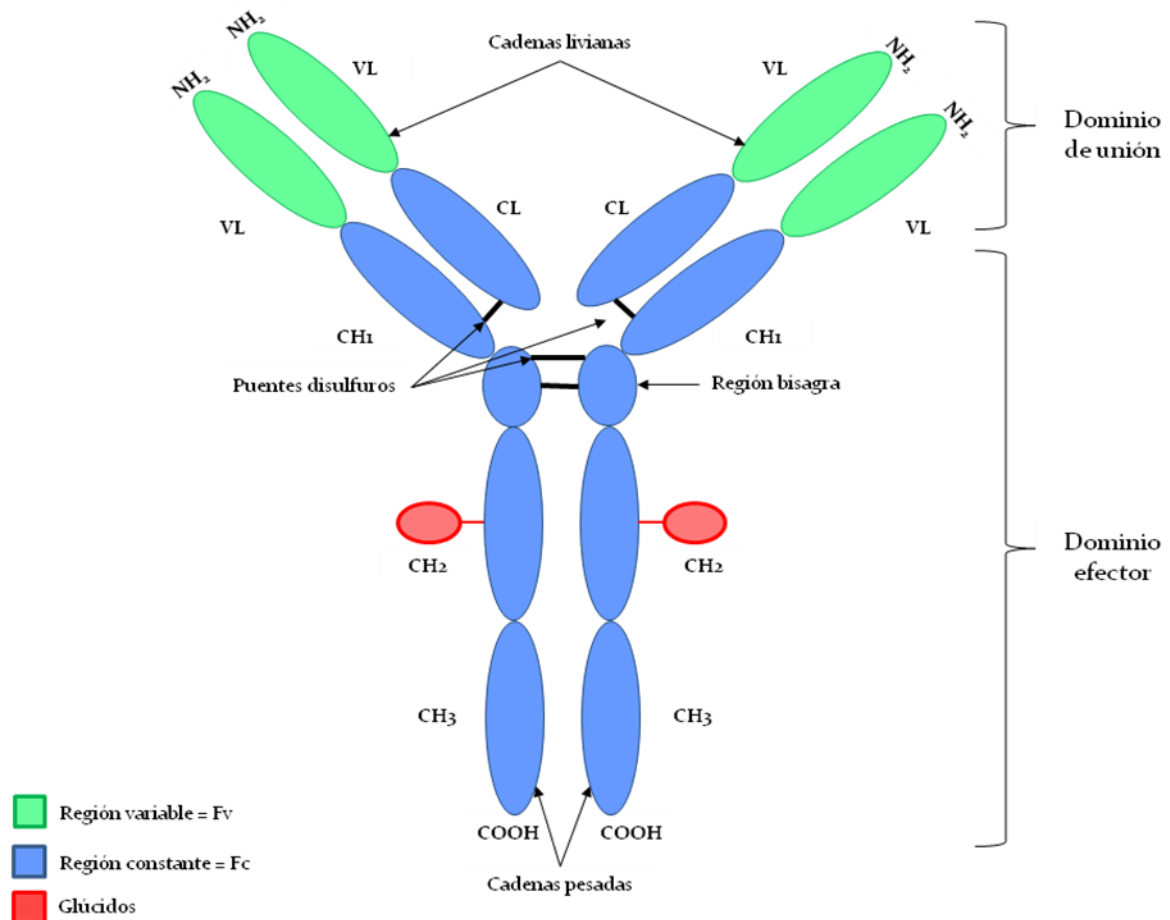


Figura 2.1. Estructura genérica de una inmunoglobulina.

2.1.2. Clasificación de los anticuerpos

Existen cinco clases de inmunoglobulinas o isotipos, las cuales difieren en la región constante de las cadenas pesadas que son las que le confieren a cada clase su función efectora. Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas son denominadas γ , μ , α , δ o ϵ y cuando dos cadenas pesadas, idénticas son combinadas en una inmunoglobulina, la molécula se llama IgG, IgM, IgA, IgD o IgE

INTRODUCCION

respectivamente. Los isotipos de las cadenas pesadas pueden ser, posteriormente, divididos en diversos subtipos. Hay cuatro subtipos de IgG ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$), dos de IgA (α_1, α_2) y dos de IgM (μ_1, μ_2). Las cadenas livianas no muestran variación y sólo se conocen dos tipos, las cadenas kappa (κ) y las lambda (λ).

INTRODUCCION

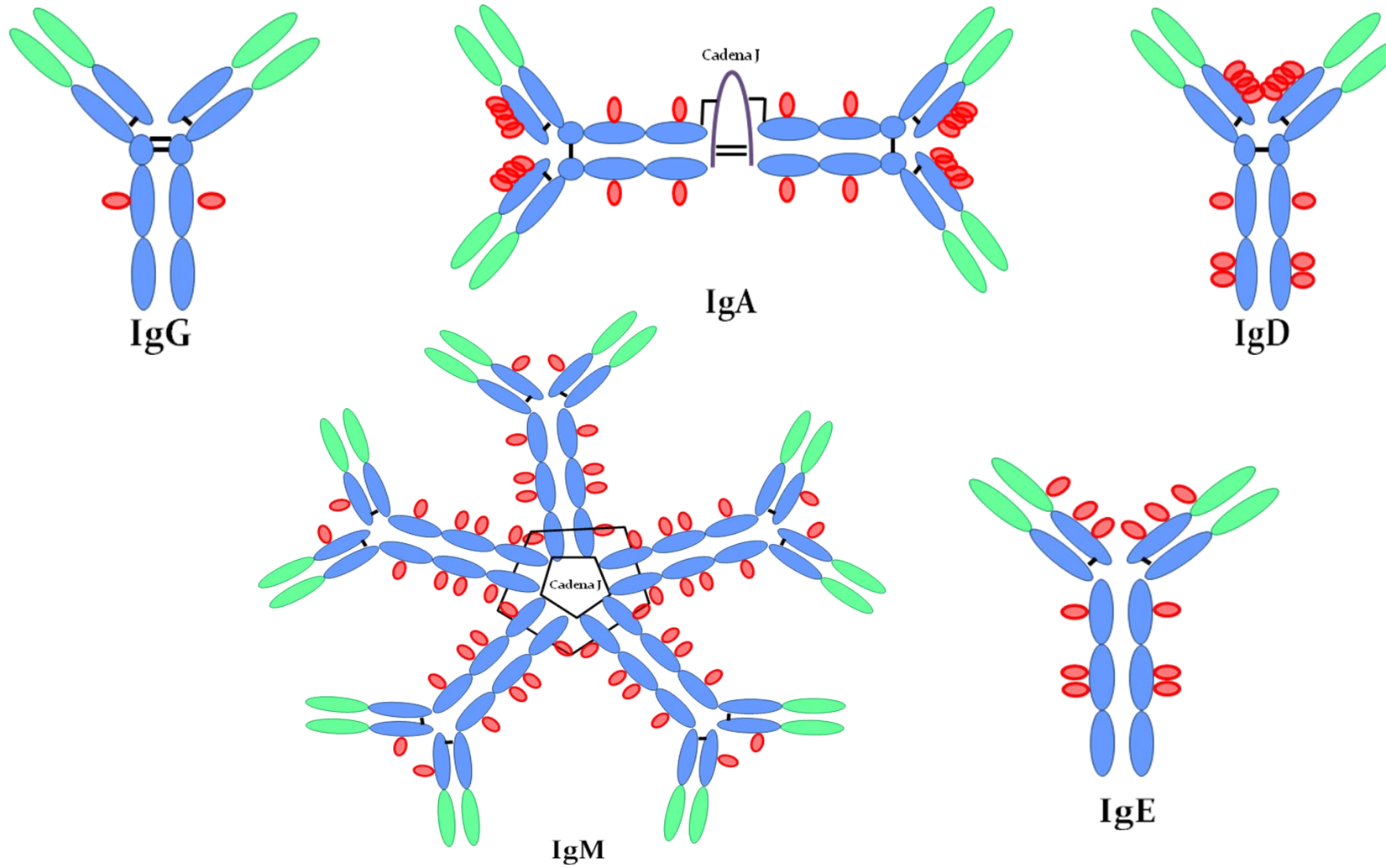


Figura 2.2. Organización estructural de los isotipos de las diferentes inmunoglobulinas.

INTRODUCCION

En la **Figura 2.2** se pueden apreciar las diferencias entre las estructuras de las inmunoglobulinas, en especial las longitudes de las Fc de las cadenas pesadas, la localización de los puentes disulfuros que unen las cadenas y la región bisagra sólo presente en la IgG, la IgD y la IgA. Los isotipos también se diferencian en la distribución de los grupos de hidrato de carbono (representados en color rojo). Todas las inmunoglobulinas se encuentran como monómero en su forma unida a la membrana. En su forma soluble, la IgD, la IgE y la IgG son siempre monómeros mientras IgA forma monómeros y dímeros y la IgM sólo forma pentámeros.

IgG comprende la clase de inmunoglobulina más abundante (entre el 75 al 80%). Debido a su relativo pequeño tamaño es capaz de atravesar membranas y difundir en los espacios extravasculares del cuerpo. Esta inmunoglobulina puede atravesar la membrana placentaria y proveer la mayor defensa inmune durante los primeros meses de vida, hasta que el mecanismo inmune propio comienza a ser efectivo.

IgM es un tetrámero que contiene un polipéptido adicional, la cadena J (masa molecular relativa de 15000 Da), el cual es importante en la secreción de la molécula a partir de la célula. Su abundancia se encuentra entre un 5 a 10% de los anticuerpos totales y se la denomina como anticuerpos tempranos, porque son la primera clase que se produce frente a la respuesta inmunitaria primaria. Es un agente precipitante y aglutinante efectivo y, a pesar de que es potencialmente capaz de unir diez moléculas de antígeno, es usualmente sólo pentavalente. No atraviesa la membrana fácilmente y esta limitada en sangre por su gran tamaño.

IgA es la segunda clase en abundancia de anticuerpos (15 al 20% de los anticuerpos totales). Esta asociada, principalmente, con las secreciones seromucosas tales como saliva, lágrimas, fluidos nasales, etc. Los anticuerpos IgA se presentan como monómeros en sangre y líquido extracelular y como dímeros en las secreciones seromucosas. Cuando es secretada como dímero necesita tanto una cadena J como una parte secretora (masa molecular relativa 70000 Da), siendo esta última útil para prevenir el daño a la molécula por las enzimas proteolíticas. Su mayor rol consiste en la protección de las membranas mucosas y su presencia en sangre, principalmente como monómero, puede ser como resultado de absorción del dímero degradado.

IgE es conocida como una inmunoglobulina citofílica, debido a su habilidad para unirse a algunas células (basófilos, mastocitos y eosinófilos). Se encuentra en muy pequeñas proporciones, constituyendo menos del 0,01% del total de anticuerpos. Cuando IgE reacciona con un antígeno causa la degranulación de los mastocitos, los cuales liberan aminas vasoactivas tales como las histaminas. Este proceso puede ser útil en el inicio de la respuesta inflamatoria, por lo cual en individuos alérgicos, la IgE se encuentra en grandes cantidades produciendo un exceso de reacción o hipersensibilidad.

 INTRODUCCION

IgD representa menos del 1% de los anticuerpos totales. Es la clase principal de anticuerpos que se encuentran sobre las membranas celulares de las células B productoras de anticuerpos. Los anticuerpos *IgD* pueden tener un rol importante en la regulación de la selección clonal, aunque realmente se sabe muy poco sobre ellos.

La **Tabla 2.1** resume las características principales de cada isotipo de inmunoglobulina:

Tabla 2.1. Propiedades de las inmunoglobulinas (Davies y Metzger, 1983).

Clase se inmunoglobulina	Concentración en suero adulto	Propiedades funcionales
IgG	12 mg mL ⁻¹	Única que atraviesa placenta
IgE	0,3 µg mL ⁻¹	Involucrada en respuesta alérgica
IgM	1,0 mg mL ⁻¹	Puede causar lisis de bacterias
IgA	1,8 mg mL ⁻¹	Encontrado en secreciones
IgD	30 µg mL ⁻¹	Encontrada en linfocitos

2.1.3. Fragmentos de los anticuerpos

El clivaje de las moléculas de anticuerpos enteros, usualmente mediante catálisis enzimática, ha permitido a los fragmentos de éstos que retengan las características más importantes de los anticuerpos, es decir la capacidad de unir antígenos (Cruz y col., 2002) y sean utilizados en los inmunoensayos como elementos de captura. Las configuraciones de estos fragmentos han mostrado que ofrecen hasta 20 veces incrementada la sensibilidad del inmunoensayo, comparado con el uso de anticuerpos intactos. Además, la posibilidad de expresar fragmentos de anticuerpos en la superficie de partículas bacteriófagas ha revolucionado la habilidad de mimetizar los sistemas inmunes de la célula B *in vitro* (**Figura 2.3**). Una amplia colección de moléculas de anticuerpos, llamada biblioteca, pueden ser expresados sobre la superficie de las partículas bacteriófagas filamentosas, de tal manera que los anticuerpos con especificidades deseadas y altas afinidades pueden ser obtenidos a partir de estas bibliotecas mediante selección de afinidad, utilizando una amplia variedad de antígenos, tales como proteínas recombinantes o células eucariotas y procariotas intactas. Las bibliotecas de producción del fago se pueden construir a partir de genes de inmunoglobulinas de algunas especies, incluido los humanos y, frecuentemente, incorporar secuencias de nucleótidos sintéticos.

INTRODUCCION

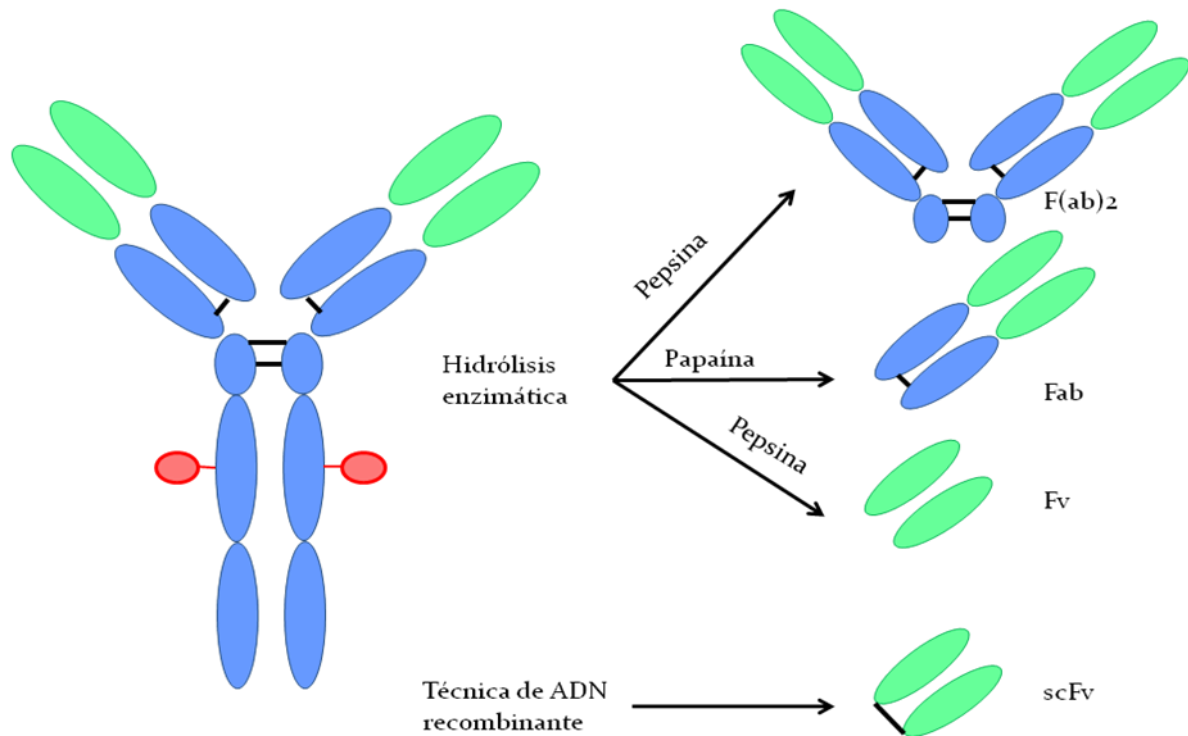


Figura 2.3. Diferentes fracciones de los anticuerpos usando proteasas y técnicas de ADN recombinante, Fab: fragmentos de unión al antígeno, por sus siglas en inglés; F(ab)₂: 2 fragmentos Fab; Fv: fragmento variable; scFv: Fv simple cadena, por sus siglas en inglés.

2.1.4. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales

Los antígenos varían considerablemente en su habilidad para iniciar una respuesta inmune, por lo que es usual incorporar un adyuvante a la muestra antes de la inyección. Un adyuvante es una mezcla de sustancias que estimulan una respuesta inflamatoria y previene la rápida remoción del antígeno a partir de tejidos mediante un mecanismo de drenaje normal. El adyuvante de Freund consiste en una emulsión de micobacteria muerta en un aceite mineral, como alternativa al fosfato o hidróxido de aluminio ya que tienen el mismo efecto.

A pesar de que las proteínas son generalmente inmunogénicas, ellas necesitan tener una masa molecular relativa de al menos 4000 Da y alguna rigidez estructural para ser efectiva. Con el fin de generar respuesta de los anticuerpos contra una molécula no-inmunogénica (un *hapteno*) es necesario unir covalentemente esta molécula a una proteína transportadora. La albúmina sérica de origen humano o bovino y los polipéptidos sintéticos, tal como la poli-L-lisina, son frecuentemente usados con este fin. Los antiseros producidos de esta manera son conocidos como *policlonales*, debido a que ellos contienen muchos anticuerpos producidos por diferentes linfocitos, cada uno respondiendo contra diferentes determinantes antigénicos del antígeno original o de otras sustancias

 INTRODUCCION

inmunogénicas en el material inyectado (**Figura 2.4**). Este tipo de anticuerpos reduce la especificidad de un método.

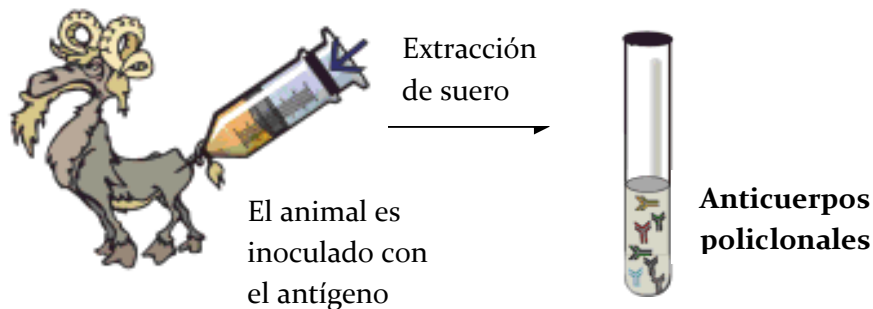


Figura 2.4. Obtención de anticuerpos policlonales.

El desarrollo de técnicas para la producción de anticuerpos *monoclonales* por Kohler y Milstein ha expandido la potencialidad de los anticuerpos como agentes terapéuticos y analíticos. Un anticuerpo monoclonal es producido por clones de células derivadas de un único linfocito. Algunos linfocitos pueden probablemente producir sólo una simple inmunoglobulina y, por lo tanto, el anticuerpo producido mediante un clon de células idénticas es muy restrictivo en cuanto al antígeno al que se va a unir, haciendo de éste un reactivo muy específico.

La **Figura 2.5** esquematiza los pasos involucrados en la producción de anticuerpos monoclonales, la cual comienza con la inmunización de un animal (usualmente un ratón) de la manera tradicional. Sin embargo, en vez de permitir al sistema inmune del ratón la generación de anticuerpos, los linfocitos son separados del bazo y son fusionados *in vitro* con células cancerígenas de mieloma desarrolladas en un medio de cultivo. Se utiliza un fusógeno, usualmente polietilenglicol y la célula fusionada resultante se conoce como hibridoma. Se diluye la suspensión de células y se la distribuye entre un gran número de sub-cultivos para lograr una distribución simple de células. La célula de cáncer original tiene la habilidad de sintetizar anticuerpos no específicos, pero cuando está fusionada al linfocito, el cual fue estimulado por la inyección de un antígeno, produce la inmunoglobulina para la cual el linfocito tiene la información genética.

Las células hibridoma son desarrolladas inicialmente en un medio en el cual las células cancerígenas que no se hayan fusionado morirán. Estos cultivos productores del anticuerpo deseado son clonados, y luego, desarrollados como tumores en animales. Además de mejorar la especificidad, los anticuerpos monoclonales ofrecen otras ventajas sobre los policlonales, como la posibilidad de ser producidos con características constantes y relativa facilidad de purificación (Holme y Peck, 1998).

INTRODUCCION

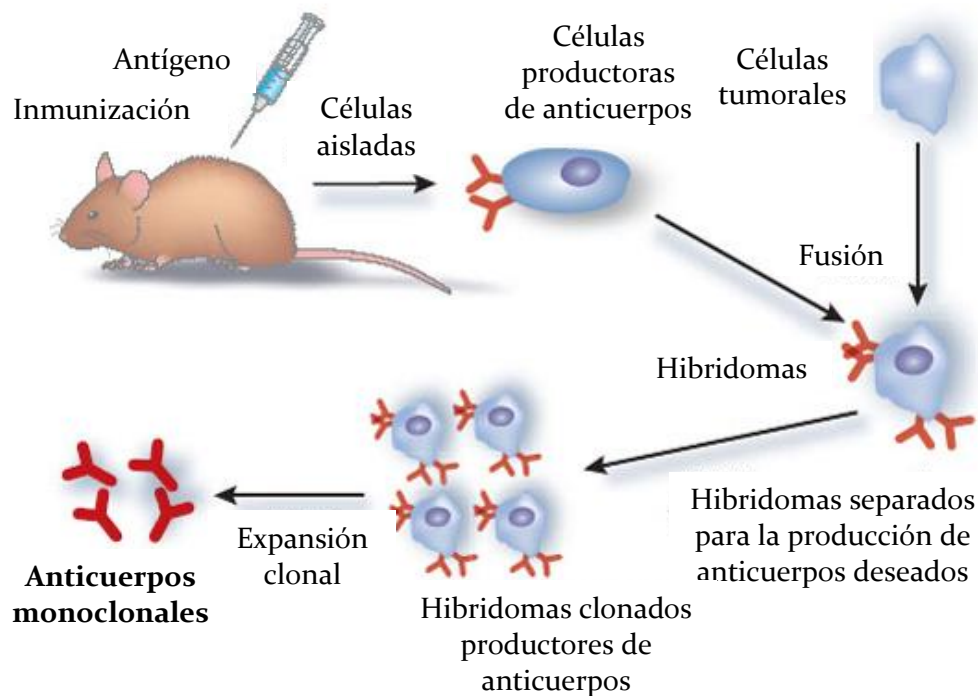


Figura 2.5. Producción de anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma (Michnick y Sidhu, 2008).

2.1.5. Interacción Anticuerpo-Antígeno

Un anticuerpo se combina específicamente con el correspondiente antígeno en una manera que es muy similar a la unión de una enzima con su sustrato e involucra interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El sitio de unión del anticuerpo tiene una estructura que permite el ajuste complementario con grupos funcionales y elementos estructurales en el antígeno. La porción del antígeno que interactúa específicamente con el sitio de unión del antígeno en el anticuerpo es llamado el determinante antigénico o *epitope*. El epitope tiene un tamaño de $\sim 0,7 \times 1,2 \times 3,5$ nm, lo cual equivale a 5-7 residuos de aminoácidos. El sitio complementario en el anticuerpo es llamado *paratope*, y tiene el mismo tamaño.

La unión entre un anticuerpo y antígeno, sin embargo, involucra una reacción química subsecuente y su estabilidad depende de la forma complementaria del antígeno y el sitio de unión del anticuerpo.

Debido a la relativa debilidad de las fuerzas que mantienen a los antígenos (Ag) con los anticuerpos (Ac) unidos, estas combinaciones son reversibles y el complejo podrá disociarse, dependiendo de la fuerza de unión (Ecuación 2.1):



 INTRODUCCION

Cuando la unión es fuerte el equilibrio se desplazará a la derecha; mientras que si es más débil se desplazará a la izquierda. La fuerza de unión de un anticuerpo a un antígeno esta definida con su *afinidad* a través de la constante de equilibrio K, como se observa en la Ecuación 2.2:

$$K = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]} \quad (2.2)$$

Los valores de afinidad típicos para las interacciones anticuerpo-antígeno van en el intervalo desde 10^5 a 10^{12} M⁻¹ (Hawcroft y col., 1987). Cuando más de un anticuerpo en un antisuero puede combinarse simultáneamente con un antígeno, la suma de las fuerzas de unión es definida como la *avidez* del antisuero (Holme y Peck, 1998).

Muchos antígenos son grandes y pueden tener varios epitopes y como resultado un suero tomado de un animal, el cual ha sido inmunizado con este antígeno, contendrá diversos anticuerpos contra diferentes determinantes antigénicos. Es posible que otro antígeno pueda contener determinantes antigénicos similares al antígeno original, lo cual causaría que los anticuerpos en el antisuero se puedan unir a ambos antígenos. Por lo tanto, ese antisuero tendría reactividad cruzada entre los dos antígenos y esto provocaría una falta de especificidad. Los antisueros usados con un propósito analítico deben ser específicos y es por ello que cada antisuero deberá ser analizado antes de su uso para evitar este inconveniente. Para elevar la especificidad de un antisuero se debe (i) inmunizar al animal con una inyección intramuscular del antígeno puro (aunque para algunos antígenos particulares puede ser más apropiada la inyección intravenosa); (ii) inyectar pequeñas cantidades de antígeno periódicamente puede ser más efectiva que una sólo dosis de inyección, debido a la generación de respuestas primaria y secundaria; (iii) utilizar diferentes especies de animales (cobayo y conejo son los más frecuentes, aunque para aumentar la cantidad de suero se pueden usar cabras, ovejas y caballos).

2.1.6. **Rotulado de anticuerpos o antígenos**

Los métodos basados en inmunoensayos aprovechan la interacción primaria entre anticuerpo y antígeno, que es el reconocimiento y combinación del paratope del anticuerpo y el epitope del antígeno. A pesar de que en muchos casos la interacción antígeno-anticuerpo genera un precipitado visible; en muchos ensayos inmunoquímicos la determinación del antígeno o anticuerpo puede ser visualizada sólo mediante la adición de un anticuerpo o antígeno rotulado con un marcador que pueda ser detectado cualitativa y/o cuantitativamente. El rótulo ideal para los inmunoensayos

INTRODUCCION

debería cumplir con las siguientes propiedades: (i) ser económico, seguro y con un procedimiento de rotulado simple; (ii) unirse covalentemente al reactivo de análisis a través de múltiples sitios, para aumentar la sensibilidad; (iii) que la especie rotulada sea estable y que el rótulo tenga mínimo efecto sobre el evento de interacción inmunológica; (iv) que el rótulo sea fácilmente detectado usando instrumentación económica; (v) que el rótulo tenga propiedades que permitan la diferenciación de las formas unidas y libres sin requerir etapas de separación. Mientras ningún rótulo reúne todas estas necesidades, las propiedades de algunos de los más recientemente introducidos en los sistemas de rotulado se aproximan al ideal. Los radioisótopos, uno de los rótulos más ampliamente utilizados históricamente en los inmunoensayos, están siendo desplazados especialmente por métodos de rotulado fluorescente y enzimático, debido a que son costosos, peligrosos y requiere tediosos procedimientos de monitorización y eliminación. Una amplia variedad de rótulos han sido investigados, incluyendo las células sanguíneas, partículas de látex, virus, metales y radicales libres, siendo mostrados algunos ejemplos en la **Tabla 2.2** (Mikkelsen y Cortón, 2004).

INTRODUCCION

Tabla 2.2. Rótulos comúnmente usados para la detección del inmunoensayo antígeno-anticuerpo.

Tipo de rótulo	Ejemplo de rótulo	Propiedades medidas	Ref.
Fluoróforo	Fluoresceína	Intensidad de fluorescencia	(Liu y col., 2013)
	Europio	Fluorescencia resuelta en el tiempo	(Järvenpää y col., 2012)
Radioisótopo	¹²⁵ I	^a RIA competitivo y no-competitivo	(Grützner y col., 2013)
Quimioluminiscente	Éster de acridinio	Hidrólisis del éster	(Natrajan y col., 2010)
	Luminol		(Kamruzzaman y col., 2013)
Enzima	Fosfatasa alcalina	Actividad enzimática	(Yin y col., 2011)
	Peroxidasa		(Yang y col., 2013)
	β-Galactosidasa		(Abu-Rabeah y col., 2009)
	Ureasa		(Sahoo y col., 2011)
Cofactor	^b ATP	Actividad quinasa	(Helenius y col., 2012)
	^c NAD ⁺	Actividad dehidrogenasa	(Cox y col., 1982)
Rótulo secundario	Biotina	Actividad enzimática por la unión a avidina-enzima o estreptavidina-enzima	(Wang y col., 2011)
Electroactivo	Ferroceno	Corriente de oxidación	(Teng y col., 2011)
Densidad electrónica	Nanopartículas de oro	Microscopía inmunoelectrónica	(Lai y col., 2010)

^aRIA = radioinmunoanálisis; ^bATP = trifosfato de adenosina, por sus siglas en inglés; ^cNAD⁺ = forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido.

2.2. INMUNOSENSORES

Los inmunoensayos son conjuntos de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que tienen en común la utilización de complejos inmunes, es decir el resultado de hacer interaccionar

INTRODUCCION

anticuerpos con antígenos, con la finalidad de detectar y/o cuantificar analitos en muestras. Esta herramienta analítica ha experimentado un desarrollo evolutivo desde que Berson y Yalow (1959) describieron por primera vez el principio del RIA. En el RIA, una cantidad fija y limitada de anticuerpo reacciona con tanto una cantidad fija y limitada de antígeno radiomarcado como con una concentración variable de analito. La selectividad de los anticuerpos para unirse a sus ligandos permite a estas biomoléculas ser empleadas en métodos analíticos altamente específicos cuando se trata de matrices complejas como sangre, plasma u orina. Combinando la selectividad de las interacciones anticuerpo-antígeno con una gran diversidad de anticuerpos preformados en los procesos de inmunización de animales huéspedes y la disponibilidad de numerosos rótulos fácilmente detectables (radioisótopos, absorbancia, fluorescencia o quimio-luminiscencia inducida enzimática o electroquímicamente) los inmunoensayos pueden ser diseñados para una amplia variedad de analitos con límites de detección extraordinariamente bajos. Ejemplos de estos límites son niveles de concentración de hormonas, enzimas, virus, antígenos tumorales y bacteriales cercanos a 10^{-12} - 10^{-9} mol L⁻¹ (Bojorge Ramírez y col., 2009).

Desde el primer biosensor de Clark y Lyons (1962) destinado a la detección de los niveles de glucosa en muestras de suero, diversos analitos han sido utilizados en la aplicación de los biosensores. Estos dispositivos incluyen un elemento de reconocimiento biológico (ERB) firmemente inmovilizado en una superficie sólida, permitiendo una interacción bioespecífica reversible con el analito y, un transductor de señal que transforma la señal biológica en una señal medible. Los biosensores combinan la alta especificidad analítica con un elevado poder electrónico para lograr sistemas de detección con alta sensibilidad. En muchos casos existe la posibilidad de construir dispositivos miniaturizables, automatizables, portátiles y simples para el análisis rápido en el sitio donde se sitúa el problema (Mello y Kubota, 2002).

Hay dos tipos diferentes de biosensores: los biocatalíticos y los de bioafinidad. Los biosensores *biocatalíticos* usan principalmente enzimas como componente biológico, las cuales catalizan una reacción de señalización bioquímica; mientras que los biosensores de *bioafinidad* utilizan como reconocimiento biomolecular a proteínas de unión específica como lectinas, receptores, ácidos nucleicos, membranas, células completas, anticuerpos o sustancias relacionadas con anticuerpos diseñados para el monitoreo del evento de unión. En el caso que se utilicen anticuerpos o sustancias relacionadas a estos, los biosensores son llamados *inmunosensores* (Luppa y col., 2001).

El diseño general de un inmunosensor se muestra en la **Figura 2.6.**, constituida principalmente por un ERB (antígeno o anticuerpo) y un transductor (electroquímico: potenciométrico, amperométrico o conductimétrico; óptico; piezoeléctrico; termométrico; magnético; micromecánico) (Li y col., 2011). Algunos de ellos se encuentran definidos como *directos*, en los cuales se detecta un

INTRODUCCION

cambio físico durante la formación del complejo y otros como *indirectos*, en los cuales la señal es generada por un rótulo o marcador (generalmente, es enzimático).

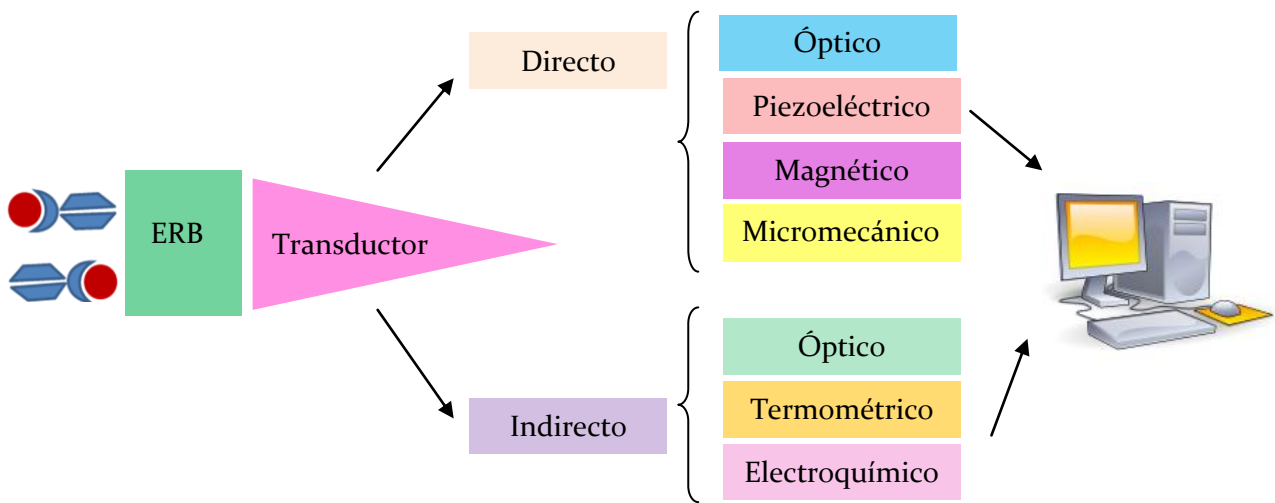


Figura 2.6. Esquema de un diseño general de un inmunosensor.

Los transductores electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos serán descritos detalladamente más adelante, debido a que son los que más ampliamente se han utilizado en los diseños de inmunosensores en las últimas décadas. Con respecto a los transductores termométricos se utilizan rutinariamente para medir la temperatura del cuerpo o del medio ambiente. Si bien, hasta el presente las herramientas requeridas para el correcto funcionamiento de estos dispositivos están disponibles, los problemas más relevantes de estos transductores están en la estabilidad y la manipulación de los fluidos (Ramanathan y Danielsson, 2001). Por otro lado, los transductores magnéticos y micromecánicos están en continuo avance y desarrollo. Los sistemas magnéticos permiten seleccionar la muestra para análisis debido a sus propiedades magnéticas, reduciendo las señales indeseables y utilizando materiales de baja toxicidad, no contaminantes para el medio ambiente (Cheng y col., 2009). Los sistemas micromecánicos, como los microcantilever, presentan la ventaja de no necesitar rótulo para revelar la respuesta debida al inmunocomplejo desarrollado. Se basan en el cambio de tensión generado cuando el evento de bioafinidad se produce sobre la superficie de oro. La sensibilidad de estas detecciones no sólo depende de las dimensiones y del material del microcantilever sino también del método de inmovilización (Xue y col., 2011).

INTRODUCCION

2.2.1. Los anticuerpos como elementos de bioreconocimiento en inmunosensores

Es importante destacar que la especificidad hacia el analito de interés en todos los sistemas de inmunosensores, depende de las moléculas de unión. Con la finalidad de mejorarlos se han implementado nuevos desarrollos en la producción de proteínas de unión, como son los fragmentos de anticuerpos o anticuerpos quiméricos o sustituir los anticuerpos por componentes de unión como los aptámeros o utilizar estructuras como la impresión molecular.

2.2.1.1. Procedimiento de inmovilización de anticuerpos

En el desarrollo de un inmunosensor electroquímico, la etapa crucial es el procedimiento para inmovilizar el elemento de reconocimiento directamente sobre la superficie del electrodo o en otro soporte sólido. Los métodos de inmovilización del componente biológico (anticuerpo o antígeno) incluyen adsorción, entrecruzamiento, uniones covalentes, entrampamiento, encapsulación y otros como el uso de matrices de unión sólida. La matriz de inmovilización puede funcionar únicamente como un soporte o también puede estar relacionada con la mediación del mecanismo de transducción de señales. El propósito de la inmovilización es retener la máxima actividad del componente biológico sobre la superficie del transductor. La selección de un método de inmovilización apropiado depende de la naturaleza del elemento biológico, del tipo de transductor usado, de las propiedades fisicoquímicas del analito y de las condiciones operativas para el biosensor. Los métodos más comunes para la inmovilización de los biocomponentes son adsorción y uniones covalentes. La *adsorción física* del biocomponente, basado en las fuerzas atractivas de van der Waals, es el método de inmovilización más antiguo y simple. En este caso una solución de enzima, una suspensión de células o una parte de tejido puede ser inmovilizada sobre el transductor por deposición de una fina película (Ricci y col., 2012). El método de adsorción no requiere modificación química de los componentes biológicos y esto hace posible regenerar la membrana de la matriz. La ventaja de este método es la simplicidad y la gran variedad de partículas que pueden ser usadas. Sin embargo, la pérdida de los componentes biológicos adsorbidos es posible si se cambia el pH, la fuerza iónica o la temperatura durante la medida. El *entrampamiento* del biocomponente en matrices tales como geles, polímeros, pastas o tintas mejoran considerablemente su estabilidad y, consecuentemente, el rendimiento analítico del biosensor. Además puede ser esencial para unir covalentemente el ERB al soporte sólido. Las *uniones covalentes* pueden ser usadas para lograr la inmovilización del componente biológico a una matriz de la membrana o directamente sobre la superficie del transductor. Estos métodos están basados en una reacción entre los grupos funcionales terminales de la proteína (no esenciales para su actividad catalítica) y grupos reactivos en la

INTRODUCCION

superficie sólida de la capa insoluble. Los grupos funcionales disponibles en las enzimas o proteínas son, principalmente, originados a partir de la cadena lateral de los aminoácidos. Ellos incluyen, por ejemplo, los grupos ϵ -amino de las lisina, los grupos carboxilo del aspartato y glutamato, los grupos sulfidrilos de la cisteína y los grupos hidroxil-fenólico de la tirosina. Las capas con diferentes grupos funcionales activos son capaces de inmovilizar biocomponentes con buena eficiencia y facilidad. Reactivos bifuncionales (homo o hetero funcionales) han sido usados en la inmovilización de enzimas y/o proteínas. El método se basa en la formación de partículas macroscópicas, como resultado de las uniones covalentes entre moléculas de la capa inerte con reactivos funcionales. Algunos de los reactivos homofuncionales más usados incluyen glutaraldehído, carbodiimina y otros; mientras que los heterofuncionales incluyen tricloro-triacina, 3-metoxidifenil metano-4, 4' diisocianato. Otros procedimientos para modificar la superficie del transductor involucran la incorporación del biocatalizador dentro de la masa de la matriz del composite de carbono. Estos biosensores modificados ofrecen diversas ventajas, tales como la proximidad del biocatalizador al sitio sensor; la posibilidad de incorporar otros componentes (cofactores); una fácil renovación de la superficie; una fabricación económica y una alta estabilidad de los biocatalizadores incorporados. Los biosensores usados con estos propósitos son los electrodos de pasta de carbono, biosensores SPE (electrodos monouso impresos, por sus siglas en inglés) y matrices de unión sólidos de estructura molecular definida (Mello y Kubota, 2002).

Los anticuerpos deben ser inmovilizados en la superficie del inmunosensor, teniendo en cuenta la orientación de los mismos y la cantidad de moléculas inmovilizadas por unidad de superficie óptima. Debido a que existen diferentes tipos de superficie sensora, su manipulación puede tener beneficios (ejemplo: mejorar los parámetros de la cinética de reacción) pero también efectos indeseables (ejemplo: incrementar la unión inespecífica, particularmente destruyendo el paratope). Hay diferentes tipos de uniones para orientar a los anticuerpos: (i) uniones a los receptores Fc en la superficie tales como las proteínas A o G o proteínas de fusión A/G recombinantes (Oh y col., 2005); (ii) enlaces de otros patrones de unión a estructuras covalentemente ligadas a la región Fc del anticuerpo, ejemplo los residuos de biotina en la Fc se unen a estreptavidinas (Díaz-González y col., 2005); (iii) los anticuerpos se inmovilizan sobre la superficie a través de moléculas de carbohidratos oxidadas en el dominio CH₂ de la Fc (Bosnjakovic y col., 2012); (iv) la unión de fragmentos Fab y scFv a la superficie mediante grupos sulfidrilos en su Fc terminal (Benhar y col., 2001; Vallina-García y col., 2007); (v) mediante partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G, A o la combinación A/G (Hervás y col., 2009).

Numerosas reacciones químicas pueden ser aplicadas para la inmovilización sobre la superficie sólida. Vínculos definidos entre el anticuerpo (o su molécula carbohidrato) y el material de fase sólida (sílice, sílice silanizada, óxidos de Ti o Ta, plásticos, cefarosa, films metálicos) han sido

INTRODUCCION

construidos mediante glutaraldehído, carbodiimida, éster succinamida, maleinimida, periodato o galactosa oxidasa (Brynda y col., 1998). Además, la foto-inmovilización de anticuerpos usando albúmina, derivatizada con arildiaziridinas como “fotoenlazador” puede ser aplicada (Gao y col., 1995). La fisiorción o adsorción física no es recomendada debido a la inestabilidad local de la capa causada por el estrés mecánico. En bibliografía se encontró un método basado en la deposición de un film de polimerización de etilendiamina para la inmovilización de anticuerpos en la superficie de cuarzo de un sensor piezoeléctrico (Nakanishi y col., 1996). Otro desarrollo es una bicapa fosfolipídica planar formada en soportes sólidos mediante la fusión de vesículas y el método de Langmuir-Blodgett. Esta bicapa mantiene la fluidez en las dos dimensiones y ordena uniones multivalentes entre los ligandos unidos a la superficie y las moléculas receptoras en solución (Yang y col., 2001). Para las superficies de metales nobles como el oro en inmunosensores ópticos, particularmente, las monocapas auto-ensambladas de tioles son la primera opción. Estas monocapas están construidas a partir de una larga cadena (C_{12} y mayores) de n -alcanotioles con grupos funcionales orgánicos derivatizados, los cuales son fácilmente unidos a la capa de oro mediante los grupos tioles a través de un mecanismo bien conocido (Ullman, 1996). Los grupos funcionales de la monocapa se unen a la Fc del anticuerpo y la auto-organización de la matriz evita uniones inespecíficas y resulta una metodología muy reproducible (Kaiser y col., 2000; Kausaite-Minkstiene y col., 2010).

2.2.2. Otros bioreceptores en biosensores de afinidad

2.2.2.1. Aptámeros

Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) simple cadena con la capacidad de reconocer varios analitos con alta afinidad y especificidad. Estos oligonucleótidos que unen ligandos mimetizan las propiedades de los anticuerpos en una variedad de formatos diagnósticos. Ellos se pliegan en formas globales únicas para formar surcos de unión que interaccionan con las estructuras de los analitos (Jayasena, 1999). Los aptámeros son identificados mediante un proceso de selección *in vitro* SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial, por sus siglas en inglés) (Tuerk y Gold, 1990; Jayasena, 1999), el cual también enriquece selectivamente a los ligandos y los amplifica. La fácil deposición de los aptámeros sobre la superficie sensora resulta una ventaja frente a la utilización de los anticuerpos. Además, debido a que su síntesis es reproducible, pueden ser obtenidos en altas cantidades. Sin embargo, las constantes de afinidad son considerablemente más bajas que las uniones antígeno-anticuerpo y la estabilidad de los aptámeros puede ser cuestionable

 INTRODUCCION

(Luppa y col., 2001). La **Figura 2.7** muestra un ejemplo de aptámero de ARN, cuya molécula de unión es la tetrametilrosamina.

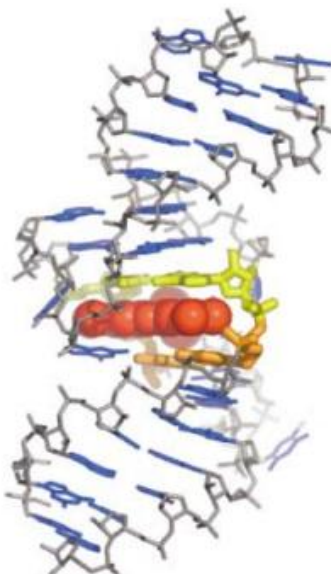


Figura 2.7. Ejemplo de un aptámero de unión a tetrametilrosamina (TMR) unido a TMR (color rojo) a través de un bucle (*loop*, en inglés) formado por dos pares de bases (amarillo y naranja) ubicadas a cada lado del ligando. (Buskirk y col., 2004).

2.2.2.2. Anticalinos

Las lipocalinas constituyen una familia de proteínas de conservación y transporte de compuestos orgánicos sensibles hidrofóbica y/o químicamente, especialmente vitaminas, lípidos, esteroides y otros metabolitos secundarios. Estas existen en muchos organismos, tales como vertebrados, insectos y plantas, incluso en bacterias. Corrientemente, el número de lipocalinas identificadas ha crecido hasta 500. En el cuerpo humano hay más de 12 lipocalinas que ejercen diferentes funciones fisiológicas. Similarmente a las inmunoglobulinas, las lipocalinas humanas existen como proteínas solubles en el plasma y otros fluidos tisulares, con concentraciones hasta aproximadamente $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Muchas de las lipocalinas están libremente distribuidas en el cuerpo donde ejercen una función tampón o de transporte. Por lo tanto, esta familia de proteínas no sólo cumple funciones de transporte o de limpieza de compuestos activos farmacéuticamente, sino también se las utiliza en nuevos desarrollos con finalidades medicinales donde se las unen a drogas terapéuticas. En la **Figura 2.8** se muestran cuatro ejemplos de lipocalinas humanas:

INTRODUCCION

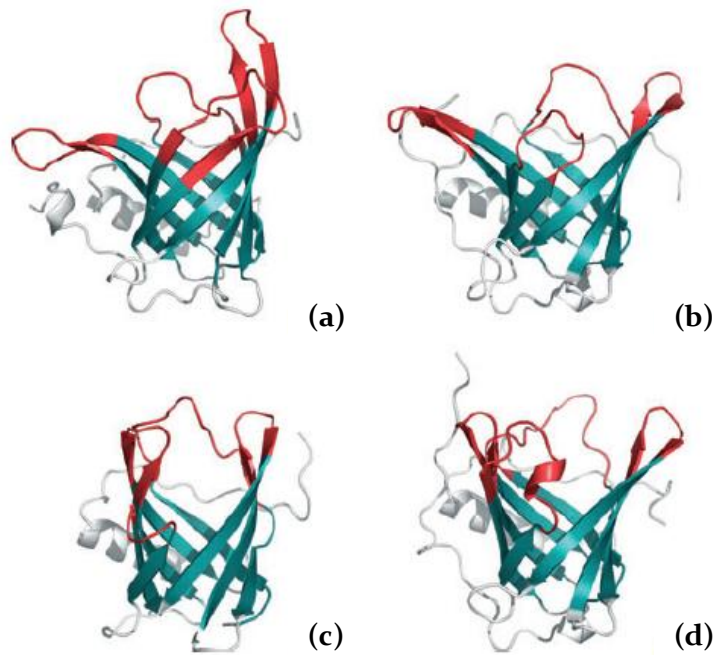


Figura 2.8. Arquitectura molecular de las lipocalinas humanas y variabilidad estructural de sus sitios de unión. Representación de las estructuras cristalinas de cuatro lipocalinas humanas: (a) proteína de unión del retinol, (b) apolipoproteína D, (c) lipocalina fragmentada, y (d) lipocalina asociada a neutrófilo gelatinoso. Las lipocalinas forman un barril- β conservado de ocho cadenas- β antiparalelas (color ciano). Los cuatro bucles expuestos en su extremo abierto (color rojo) forman los sitios de unión al ligando y exhiben gran variabilidad estructural. (Skerra, 2008).

Las ventajas que ofrecen las lipocalinas con respecto a las inmunoglobulinas se resumen en (i) el menor tamaño (< 20 kDa); (ii) una composición más simple, ya que las lipocalinas consisten en una cadena polipeptídica mientras que los anticuerpos tienen cuatro cadenas (dos pesadas y dos livianas); (iii) el sitio de unión de las lipocalinas con cuatro bucles variables estructuralmente es menos complejo y más fácil de manipular que la región hipervariable de los anticuerpos compuesta de seis segmentos bucles no-secuenciales en ambas cadenas polipeptídicas; (iv) reducidas interacciones no deseadas, debido a que las lipocalinas no poseen la Fc; (v) muchas lipocalinas no tienen la glicosilación y pueden ser producidas como proteínas auténticas en sistemas de expresión microbial, mientras que la producción de anticuerpos completamente glicosilados requiere cultivos de células eucariotas caras, cuya optimización y fermentación consume tiempo y es propenso a una capacidad limitada (Skerra, 2008).

 INTRODUCCION

2.2.2.3. *Polímeros impresos molecularmente*

La tecnología de impresión molecular se basa en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales fueron generados. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño, forma y funcionalidad química al analito que fue empleado como “molde” en la síntesis de los polímeros.

La síntesis de los polímeros de impresión molecular consta de tres etapas básicas, que aparecen esquematizadas en la **Figura 2.9**. Durante la primera etapa, se ponen en contacto el analito molde y el monómero, dando lugar a la formación del complejo de prepolimerización. Es importante destacar que las propiedades del polímero obtenido dependen en gran medida del tipo de enlace formado entre el monómero y el analito molde y su estabilidad. En la segunda etapa se lleva a cabo la polimerización propiamente dicha. Esta polimerización generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalario y puede estar inducida tanto térmica como fotoquímicamente. En la tercera etapa se elimina el analito molde de la matriz polimérica, liberando así cavidades que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito molde. La presencia de estas cavidades, teóricamente, hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva tanto al analito molde como a otros compuestos estructuralmente análogos (Wenz, 1994).

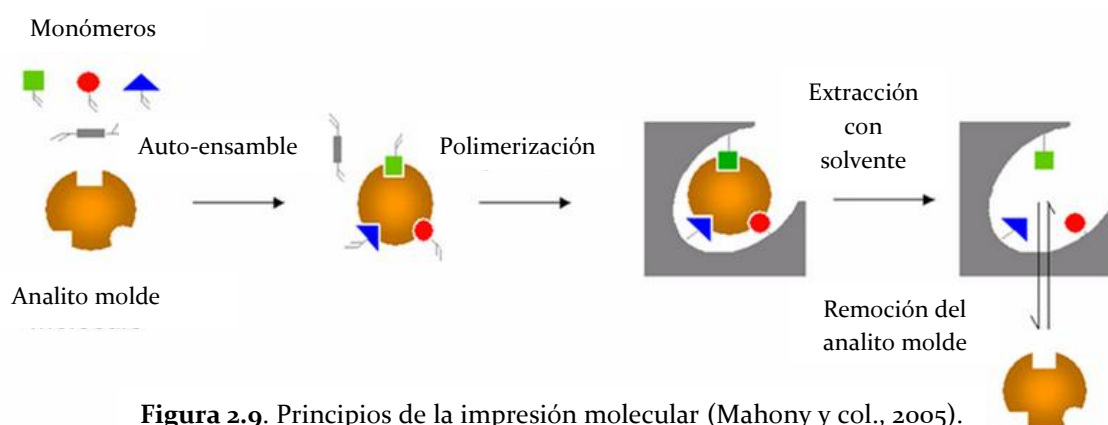


Figura 2.9. Principios de la impresión molecular (Mahony y col., 2005).

2.2.3. *Formatos de la inmunoreacción*

Diversas variaciones de formatos de inmunoensayos han sido desarrollados, permitiendo detectar cualitativa o cuantitativamente tanto antígenos como anticuerpos. Dependiendo del analito que se desee determinar, las configuraciones estándares de los inmunoensayos se pueden clasificar como se muestra en la **Figura 2.10** en: competitivo, sándwich o directo cuando el analito investigado es un antígeno; y en competitivo, indirecto o directo cuando es un anticuerpo (Ricci y col., 2007). En

INTRODUCCION

el caso de los formatos competitivos, indirectos y sandwiches se necesita un rótulo para la detección de la señal mientras que en los directos no es necesario, siendo la señal detectada principalmente mediante transductores ópticos y/o piezoeléctricos.

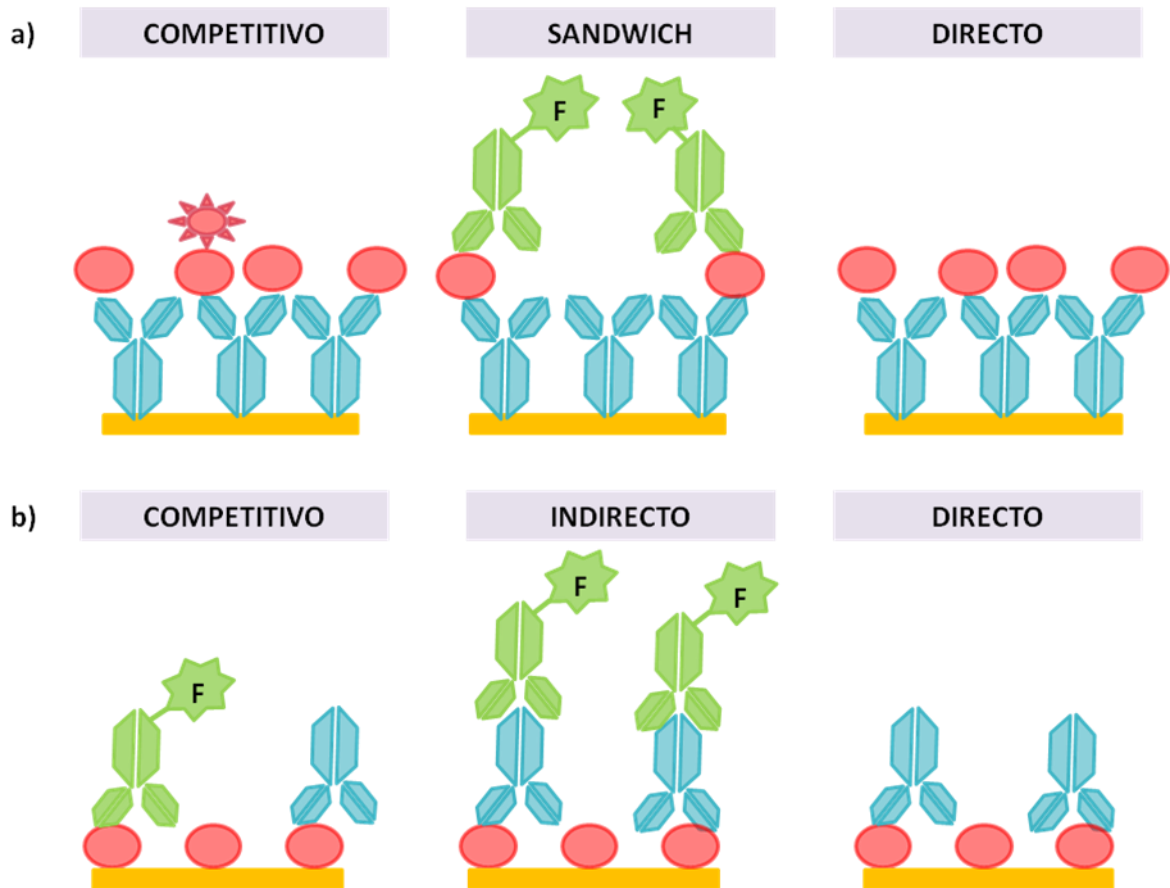


Figura 2.10. Formatos de los inmunoensayos donde se busca detectar en la muestra, (a) un antígeno o (b) un anticuerpo.

En un *ensayo competitivo* el antígeno o anticuerpo rotulado compite con el analito a investigar por los sitios de unión del anticuerpo o antígeno complementario inmovilizado en la superficie, respectivamente. Por lo tanto, la señal obtenida será inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

En un *ensayo sándwich* el anticuerpo de captura es inmovilizado en la superficie y se une al antígeno presente en la muestra. Luego un segundo anticuerpo rotulado se une a un epítopo diferente del antígeno, generando una señal que será directamente proporcional a la concentración del analito. La limitación de los ensayos sándwich es que no pueden ser usados para la determinación de haptenos.

INTRODUCCION

En un *ensayo indirecto* el antígeno inmovilizado en la superficie capta al anticuerpo a investigar y luego se une a un anticuerpo rotulado que generará una señal directamente proporcional a la concentración de anticuepo en la muestra. Este formato es utilizado con el fin de evitar problemas relacionados a la inmovilización de anticuerpos (pérdida de afinidad y orientación correcta de los anticuerpos) y cuando los anticuerpos primarios conjugados con la enzima para el analito determinado no están disponibles comercialmente.

En un *ensayo directo* el antígeno o anticuerpo a investigar se unirán a su anticuerpo o antígeno complementario inmovilizado en la superficie, respectivamente. Este tipo de ensayo se utiliza en metodologías en las cuales se puede detectar directamente al analito sin necesidad de rótulos, siendo la señal obtenida directamente proporcional a la concentración del analito. Para los analitos con bajo peso molecular tales como antibióticos, hormonas y residuos de drogas veterinarias la sensibilidad de estos ensayos no es suficiente, por lo que se prefieren formatos competitivos o sándwich.

2.2.4. Transductor electroquímico

Las medidas electroquímicas, basadas en tres tipos de señales analíticas (potencial, corriente y carga), se realizan en una celda electroquímica constituida por dos o más electrodos, asociados electrónicamente para controlar y medir el potencial y la corriente. En el caso de una celda compuesta de dos electrodos inmersos en una solución, al aplicar un potencial externo entre dichos electrodos, se producirá la circulación de una corriente eléctrica derivada de los procesos electroquímicos que ocurren en la interfaz electrodo-solución. El origen de esta corriente puede ser la transferencia de carga debida a reacciones químicas (procesos faradaicos) o a la reorganización de la carga en la interfaz (procesos no faradaicos). Generalmente, en electroquímica los estudios se centran en uno de los electrodos (electrodo de trabajo o indicador), en el cual se produce una reacción del tipo que aparece en la Ecuación 2.3.



En función del potencial aplicado, se dará lugar a la circulación de corriente en uno u otro sentido. La relación entre el potencial en la interfaz electrodo-solución y la corriente derivada de la transferencia de carga durante la reacción va a estar dada por la ecuación de Butler-Volmer (ver Ecuación 2.4).

INTRODUCCION

$$i = n_e F A k^o \left[C_0 e^{\frac{\alpha n_e F}{RT} (E_{e-s} - E^o)} - C_R e^{\frac{(1-\alpha) n_e F}{RT} (E_{e-s} - E^o)} \right] \quad (2.4)$$

Donde: i es la corriente que atraviesa la interfaz electrodo-solución; F es la constante de Faraday ($96485,34 \text{ C mol}^{-1}$); A es la superficie de contacto entre el electrodo y la solución; k_o es la constante de velocidad de la reacción estándar; C_0 es la concentración de la especie O en la interfaz; α es el coeficiente de transferencia; n_e es el número de electrones involucrados en la reacción (ver Ecuación 2.3); R es la constante universal de los gases ideales ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); E_{e-s} es el potencial en la interfaz electrodo-solución; E^o : potencial normal del par redox; C_R : concentración de la especie R en la interfaz.

Por lo tanto, esta relación viene condicionada por las características intrínsecas de la reacción (que a su vez dependen de la naturaleza del electrodo y de las especies que reaccionan), la superficie de contacto entre el electrodo y la solución, la concentración de las especies involucradas en la reacción y la temperatura.

Cuando no se produce circulación de corriente, es decir cuando existe un equilibrio en la reacción de la Ecuación 2.3, el valor del potencial en la interfase electrodo-solución puede expresarse en función de las concentraciones de las especies que reaccionan mediante la ecuación Nernst (Ecuación 2.5).

$$E_{e-s} = E^o + \frac{RT}{n_e F} \ln \left(\frac{C_o}{C_R} \right) \quad (2.5)$$

2.2.4.1. Clasificación de los métodos electroquímicos

La **Figura 2.11** esquematiza la clasificación de los métodos electroquímicos en dos grupos, por un lado en el seno de la solución, en el cual se miden las propiedades de la solución completa y por el otro en la interfase, en el cual la señal es función del fenómeno que ocurre en la interfaz electrodo-solución.

INTRODUCCION

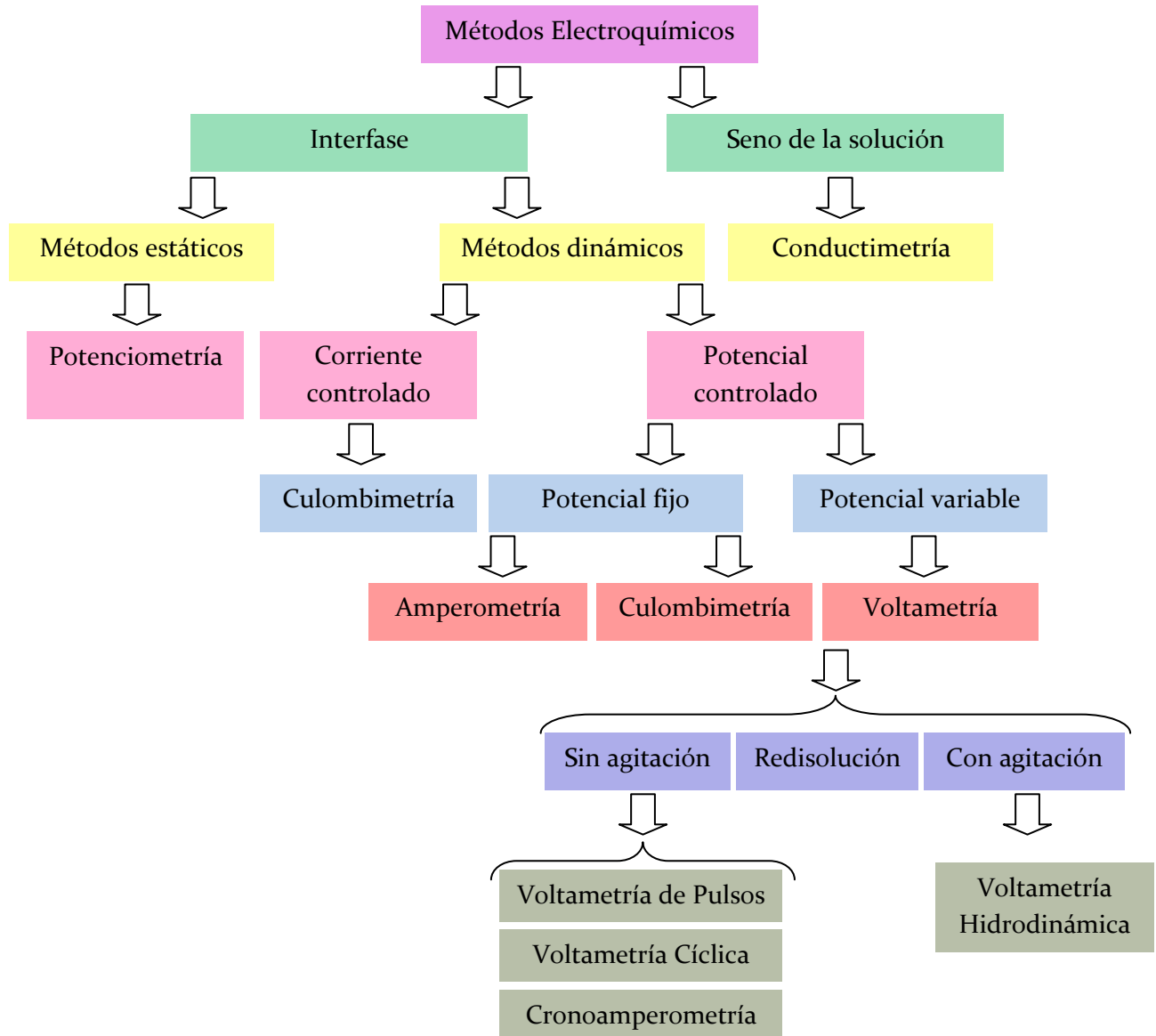


Figura 2.11. Clasificación de los métodos electroquímicos.

A continuación se describirán algunos de estos métodos electroquímicos aplicados en el desarrollo de los inmunosensores.

2.2.4.1.1. Métodos electroquímicos en el seno de la solución

Dentro de este grupo se encuentran los inmunosensores conductimétricos y capacitivos.

❖ Los *conductimétricos* miden la alteración de la conductividad eléctrica causada por reacciones bioquímicas (enzimáticas) en una solución a voltaje constante. Los cambios de capacitancia son medidos usando un sistema electroquímico, en el cual el elemento bioactivo se

INTRODUCCION

inmoviliza sobre un electrodo de metal noble (Au o Pt). Hay pocas aplicaciones clínicas disponibles, debido a que la alta fuerza iónica de las matrices biológicas dificultan la recolección de pequeños cambios de conductividad neta. Para solucionar este problema, Yagiuda y col. (1996) diseñaron un inmunosensor en el cual se medía el cambio de la conductividad en la superficie; debido a que la formación del inmunocomplejo causaba una disminución de la conductividad entre los electrodos. Luego, Cornell y col. (1997) desarrollaron un inmunosensor de conductancia de canal iónico que imitaba las funciones sensoras biológicas.

❖ Los *capacitivos* a través de su recíproca a voltaje alternativo, resultan ventajoso con respecto a los dispositivos conductimétricos. Se los utiliza principalmente con dos propósitos: (i) controlar la monocapa aislante de la superficie de metal noble del sensor, ya que cuando ocurre una pequeña desorción de la monocapa se obtiene un incremento de la capacitancia; (ii) medir el cambio en el espesor dieléctrico de la capa aislante durante la unión del antígeno a los anticuerpos inmovilizados a una capa alcanotiol.

2.2.4.1.2. Métodos electroquímicos en la interfaz electrodo-solución

Dentro de este grupo se encuentran dos grandes categorías: los métodos estáticos en los cuales no hay circulación de corriente y los métodos dinámicos en donde si la hay. Estos últimos, a su vez se dividen en métodos en los que el parámetro eléctrico controlado es la corriente y métodos en los que el parámetro controlado es el potencial.

2.2.4.1.2.1. Métodos estáticos

Dentro de estos métodos se encuentran los *inmunosensores potenciométricos*, basados en la medida del cambio de potencial, el cual por la ecuación de Nernst será logarítmicamente proporcional a la actividad específica del ión de interés. El equipamiento requerido para las medidas potenciométricas directas incluye un electrodo ión selectivo, un electrodo de referencia y un dispositivo de medida del potencial como se muestra en la **Figura 2.12**. El electrodo ión selectivo es un electrodo indicador capaz de medir selectivamente la actividad de una especie iónica particular. Estos electrodos exhiben una respuesta rápida en un intervalo lineal amplio, no son afectados por color o turbidez, no son destructivos y son económicos.

INTRODUCCION

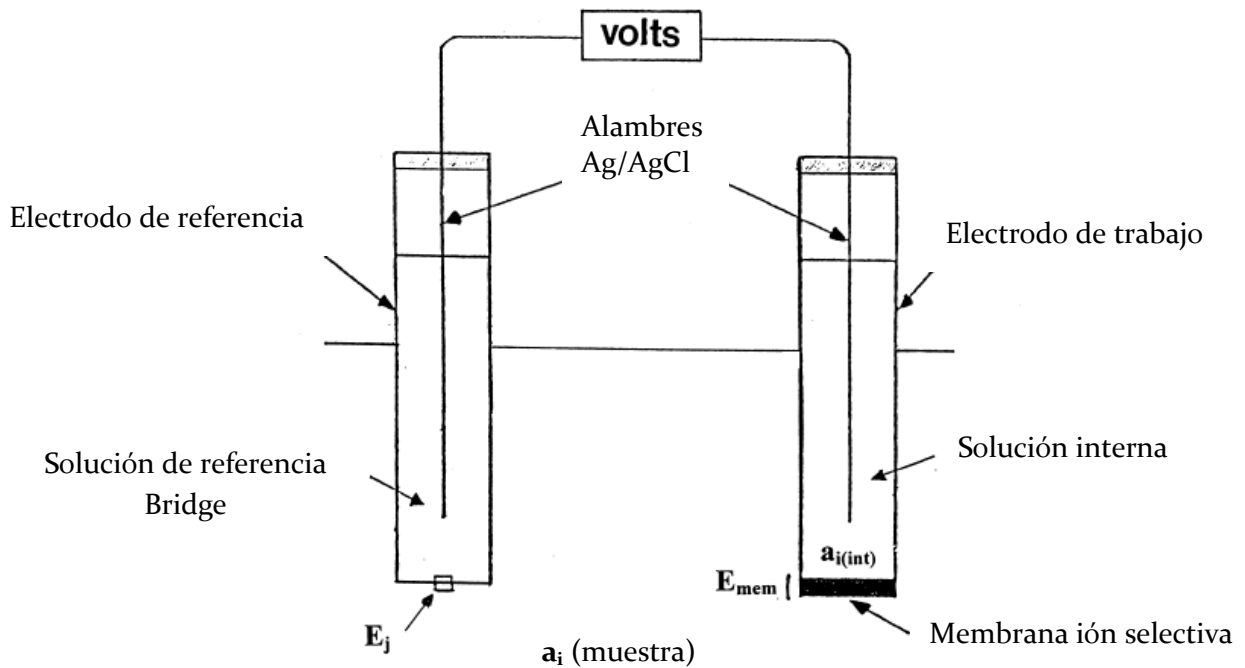


Figura 2.12. Diagrama esquemático de una celda electroquímica para medidas potenciométricas.

Los electrodos ión selectivos son, principalmente, dispositivos basados en membranas, constituidos de materiales ión-conductores, de permeabilidad selectiva que separan la muestra de la solución de llenado localizada en el interior del electrodo. Esta solución contiene al ión de interés a una actividad constante. La membrana es usualmente no porosa, insoluble en agua y estable mecánicamente y la composición de la misma está diseñada para mantener un potencial constante debido al ión de interés mediante, por ejemplo, un proceso de intercambio de iones que ocurre en la interfaz membrana-solución (Wang, 2001).

Los electrodos potenciométricos han sido construidos aplicando las siguientes metodologías: (i) *Potencial transmembrana*: su principio se basa en la acumulación de un potencial a través de la membrana sensora. Los electrodos ión selectivos utilizan membranas selectivas que generan una separación de carga entre la muestra y la superficie del sensor. Análogamente, el antígeno o anticuerpo inmovilizado en la membrana se une al compuesto de interés sobre la superficie y cambia el potencial transmembrana. (ii) *Potencial electrodo*: es similar al potencial transmembrana, sólo que en este caso el electrodo es la superficie sobre la cual se une el inmunocomplejo, cambiando el potencial del electrodo en relación a la concentración del analito. (iii) *Transistor de efecto campo (TEC)*: es un dispositivo semiconductor que monitorea la corriente que fluye entre dos terminales (fuente y drenaje) mediante una magnitud eléctrica aplicada a un tercero, llamado terminal de control o entrada. El potencial de superficie varía con la concentración del analito.

INTRODUCCION

Una ventaja de los sensores potenciométricos es la simplicidad de la operatoria, la cual puede ser usada para la automatización y, el pequeño tamaño de los sensores TEC. Todos los métodos potenciométricos, sin embargo, sufren grandes problemas de sensibilidad (siendo esta inferior a la obtenida con los transductores amperométricos) y de efectos de no-especificidad de unión o señalización (influenciada por la presencia de otros iones en la muestra).

2.2.4.1.2.2. Métodos dinámicos

Los métodos dinámicos a potencial controlado miden el flujo electrónico hacia un electrodo inerte, al aplicar un potencial que dirige el flujo electrónico desde o hacia la molécula rédox monitoreada. El sistema fundamental de medida, llamada celda electroquímica, usa tres electrodos, como se observa en la **Figura 2.13**.

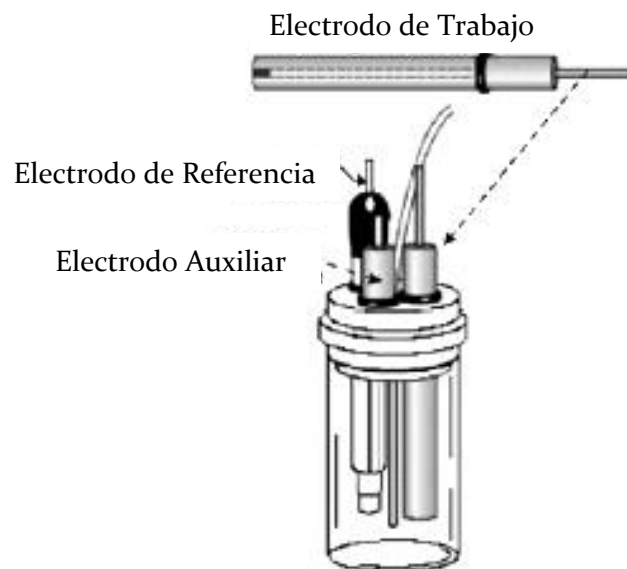


Figura 2.13. Esquema de una celda amperométrica con la configuración general de un inmunosensor potencioestático (Bojorge-Ramirez y col., 2007).

❖ El electrodo de referencia gobierna el valor de potencial aplicado al electrodo de trabajo, está constituido por dos especies de una cupla rédox de composición constante, ejemplos clásicos son Ag/AgCl y $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (calomel). Para minimizar la contaminación de la solución con la muestra, el electrodo de referencia se aísla a través de un puente salino intermediario.

❖ El electrodo auxiliar lleva el flujo de corriente fuera del electrodo de referencia y está formado a partir de un material conductor inerte, como es un cable de platino o varilla de grafito (Wang, 2001).

INTRODUCCION

❖ En el electrodo de trabajo es donde ocurre la reacción deseada y es contruido a partir de metales inertes, como platino, oro y diversas formas de carbono, incluyendo fibra de carbono, grafito epoxy, grafeno o carbono vítreo (*glassy carbon*, en inglés). La elección de este electrodo es un factor crucial, debido a que afecta la sensibilidad de la metodología, el costo del análisis y la posibilidad de adoptar diferentes procedimientos de inmovilización en el diseño del inmunosensor. Los electrodos comúnmente elegidos son a base de carbono, debido a su bajo costo, buena cinética y biocompatibilidad en la transferencia electródica (Jacobs y col., 2010).

Muchas compañías ofrecen como electrodos de trabajo a barras recubiertas de teflón donde una terminal es la superficie sensora y la otra es la conexión al instrumento. A pesar de que estos sensores son ampliamente utilizados en laboratorios electroquímicos, no son usados con aplicaciones hacia los inmunosensores. Esto se debe a que un inmunoensayo electroquímico requiere diversos pasos y muchos puntos de optimización, por lo que se haría indispensable contar un un alto número de estos electrodos o reutilizar un inmunosensor durante muchos experimentos. Además, estos electrodos son bastante costosos y, debido a que no son susceptibles a las modificaciones sobre su superficie, en la etapa de inmovilización se necesitaría sumergirlos en la solución muestra durante un largo período de tiempo.

El uso de los SPE en la detección electroquímica ha mejorado la sensibilidad de los métodos. Dentro de las ventajas que presentan los SPE se pueden citar el bajo costo de producción, que se pueden elaborar en grandes cantidades y, además, que después de la inmovilización del analito no se requieren etapas de pre-tratamiento o limpieza (Hayat y col., 2011). En la fabricación de los SPE, la técnica de serigrafía involucra la impresión de diferentes tintas en un soporte plástico o cerámico plano. Su naturaleza plana permite la fácil modificación de la superficie electródica. Debido a las dimensiones miniaturizadas de los SPE, todas las etapas inmunológicas pueden ser realizadas en una gota, por lo cual se reduce el consumo de reactivos y de muestra. Los SPE disponibles comercialmente están constituidos de oro, grafito y plata (Ricci y col., 2012). En la actualidad existen arreglos de ocho electrodos impresos (Deng y Yang, 2007; Zani y col., 2011; Adornetto y col., 2012) y arreglos de electrodos en placas de 96 pocillos (Ricci y col., 2007; Delibato y col., 2009; Neagu y col., 2009), lo cual a reducido los tiempos de análisis.

Una alternativa a los SPE es el uso de fotolitografía, para la producción de electrodos adecuados para la integración en sistemas de microfluídica y para la construcción de arreglos múltiples (Ortiz y col., 2011; Kellner y col., 2011).

INTRODUCCION

2.2.4.1.2.2.1. Integración de materiales nanoestructurados en inmunosensores electroquímicos

Como se comentó anteriormente, la superficie de los electrodos no es sólo el soporte para la inmovilización del elemento de reconocimiento, sino que también actúa como una superficie sensora. Por esta razón, se ha buscado mejorar el comportamiento electroquímico de los electrodos con el uso de diferentes nanomateriales. Ejemplos de nanomateriales son los nanotubos de carbono (Serafin y col., 2011), las nanopartículas de oro (Tang y col., 2010) y el grafeno (Liu y col., 2011), los cuales han mejorado el rendimiento analítico electroquímico (Iost y Crespilho, 2012).

Los nanotubos de carbono, si bien tienen los mismos problemas que los electrodos de carbono tradicional, ofrecen como ventajas el mejoramiento de las propiedades electrónicas, la alta relación plano límite/plano basal y la rápida cinética electroquímica. Esto hace que las metodologías en las cuales se los emplee presenten alta sensibilidad y bajos límites de detección. Además, estos electrodos pueden tener una alta conductividad, estabilidad química favorable y fuerza mecánica, dependiendo del método de síntesis de los nanotubos, la modificación de su superficie, el método de fijación del electrodo y la incorporación de un mediador electroquímico. Después de la síntesis, los nanotubos pueden ser funcionalizados en su superficie, de manera de unir posteriormente moléculas que permitan detectar al analito de interés mediante la reacción inmunológica (Jacobs y col., 2010).

Las nanopartículas de oro presentan buena biocompatibilidad, excelente eficiencia en la transferencia electroquímica y amplia área de superficie específica. Además, ellas pueden unirse fuertemente con varios grupos funcionales a través de enlaces covalentes, incluyendo CN, NH₂ o SH (Yang y col., 2013).

Los grafenos por su parte, se caracterizan por una conductividad térmica de 3 kW m⁻¹ K⁻¹, exhibir el efecto Hall cuántico a temperatura ambiente, tener la mayor relación posible de superficie/volumen (2600 m² g⁻¹), poseer alta velocidad de transferencia electroquímica (mayor a 200 000 cm² V⁻¹ s⁻¹) y excepcional estabilidad térmica. Estas propiedades posibilitan la detección altamente sensible del analito (Kochmann y col., 2012).

Sin embargo, el uso de tales nanomateriales no siempre es conveniente para la producción en grandes cantidades de los sensores, por lo que su comercialización resulta poco factible. Los protocolos de modificación de la superficie llevan procesos largos y complicados, o en los mejores casos, resulta difícil su implementación como un proceso industrial. Además, se debe tener en cuenta el costo de estos materiales, que usualmente son caros debido a que provienen de compañías especializadas. A pesar de todo esto, la compañía líder en producción de electrodos impresos (DropSens) ofrece SPE modificados con una o varias capas de nanotubos de carbono (Ricci y col., 2012).

INTRODUCCION

Otro material nanoestructurado utilizado por Escosura-Muniz y Merkoçi (2011) para la inmovilización del elemento de reconocimiento son las membranas de filtro nanoporoso en óxido de aluminio anodizado. Las ventajas atribuibles a la utilización de este material corresponden a un incremento en el área superficial y una mayor sensibilidad del sensor.

2.2.4.1.2.2.2. Integración de partículas magnéticas en inmunosensores electroquímicos

La inmovilización del ERB sobre la superficie del electrodo puede ser difícil o requerir muchos pasos, que no siempre son adecuados para una producción en masa. Otro problema en este aspecto es que el electrodo es usado en la cadena inmunológica completa, lo cual causa posible pasivación o “envenenamiento” de la superficie del electrodo a través de la adsorción no-específica de otras especies presentes en la muestra. Además, como la cadena inmunológica usualmente requiere muchos pasos de lavado, estos pueden causar defectos en la capa del elemento de reconocimiento, que pueden comprometer la reproducibilidad de los resultados. Asimismo, la deposición del elemento de reconocimiento sobre la superficie del electrodo puede obstaculizar la cinética de la reacción anticuerpo/antígeno y, puede limitar el número de biomoléculas que puedan ser inmovilizadas en la superficie del electrodo. Todos estos inconvenientes han sido solucionados con el uso de las partículas magnéticas (PM) o nanopartículas magnéticas (Hayat y col., 2011; Lum y col., 2012) como soporte de inmovilización del elemento de reconocimiento. Las PM, como se muestra en la **Figura 2.14**, están constituidas de una dispersión de material magnético (Fe_2O_3 y Fe_3O_4) en el núcleo y recubiertas con una fina capa de polímero, que también define un área superficial para la adsorción y acople de una gran variedad de moléculas.

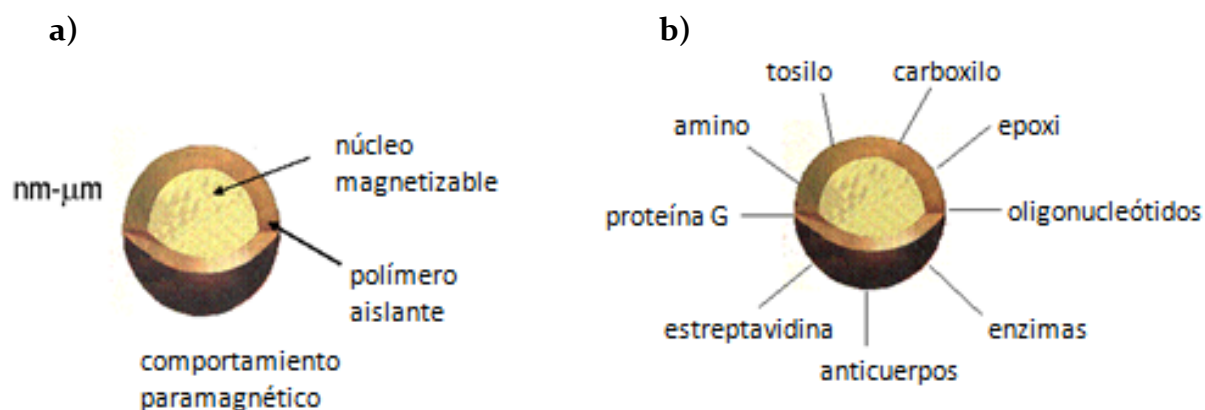


Figura 2.14. (a) Estructura general de una partícula magnética, y (b) posibles grupos funcionales que pueden encontrarse sobre su superficie.

INTRODUCCION

Las PM pueden ser fácilmente funcionalizadas con diferentes grupos, tales como estreptavidina (Moreno-Guzman y col., 2011), grupos tosilos (Zacco y col, 2007; Lermo y col., 2009; Romanazzo y col., 2010; Yang y col., 2013), grupos aminos (Wang y col., 2008), proteínas o anticuerpos (Mendes y col., 2012; Ling y col., 2012; Mendonça y col., 2012; Adornetto y col., 2012; Fornara y col., 2013) para una rápida y específica inmovilización del elemento de reconocimiento. Además, debido a su pequeño tamaño y geometría esférica, un gran número de biomoléculas pueden ser inmovilizadas sobre la superficie de estas PM funcionalizadas. La utilización de estas partículas mejora la sensibilidad del ensayo, disminuye el posible efecto matriz de la muestra, evita etapas complejas de pretratamientos, permite reducir los tiempos de reacción y utilizar pequeños volúmenes de solución en la superficie del electrodo de trabajo (Pividori y Alegret, 2005; Zacco y col., 2006; Ricci y col., 2012).

La reacción inmunológica completa se realiza en micro-tubos. En uno de sus lados, las PM son concentradas después de cada etapa de lavado e incubación mediante un separador magnético, el cual permite fácilmente descartar el sobrenadante. Una ventaja adicional del uso de estas partículas es que la inmovilización del ERB a las PM puede ser realizada en grandes cantidades en un paso simple y, luego, las partículas modificadas pueden ser conservadas por varias semanas sin que el ERB pierda actividad. Esto puede ser crucial cuando un gran número de muestra es analizada, ya que permite una reducción importante del tiempo de análisis. En cuanto al electrodo, en este caso sólo es utilizado como superficie sensora, por lo que no sufre procesos de pasivación o interferencia electroquímica. El único problema representado por el uso de PM como elemento de reconocimiento es que puede haber una disminución de la sensibilidad, debido a que el producto electroactivo no está en contacto directo con la superficie del electrodo (Ricci y col., 2012). Para evitar esto, se han diseñado electrodos con la superficie magnetizable a través de la inclusión de las PM en el material electródico (Zacco y col., 2007) o de pequeños magnetos (preferentemente de neodimio) debajo de la superficie del electrodo de trabajo (Adornetto y col., 2012).

2.2.4.1.2.2.3. Clasificación de las técnicas electroquímicas dinámicas

Las técnicas electroquímicas dinámicas, a potencial controlado, se dividen en técnicas a potencial fijo (principalmente, la amperometría) y a potencial variable (las voltametrías).

La *amperometría* consiste en aplicar un potencial constante al electrodo de trabajo y registrar la corriente generada en función del tiempo. El potencial aplicado debería ser suficiente para causar fácilmente la oxidación o reducción del analito de interés o de alguna sustancia involucrada con este. La señal analítica será la magnitud de la corriente generada y se la relacionará proporcionalmente

INTRODUCCION

con la concentración del analito. La **Figura 2.15** corresponde a un amperograma donde el analito de interés es reducido como consecuencia del potencial aplicado.

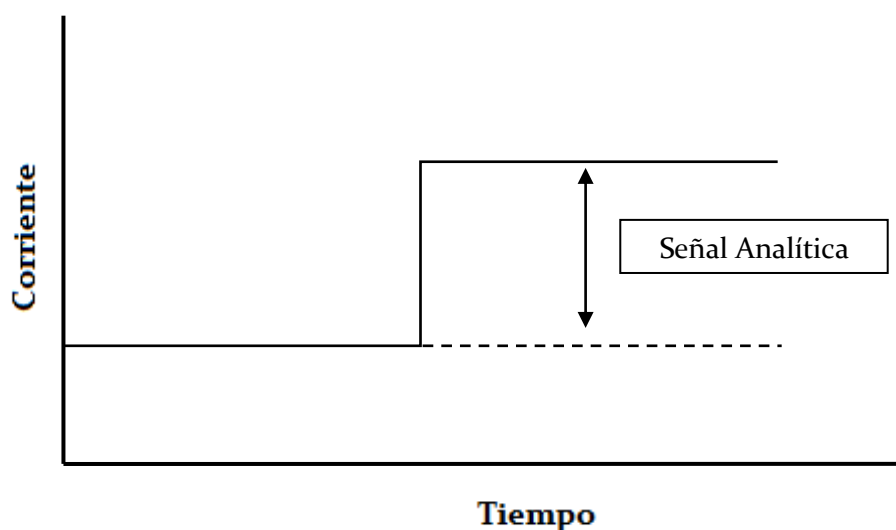


Figura 2.15. Amperograma en el cual se registra la corriente de reducción de un analito en función del tiempo al aplicar el potencial adecuado para el sistema.

Las *voltametrías* consisten en aplicar un potencial dependiente del tiempo y registrar la corriente generada por las especies a investigar, debido a su participación en reacciones de reducción-oxidación. Los gráficos de corriente en función del potencial se llaman voltamogramas y son análogos a los espectros de absorción en espectroscopía, en los cuales se grafica la absorbancia en función de la longitud de onda. A continuación se describirán las voltametrías más comúnmente utilizadas:

Cronoamperometría: involucra aplicar al electrodo de trabajo un salto de potencial, desde un valor en el cual no ocurre la reacción de interés (E_1) hasta otro valor en el cual si se genera dicha reacción (E_2) (**Figura 2.16a**). El voltamograma resultante corresponde a la corriente generada en el tiempo al aplicar este salto de potencial (**Figura 2.16b**).

INTRODUCCION

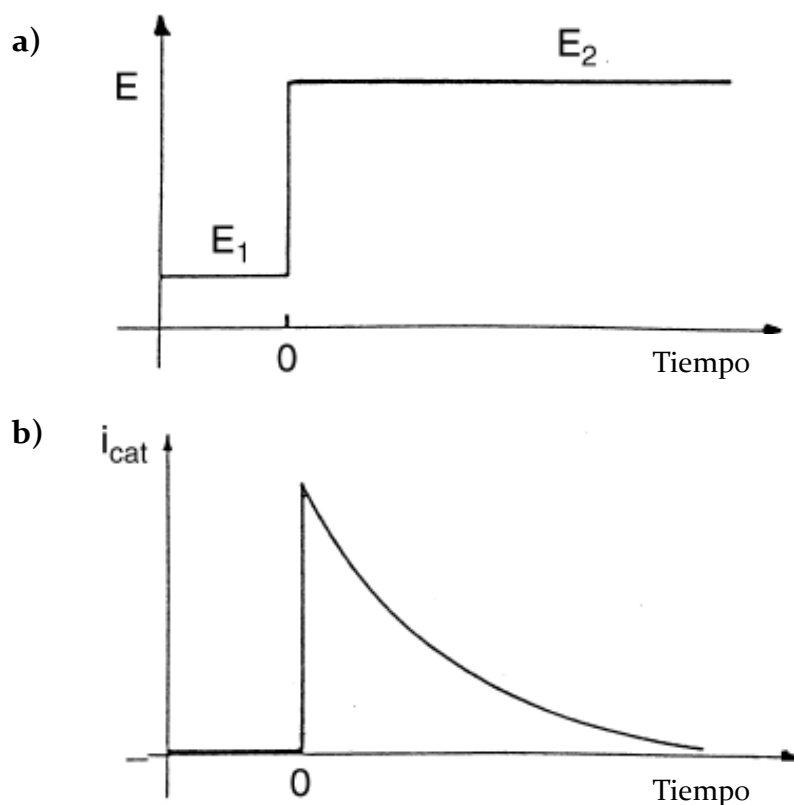


Figura 2.16. (a) Gráfica de potencial en función del tiempo, y (b) voltamograma cronoamperométrico de corriente en función del tiempo (Wang, 2001).

Voltametría de Pulsos: involucra múltiples técnicas agrupadas en función de la amplitud de los pulsos. Básicamente se describirán la voltametría de onda cuadrada (VOC) y la voltametría cíclica (VC), debido a que son las técnicas frecuentemente utilizadas en la detección de la señal electroquímica de los inmunosensores.

VOC: es una técnica de diferencia de amplitud en la cual una onda cuadrada simétrica es aplicada al electrodo de trabajo (**Figura 2.17a**). La corriente es muestreada dos veces durante cada ciclo de onda cuadrada, una vez al final del pulso directo (1) y una vez al final del pulso inverso (2). Debido a que la amplitud de modulación de la onda cuadrada es muy amplia, los pulsos inversos causan la reacción inversa del producto (del pulso directo, si la reacción de electrodo es reversible). La diferencia entre las dos medidas de corriente es graficada en función del barrido del potencial. La **Figura 2.17b** muestra las intensidades de corrientes para un sistema rédox reversible rápido. El voltamograma resultante es simétrico sobre el potencial de media onda y la corriente de pico es proporcional a la concentración del analito (Wang, 2001).

INTRODUCCION

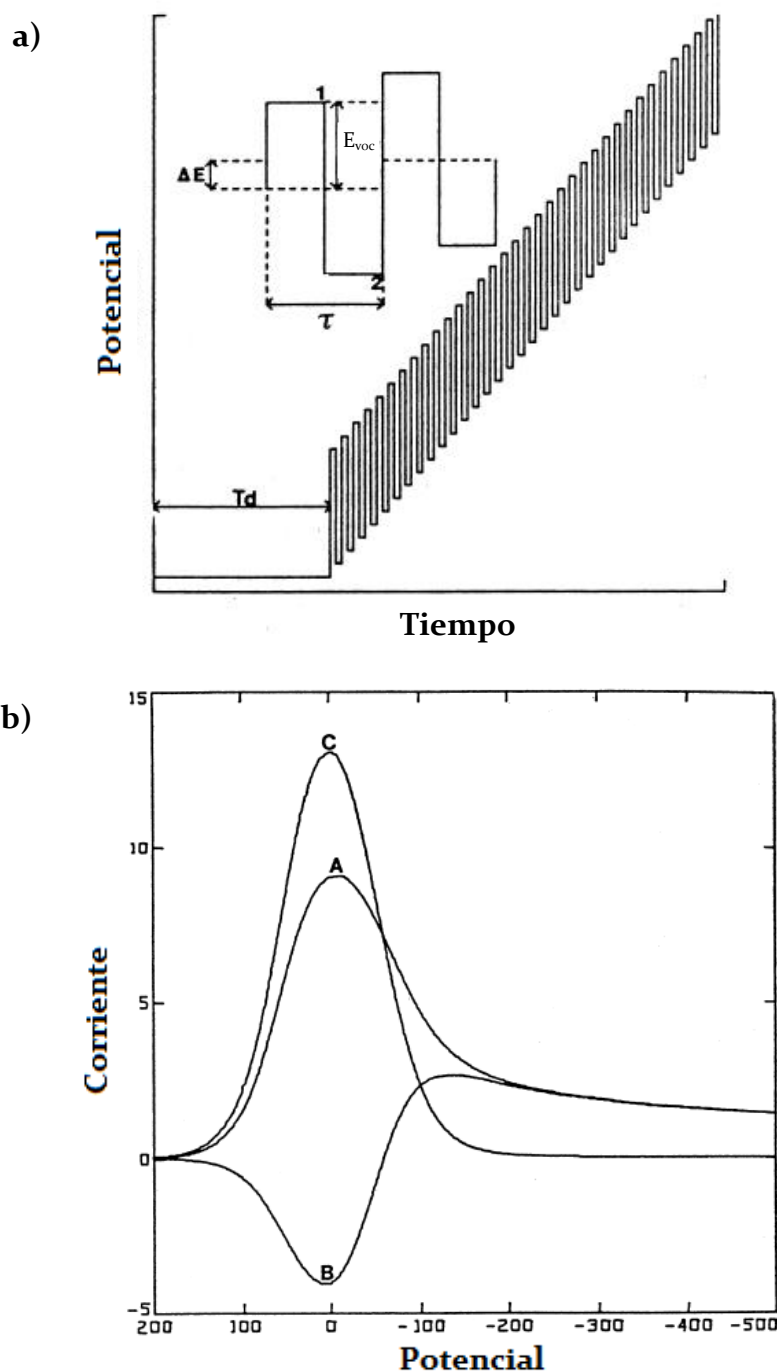


Figura 2.17. (a) La forma de la onda cuadrada muestra la amplitud (E_{voc}); altura entre los escalones (ΔE); el período de onda cuadrada (τ); el tiempo de retardo (T_d); y tiempos de medición de corriente, t_1 y t_2 , y (b) voltamograma de onda cuadrada de un sistema rédox reversible, donde A es la corriente directa; B es la corriente inversa; C es la corriente neta. (Wang, 2001).

VC: consiste en la realización de un barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario usando una onda de potencial de forma triangular (**Figura 2.18a**). Durante el barrido del potencial, el potenciostato mide la corriente resultante a cada potencial aplicado.

INTRODUCCION

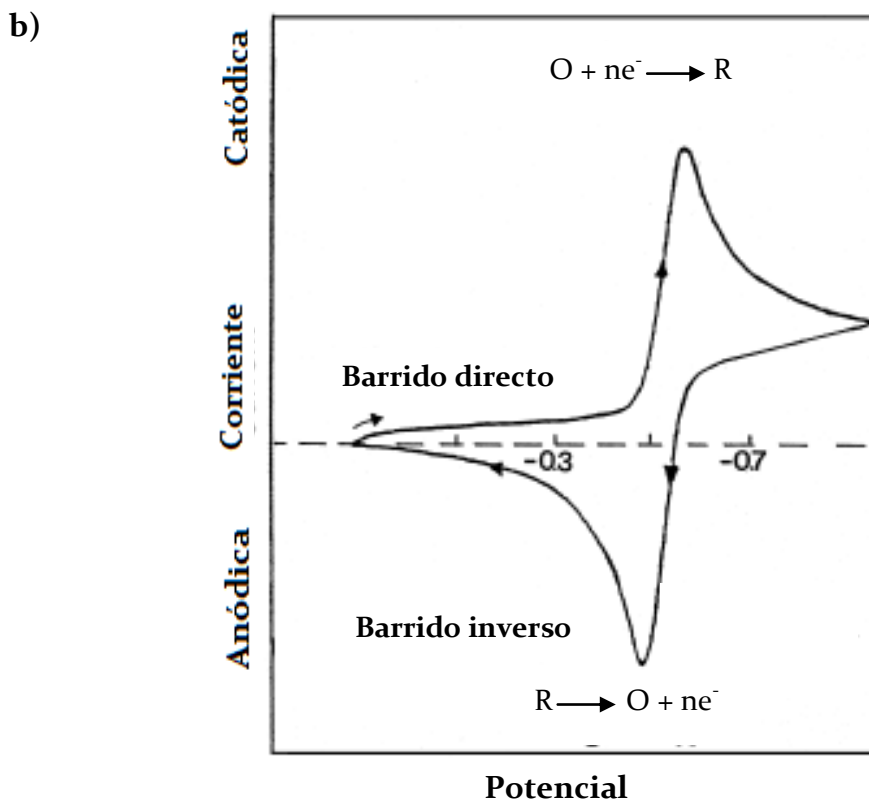
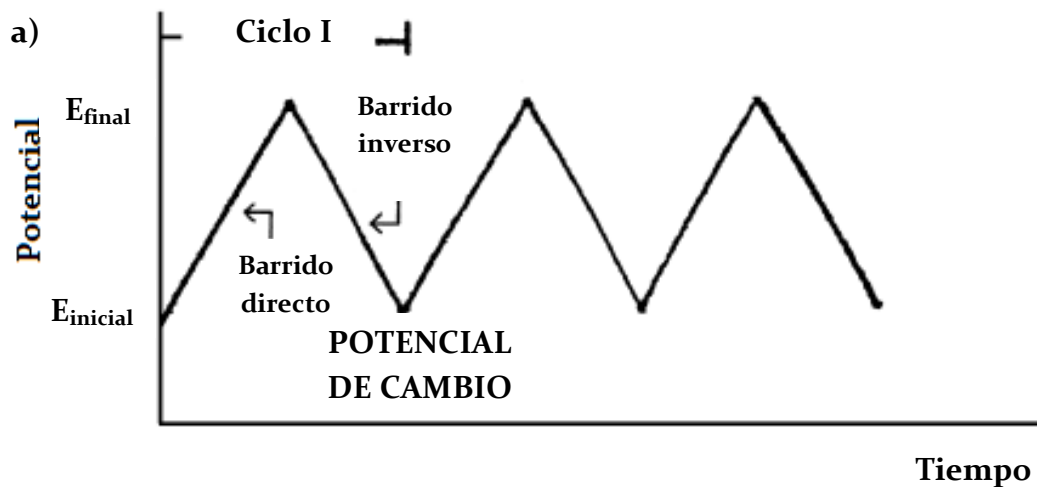


Figura 2.18. (a) Señal de excitación potencial-tiempo en una voltametría cíclica, y (b) voltamograma cíclico típico del proceso redox reversible $O + ne^- \rightarrow R$ (Wang, 2001).

La **Figura 2.18b** corresponde a un voltamograma cíclico típico de una cupla redox reversible durante un ciclo de potencial. Se asume que, inicialmente, sólo la especie oxidada está presente en la solución. Luego, se comienza a desplazar el potencial desde un valor en el cual no ocurre reducción hacia un potencial más negativo que el de partida, y se va registrando la corriente catódica (observando un pico catódico próximo al potencial de reducción de la especie analizada). Luego de recorrer la región de potencial en el cual el proceso de reducción ocurre, la dirección del potencial se

INTRODUCCION

invierte. Durante el barrido inverso, la especie reducida (formada en el barrido directo y acumulada cerca de la superficie del electrodo) se reoxida a la especie oxidada, obteniéndose un pico anódico complementario.

Finalmente, la **Tabla 2.3** resume las aplicaciones con los límites de detección (LD) típicos para las técnicas electroquímicas convencionales.

Tabla 2.3. Características de las técnicas electroquímicas (Wang, 2001).

Técnica	Aplicación	LD (mol L ⁻¹)
Cronoamperometría	Determinar el coeficiente de difusión de las especies electroactivas. Establecer el área efectiva del electrodo de trabajo.	-
Amperometría	Cuantificar al analito de interés.	10 ⁻⁶
VC	Obtener los potenciales y las corrientes en los máximos de oxidación y reducción para la especie en estudio. Estimar si el sistema es reversible, cuasireversible o irreversible.	-
Voltametría de Pulso Normal (VPN)	Cuantificar al analito de interés.	10 ⁻⁷
Voltametría de Pulso Diferencial (VPD)	Cuantificar al analito de interés.	10 ⁻⁸
VOC	Cuantificar al analito de interés.	10 ⁻⁹
Voltametría de Redisolución Anódica (VRA)	Cuantificar al analito de interés.	10 ⁻¹⁰

2.2.5. Transductores ópticos

Son los más populares para el bioanálisis debido a la ventaja de aplicar radiación en la región espectral visible (VIS) comparada con otras técnicas. Además, el modo de operación no es destructivo, generando una señal medible de forma rápida. En particular, la introducción de fibras ópticas (optodes) como longitud de onda óptica y optoelectrónica sofisticada ofrece una versatilidad

INTRODUCCION

incrementada de estos dispositivos analíticos para las aplicaciones clínicas. Cambios en la adsorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción ocurren cuando la luz es reflejada sobre superficies sensantes. Estas informaciones son las bases físicas para las técnicas sensoras ópticas. Usualmente, los detectores aplicados son los fotodiodos o fotomultiplicadores. Por otro lado, si bien estos sistemas libres de rótulos hacen a la metodología rápida, también presentan problemas, como uniones inespecíficas y baja sensibilidad analítica, sobre todo cuando se trata de analitos con bajo peso molecular. A continuación se citarán las técnicas ópticas más frecuentemente usadas como sistema de detección de los inmunosensores.

❖ *Espectroscopía de reflexión interna total*: el principio de este dispositivo se basa en que este sensor posee dos materiales con diferentes índices de refracción (IR), la reflexión interna total ocurre a un cierto ángulo del haz de luz, desde el IR mayor a través de la interfaz sensante. Por lo cual, una onda evanescente es generada en el material con el menor IR. Esta onda penetra en el medio a sensar con una amplitud atenuada exponencialmente. Las biomoléculas del medio interactuarán inevitablemente con la onda evanescente y, por lo tanto, inducirán a una disminución de la luz reflejada. La resolución es directamente proporcional a la longitud de interacción.

❖ *Elipsometría*: si la luz polarizada linealmente de una orientación conocida es reflejada con una incidencia oblicua a la superficie, la luz reflejada es polarizada elípticamente. La forma y orientación de la elipse depende del ángulo de incidencia, de la dirección de la polarización de la luz y de las propiedades de reflexión de la superficie. Hay pocas aplicaciones documentadas hasta el momento.

❖ *Longitud de onda dieléctrica óptica*: se realizan sobre vidrio, cuarzo o films de polímeros o fibras hechas con material de alto IR embebido entre o dentro de materiales dieléctricos de bajo índice. Similar a la resonancia de plasmones superficiales, un campo evanescente se desarrolla sobre la superficie del sensor. En este caso, sin embargo, el campo evanescente es generado por la excitación de la luz en la capa dieléctrica. La mayor parte de la luz láser se transmite en el dispositivo y las reflexiones múltiples se producen a medida que esta viaja a través del medio y va interactuando con sustancias bioactivas. Parte de la luz, sin embargo, penetra en la biocapa. Esta luz se refleja nuevamente en la longitud de onda con un desplazamiento en la fase interferente con la luz transmitida. Por lo cual, cambios en las propiedades de la biocapa pueden ser controlados mediante la detección de cambios en la interferencia.

❖ *Resonancia de plasmones superficiales (RPS)*: entre los diferentes sistemas de detección, RPS es uno de los más populares. El principio general de la RPS se muestra en las **Figuras 2.19a y b**. La luz polarizada es dirigida desde la capa con alto IR hacia la capa con bajo IR para dar una reflexión interna total. La muestra está ligada a la capa con bajo IR. En la interfaz entre los dos medios se encuentra una capa de oro. A pesar que la luz no se propaga en el medio con bajo IR, la intensidad

INTRODUCCION

entre las fases no es igual a cero. El requisito físico de continuidad entre la interfaz es la razón para la excitación de los electrones en la superficie (plasmones) en la capa de metal mediante la energía de luz. Como resultado, los electrones comienzan a oscilar. Esto produce un decaimiento exponencial de la onda evanescente penetrando una distancia definida en el medio de IR bajo, lo cual explica la disminución de la luz reflejada. Por consiguiente, una percepción directa de los cambios de IR sobre la interfaz superficial es posible mediante el monitoreo de la intensidad y el ángulo de resonancia de la luz reflejada, causada por las interacciones bioespecífica (Luppa y col., 2001).

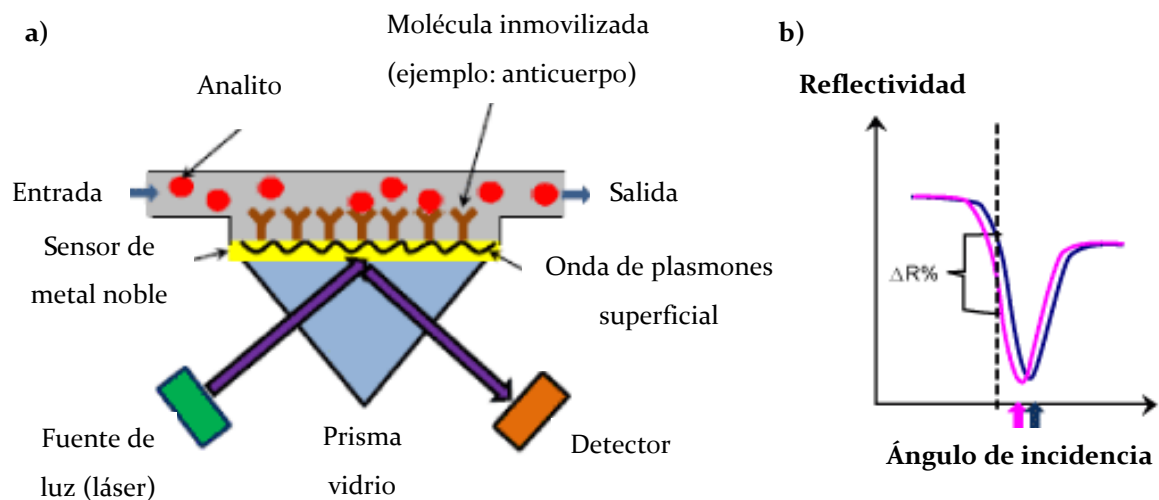


Figura 2.19. (a) Sensor de Resonancia Plasmónica Superficial: Una fina capa de metal noble (oro) es inmobilizada en un prisma de vidrio para crear la superficie del biosensor. Los anticuerpos u otros ligandos son inmobilizados en la superficie del sensor. La capa de metal posee electrones móviles en la superficie, que se ven perturbados por el haz de luz entrante en un cierto ángulo de incidencia, lo cual modifica la onda de plasmones superficiales. (b) Gráfica del cambio del índice de refracción en función del ángulo de resonancia cuando se une la biomolécula (Shpacovitch, 2012).

2.2.6. Transductores piezoeléctricos

Una medida directa de los cambios de masa inducidos por la formación de complejos antígenos-anticuerpos son también detectados por sensores acústicos. El principio de operación se basa en la propagación de ondas acústicas en el sustrato del sensor. La fase y velocidad de la onda acústica son influenciadas por la adsorción específica de moléculas de anticuerpos sobre la superficie sensora recubierta de antígenos. Materiales piezoeléctricos como cuarzo (SiO_2), óxido de zinc (ZnO) u otros materiales resonantes son excitados en un campo eléctrico oscilante a una frecuencia ultrasónica

INTRODUCCION

específica (en el orden de 10 MHz). La frecuencia resonante se determina mediante la distancia entre los electrodos en ambos lados de la placa de cuarzo. La técnica más aplicada para el monitoreo de la operación de onda acústica es el método de oscilación, el cual mide las series de frecuencias resonantes del sensor de resonancia. Los sensores piezoeléctricos se dividen en la microbalanza de cristal de cuarzo (MCC) y los dispositivos de aplicación de una onda acústica de superficie. Las **Figuras 2.20a y b** muestran un esquema típico de una microbalanza de cristal de cuarzo y un ejemplo de respuesta obtenido con este sensor piezoeléctrico, respectivamente. Una fina capa de cuarzo es recubierta con metal en ambas caras. Luego la placa es colocada en un sujetador para una manipulación y conexión simplificada a los sistemas de medida.

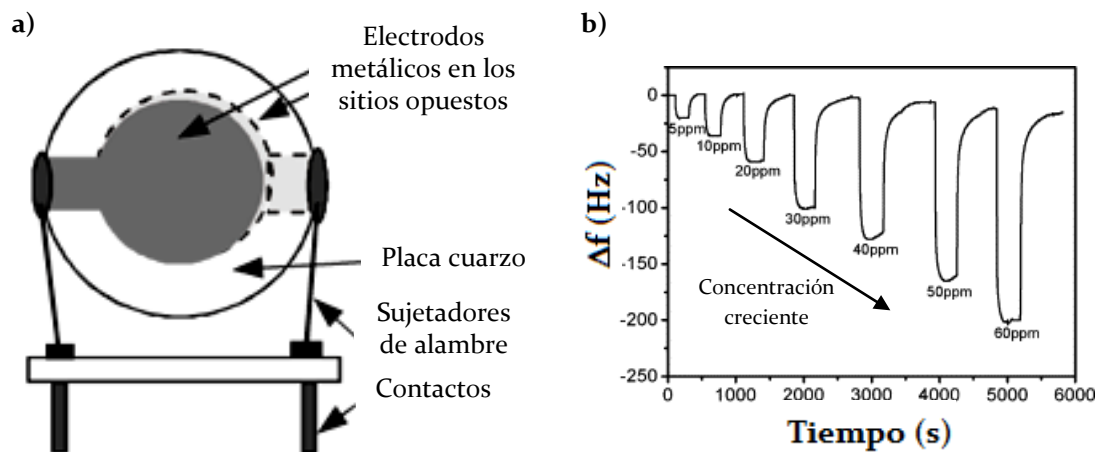


Figura 2.20. (a) Microbalanza de cristal de cuarzo (Skládal, 2003), y (b) cambio de la frecuencia en tiempo real del sensor piezoeléctrico a diferentes concentraciones de dimetil metilfosfonato (Ying y col., 2007).

Los transductores piezoeléctricos relacionan la masa de los films rígidos adsorbidos con los cambios de frecuencia resonante mediante la Ecuación 2.6 de Sauerbrey:

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2 \Delta m}{A_{inn} \sqrt{\rho_q \mu_q}} = - 2,26 \times 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A_{inn}} \quad (2.6)$$

donde f_0 es la frecuencia resonante, m es la masa, A_{inn} es el área de inmovilización, ρ es la densidad y μ_q es el módulo de corte del cuarzo.

Por lo tanto, los cambios de la frecuencia (Δf) del cristal piezoeléctrico es directamente proporcional al cambio de masa (Δm). El sistema funciona como una microbalanza de cristal de cuarzo sensible; siendo mejorada su sensibilidad por los dispositivos alternativos, recientes

INTRODUCCION

denominados "nanobalanza". De esta forma, la cantidad de moléculas unidas al área sensible del electrodo puede ser fácilmente medida cuantitativamente como una disminución de la frecuencia resonante (Skládal, 2003).

2.2.7. Aplicaciones de los inmunosensores

Existen pocas publicaciones disponibles de inmunosensores electroquímicos con detección directa, debido a que muchos analitos (proteínas) no son intrínsecamente capaces de actuar como patrones rédox en la reacción electroquímica. Por lo tanto, rótulos o marcadores activos electroquímicamente (de forma directa o como productos de la reacción enzimática) son necesarios para la reacción electroquímica del analito suceda sobre el electrodo sensor. Los electrodos más populares son el de oxígeno y el de agua oxigenada. La principal desventaja para estos inmunosensores es tener una etapa adicional debido a que su sistema de detección es indirecto, sin embargo este hecho se compensa porque se logra una excelente sensibilidad. Esto se debe a que la respuesta es proporcional a la concentración del analito, en contrapartida de los sistemas potenciométricos, en donde la señal es proporcional al logaritmo de la misma (Luppa y col., 2001).

Los inmunosensores, según el transductor utilizado, presentan ventajas y desventajas, que se resumen en la **Tabla 2.4**.

El desarrollo de la tecnología de los inmunoensayos fue un suceso histórico, sobre todo para los laboratorios clínicos y continúa siendo un área vibrante de investigación. Los desarrollos y la automatización han expandido favorablemente el análisis en las ciencias clínicas. Además de esta, otras áreas donde el análisis de componentes en el orden de trazas es requerido, como ser en el ámbito mediambiental y alimentario han incursionado en el desarrollo de inmunosensores para estos fines. La **Tabla 2.5** muestra algunos ejemplos de desarrollos de inmunosensores, en los últimos cuatro años, aplicados en los ámbitos clínicos, mediambiental y alimentario.

INTRODUCCION

Tabla 2.4. Ventajas y desventajas de los inmunosensores según el tipo de transductor (Ricci y col., 2007)

Transductor	Ventajas	Desventajas
Electroquímico (Técnica: Amperometría/ Voltametría)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Mayor sensibilidad por el uso de rótulo. ❖ Factibilidad de miniaturizar la instrumentación. ❖ Bajo costo de equipos y reactivos. ❖ Fácilmente automatizable y transportable al lugar del problema. ❖ Posibilidad de utilizar transductores monouso impresos (producidos en grandes cantidades y pequeñas dimensiones, pequeños volúmenes de muestra y cortos tiempos de incubación). 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Requiere rótulo, por lo cual el protocolo tiene una etapa adicional con respecto a los ensayos directos. ❖ El uso de electrodos convencionales (como los <i>glassy carbon</i>) requiere tediosas etapas de regeneración.
Óptico (Técnica: RPS)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ensayo directo, simple, sin rótulo. ❖ Más reproducible y confiable que el ensayo ELISA. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Instrumentación relativamente compleja y de alto costo. ❖ No se alcanzan LD tan bajos que los métodos indirectos. ❖ Dificultad con la portabilidad, miniaturización o análisis en el lugar del problema. ❖ No tiene sensibilidad para analitos de bajo peso molecular. ❖ Está expuesto a sufrir interferencias de la matriz.
Piezoeléctrico (Técnica: MCC)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ensayo directo, simple, sin rótulo. ❖ Simple y con instrumental más económico que el de RPS. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ La medida de frecuencia es más sensible al medioambiente. ❖ Menor sensibilidad que otros métodos.

INTRODUCCION

Tabla 2.5. Aplicaciones de los inmunosensores

Ámbito	Aplicación	Transductor	Ref.
Clínico	Antígeno Carcinoembrionario en suero	Electroquímico (EIE)	(Yang y col., 2011)
	Antígeno Específico Prostático en suero	Electroquímico (Voltimetría)	(Wang y col., 2013)
	Anti-virus Hepatitis B y Anti- α -fetoproteína	Piezoeléctrico (MCC)	(Xu y col., 2012)
	Benzoilecgonina (principal metabolito de la cocaína) en saliva	Óptico (RPS)	(Munoz y col., 2011)
	Gonadotropina Coriónica humana	Electroquímico (EIE)	(Truong y col., 2011)
	Troponina T cardíaca en suero	Electroquímico (Amperometría)	(Gomes-Filho y col., 2013)
	Antígeno CFP-10 Tuberculosis en orina	Óptico (RPS)	(Hong y col., 2011)
Mediambiental	<i>Legionella pneumophila</i> en muestras aguas	Óptico (RPS)	(Enrico, D.I., 2013)
	Herbicida isoproturon en suelo	Electroquímico (Amperometría)	(Bakeyfield y col., 2011)
	Atracina	Electroquímico (Voltimetría)	(Tran y col., 2012)
	Herbicina diuron	Electroquímico (Voltimetría)	(Sharma y col., 2011)
	Profenofos en muestras agua	Óptico (RPS)	(Dong y col., 2012)
	TNT en muestras agua	Electroquímico (Transistor Efecto Campo)	(Park y col., 2010)
Cobre en muestras agua	Piezoeléctrico (Microcantilever)	(Zhao y col., 2010)	
Alimentario	Residuos de atracina en leche	Electroquímico (Amperometría)	(Campanella y col., 2011)
	Residuos de carbofuranos en vegetales y frutas	Electroquímico (Voltimetría)	(Sun y col., 2012)
	Ocratoxina A en vinos	Electroquímico (Voltimetría)	(Perrota y col., 2012)
	Cloranfenicol en alimentos	Piezoeléctrico (MCC)	(Karaseva y Ermolaeva, 2012)
	<i>Escherichia coli</i> en alimentos	Electroquímico (Amperometría)	(Li y col., 2012)
	Melamina (adulterante) en Formulación infantil	Óptico (RPS)	(Wu y col., 2013)
	Residuos de Kanamicina en carne de cerdo	Electroquímico (Amperometría)	(Zhao y col., 2011)
Citrinina en arroz	Electroquímico (Amperometría)	(Arévalo y col., 2011)	

 INTRODUCCION

2.3. METODOS BIOANALITICOS

La *química analítica* es la disciplina científica que desarrolla y aplica métodos, instrumentos y estrategias para obtener información sobre la composición y naturaleza de la materia en espacio y tiempo. La *química bioanalítica* es un área fundamental de la química aplicada al análisis de biomoléculas, especialmente en el ámbito de los trabajos en biotecnología, bioingeniería, farmacia y química clínica, así como en el de las investigaciones biológicas y bioquímicas.

Los *métodos bioanalíticos* son clasificados, acorde a la clase de resultados que provee, en *métodos cualitativos*, donde se provee información sobre la presencia o ausencia del analito y, en *métodos cuantitativos* que dan la concentración del analito en la muestra, asociada con una incertidumbre. Los *métodos semicuantitativos* dan una estimación de la concentración y son usados para determinar si el analito está presente a un nivel que está por encima o por debajo de la concentración de referencia; por lo tanto, se puede informar si la concentración de la muestra es mayor, similar o menor que el valor de referencia (Mikkelsen y Cortón, 2004).

El *proceso de medida en la química* abarca un conjunto de operaciones que separa la muestra, sin recoger, sin tratar y sin medir de los resultados obtenidos a partir de ella. Existen dos tipos de propiedades relacionadas al proceso analítico: i) Propiedades Analíticas Básicas (Presición, Sensibilidad, Selectividad y Muestreo apropiado) en las cuales se encuentran las propiedades analíticas supremas (Exactitud y Representatividad) y ii) Propiedades Analíticas Accesorias (Rapidez, Costo-eficacia y Factores relacionados al personal), en las cuales se determina la productividad del laboratorio. El proceso de medida químico (PMQ) se puede dividir en tres etapas generales, como se muestra en la **Figura 2.21**.

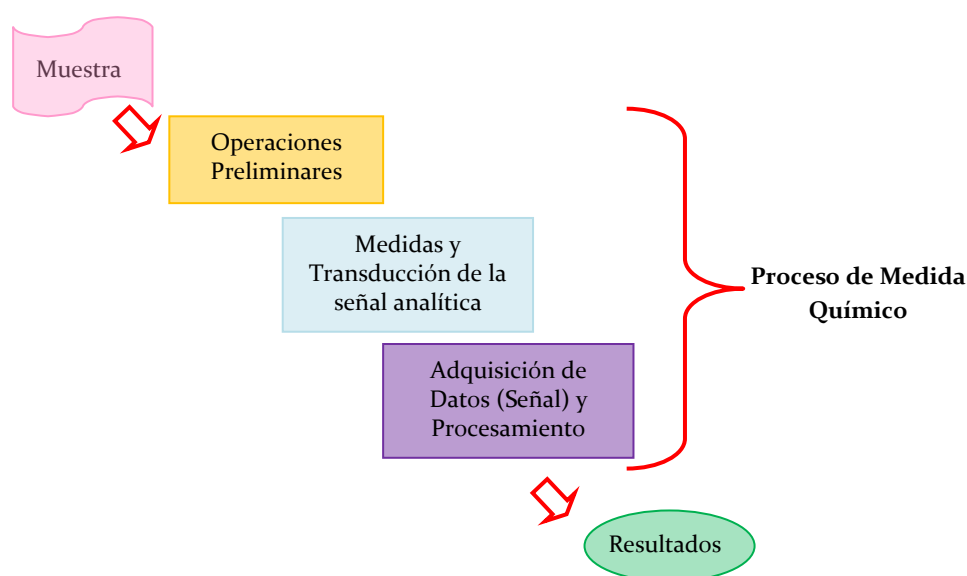


Figura 2.21. Representación esquemática de las tres etapas del PMQ (Varcálcer Cases, 2000).

INTRODUCCION

El principal objetivo de las *Operaciones Preliminares* es preparar la muestra para una adecuada medición. En cuanto a las *Medidas y Transduccion de la señal analítica* está directamente relacionado a la naturaleza y concentración del analito en la muestra e involucra el uso de un instrumento. La *Adquisición de Datos y el Procesamiento* provee el resultado del proceso en el formato requerido (Varcálcer Cases, 2000).

2.3.1. Validación de metodologías

La tendencia moderna de la química analítica se basa en el desarrollo de nuevas técnicas analíticas y métodos que permitan detectar y/o cuantificar los componentes en muestras complicadas, como las relacionadas a problemas medioambientales o a protección alimentaria. La calidad de los resultados, tanto en los métodos cuali como cuantitativos, es de suma importancia (Trullols y col., 2004). Por definición, la *validación* es el proceso de verificar que un método es adecuado para su propósito, es decir, para resolver un problema analítico particular (EURACHEM, 2005). Usualmente, la validación de métodos analíticos ha sido desarrollada y aplicada a métodos cuantitativos. Como consecuencia, hoy en día existen muchas guías de validación que son aceptadas por organismos reguladores o por comunidades de profesionales en áreas específicas (AOAC, 1993; EURACHEM, 1998; IUPAC, 1999; FDA, 2000; FDA, 2001; IUPAC, 2002; ICH, 2005; USP, 2007). Sin embargo, no existe una guía general disponible de validación para métodos analíticos cualitativos (Trullols y col., 2004).

La definición de los parámetros que indican el rendimiento analítico es un aspecto muy importante a considerar cuando se desarrolla una metodología. La **Tabla 2.6** muestra los parámetros de calidad más comunes para métodos cuali y cuantitativo. A pesar de que algunos parámetros tienen el mismo nombre para ambos métodos; su definición y forma de estimarlos puede ser muy diferente.

INTRODUCCION

Tabla 2.6. Parámetros de calidad para métodos cuali y cuantitativo

Método cuantitativo	Método cualitativo (Trullols y col., 2004)
Exactitud Es el grado de concordancia entre un valor promedio obtenido de una medición y un valor de referencia aceptado (ISO, 1993).	^aPFPP Probabilidad de que una muestra verdaderamente negativa sea clasificada como positiva.
Precisión Es la concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas (ISO, 1993).	^bPFN Probabilidad de que una muestra verdaderamente positiva sea clasificada como negativa.
LD Es la menor concentración de analito, que puede ser confiablemente distinguida del blanco (EURACHEM, 2005).	Región infiable Región comprendida entre el mayor y menor valor de concentración donde se da una respuesta falsa.
Incertidumbre Es la estimación unida al resultado que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se encuentra el valor verdadero (ISO, 1993).	Sensibilidad Es la habilidad de un método para detectar como positiva a una muestra verdaderamente positiva.
Sensibilidad Se define como el cambio en la respuesta en función del correspondiente cambio en el estímulo (IUPAC, 1997).	Especificidad Es la habilidad de un método para detectar como negativa a una muestra verdaderamente negativa.
Selectividad Se define como la capacidad de un método para determinar un analito particular en una mezcla compleja sin la interferencia de otros componentes presentes en la mezcla. (IUPAC, 1997).	Selectividad Evalúa la reactividad del analito de interés con algún otro compuesto o la presencia de interferencias.
Linealidad Es la capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra (ICH, 1996).	LD Menor concentración del analito en una matriz que puede ser detectada como positiva en forma confiable.
Robustez Está relacionada a la calidad del método al variar condiciones operacionales, ambientales, etc. Si bien este parámetro es muy importante en la validación de métodos cuantitativos, algunos autores aseguran que no es necesario realizarlo en métodos cualitativos.	Valor de corte Es el nivel de concentración donde se diferencia a las muestras con una cierta probabilidad de error.

^aPFPP = Probabilidad de Falso Positivos; ^bPFN = Probabilidad de Falso Negativos.

INTRODUCCION

2.3.2. Evaluación de los parámetros de calidad

Debido a que existe mucha información referida a la validación en los métodos cuantitativos, a continuación se analizarán los parámetros de calidad cuando el método es cualitativo.

Hay varias formas de evaluar el rendimiento analítico en el análisis cualitativo, dentro de las cuales se encuentran las Tablas de contingencia (Massart y col., 1997), el Teorema de Bayes (McFall y Treat, 1999), la Prueba de Hipótesis Estadística (Pulido y col., 2002) y las Curvas Características de funcionamiento (Song y col., 2001).

Las *Tablas de contingencia* se basan en el cálculo de probabilidad. A pesar de que existen otros formatos, el más simple y comúnmente utilizado está dado por clasificar a las muestras en dos categorías: positivas o negativas. Luego los resultados con el método cualitativo son comparados con los obtenidos mediante un método de referencia, como se muestra en la **Figura 2.22**.

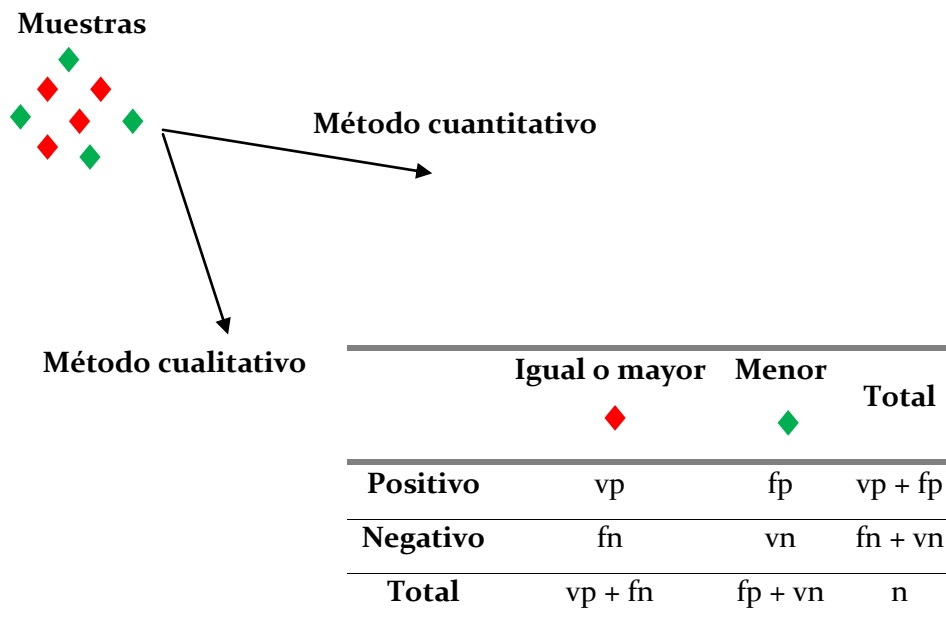


Figura 2.22. Ejemplo de una Tabla de contingencia. vp: muestra verdaderamente positiva; fp: muestra falso positiva; fn: muestra falsa negativa; vn: muestra verdaderamente negativa; n: número total de determinaciones (Trullols y col., 2004).

A partir de la tabla es posible calcular cuatro parámetros: los falsos positivos, los falsos negativos, sensibilidad y especificidad y dos valores predictivos: valor predictivo positivo y negativo. Una característica importante de esta tabla es que brinda una visión global de cómo es el rendimiento analítico de un método, pero no da información individual de la muestra como puede ser una probabilidad de error. Una desventaja es que la capacidad de las Tablas de contingencia depende del número total de muestras analizadas.

INTRODUCCION

El *Teorema de Bayes* calcula la probabilidad de dar un resultado correcto (positivo o negativo) cuando este es correcto. Esta probabilidad se llama probabilidad condicional, y requiere muchos análisis para lograr una buena estimación de incertidumbre o la mejor probabilidad de error. En esta metodología, a diferencia de las Tablas de contingencia, la probabilidad de dar un mal resultado es estimada individualmente, ya que la probabilidad condicional es calculada para cada muestra analizada. En este caso también cuatro parámetros pueden ser calculados: los falsos positivos, los falsos negativos, sensibilidad y especificidad.

La *Prueba de Hipótesis Estadística* compara la respuesta de la muestra con la obtenida previamente a partir de muestras de referencia (**Figura 2.23**).

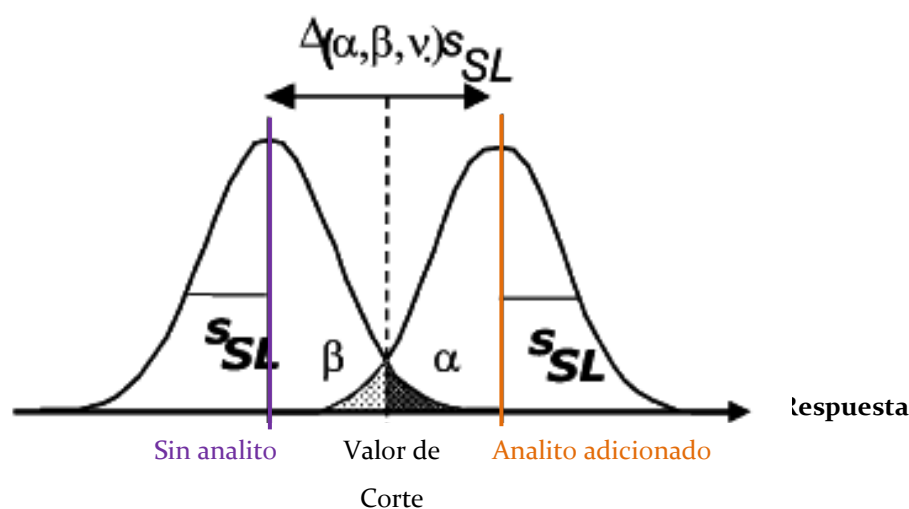


Figura 2.23. Prueba de Hipótesis Estadística para métodos de análisis cualitativo provistos por una respuesta instrumental (Trullols y col., 2004).

Para la realización de la gráfica, se procesan réplicas de muestras con adición del analito a un nivel conocido y réplicas de muestras en ausencia del analito. La principal ventaja de esta Prueba es que se usa una probabilidad bien conocida de un error tipo- α (probabilidad de cometer un falso positivo) y una probabilidad creciente de error tipo- β (probabilidad de cometer un falso negativo). Este método permite calcular fácilmente las incertidumbres de la respuesta instrumental para el análisis cualitativo, y no puede aplicarse si la respuesta no es instrumental.

Las *Curvas Características de funcionamiento* es una gráfica en la cual se relaciona la probabilidad de tener un resultado positivo en función del nivel de concentración del analito. La **Figura 2.24** muestra una curva sigmoideal típica.

INTRODUCCION

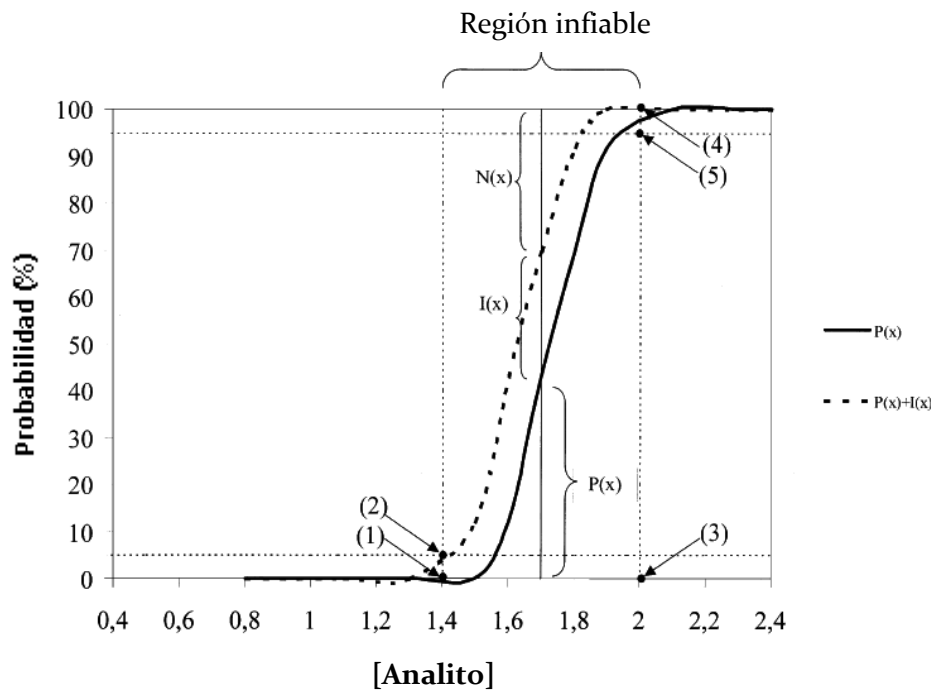


Figura 2.24. Curva de Característica de funcionamiento. Probabilidad de respuestas positivas: $P(x)$, y probabilidad de respuestas inconclusas y positivas: $P(x) + I(x)$, fueron graficadas en función de la concentración del analito. (1) $fp = P(x)$; (2) $X_{0,05}$, donde la especificidad = $N(x) = 100 - (P(x) + I(x))$; (3) $X_{0,95}$, valor de corte, LD; (4) $fn = 100 - (P(x) + I(x))$; (5) Sensibilidad = $P(x) = 100 - \beta$. (Trullols y col., 2004).

La principal ventaja de estas curvas es que se pueden calcular los valores falsos positivos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad y otros parámetros como el LD, valor de corte y región infiable. La desventaja es que se necesitan realizar muchos análisis para cada nivel de concentración (Trullols y col., 2004).

2.3.3. Evaluación de las pruebas diagnósticas

La evaluación de las pruebas diagnósticas se ha tratado, en general, sin un criterio universalmente aceptado. La calidad de una prueba diagnóstica utilizada para el cuidado de los pacientes no se juzga sólo por sus características analíticas sino, fundamentalmente, por su capacidad para distinguir entre estados alternativos de salud. El médico solicita una prueba para decidir, junto con otros datos disponibles, si el paciente tiene o no una condición clínica. La principal cualidad clínica de una prueba diagnóstica es su exactitud, definida como la capacidad para clasificar de manera correcta a los individuos en subgrupos clínicamente relevantes. Además, de conocer su capacidad de discriminar adecuadamente, es necesario conocer también el valor práctico

 INTRODUCCION

de la prueba para el cuidado del paciente. Existen diversas causas que invalidan una prueba diagnóstica para su uso práctico, entre ellas:

- ❖ Pueden existir métodos menos invasivos o más económicos para obtener una información semejante.
- ❖ La prueba puede ser tan cara o poseer tal requerimiento técnico que sea limitada su disponibilidad.
- ❖ Puede ser tan incómoda o invasiva que los pacientes no se sometan con facilidad a ella.
- ❖ El coste o indeseabilidad de los resultados falsos puede ser tan alto que no exista un punto de corte aceptable.

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: la SE y la ES. Sin embargo, éstas varían en función del criterio elegido como punto de corte entre la población sana y la enferma. Una forma más global de conocer la calidad de la prueba en el espectro completo de puntos de corte es mediante el uso de las curvas ROC (Características Operativas del Receptor, por sus siglas en inglés) que, constituyen una herramienta fundamental y unificadora en el proceso de evaluación y uso de las pruebas diagnósticas.

Siempre que una cuestión clínica y el resultado de la prueba diagnóstica encaminada a resolverla puedan plantearse en términos de dicotomía (presencia o ausencia de enfermedad; positivo o negativo), la exactitud de la prueba puede definirse en función de su SE y ES diagnóstica. Sin embargo, con mucha frecuencia los resultados de las pruebas diagnósticas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un punto o valor de corte adecuado que permita resumir estos resultados en dos categorías: positivo y negativo. No existe ninguna manera teórica de medir la SE y ES de una prueba. El único procedimiento es el experimental, sometiendo a un grupo de pacientes, no enfermos (para la enfermedad que se está analizando) y enfermos, clasificados mediante un método diagnóstico de referencia exacto e independiente, a la prueba que queremos estudiar. Al comparar los resultados del ensayo a evaluar y el diagnóstico de referencia, existen cuatro posibilidades (vp, vn, fp y fn) que pueden resumirse en una Tabla de contingencia de 2 x 2 (ver **Figura 2.22**).

La *sensibilidad* definida en la Ecuación 2.7 corresponde a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad:

$$SE = \frac{\text{enfermos positivos}}{\text{total enfermos}} = \frac{vp}{vp + fn} \quad (2.7)$$

La *especificidad* se calcula como la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad y se esquematiza en la Ecuación 2.8:

INTRODUCCION

$$ES = \frac{\text{sanos negativos}}{\text{total sanos}} = \frac{vn}{vn + fp} \quad (2.8)$$

La prueba diagnóstica ideal debería tener una SE y una ES tan próximas al 100% como fuera posible. En la práctica se debe dudar de pruebas cuyas SE y ES sean inferiores al 80%.

A partir de la Tabla de contingencia también se puede definir el *valor predictivo del resultado positivo* (VP_{pos}) como la proporción de resultados válidos entre los resultados positivos de la prueba; el *valor predictivo del resultado negativo* (VP_{neg}) como la proporción de resultados válidos entre los negativos y el *valor predictivo global* (VG) como la proporción de resultados válidos entre la totalidad de pruebas efectuadas. Las Ecuaciones 2.9, 2.10 y 2.11 esquematizan el cálculo de cada uno de estos parámetros:

$$VP_{pos} = \frac{vp}{vp + fp} \quad (2.9)$$

$$VP_{neg} = \frac{vn}{vn + fn} \quad (2.10)$$

$$VG = \frac{vp + vn}{vp + fp + vn + fn} \quad (2.11)$$

Los valores predictivos de una prueba, a diferencia de la SE y la ES, varían en función de la prevalencia de la enfermedad. Si se estudia una enfermedad cuya prevalencia es baja, incluso una prueba muy específica dará lugar a muchos falsos positivos, dado el elevado número de individuos no enfermos de la colectividad. Si la prevalencia es alta se puede esperar un mayor número de resultados falsamente negativos. Por lo tanto, cuanto menor sea la prevalencia de la enfermedad menor será el VP_{pos} y mayor el VP_{neg} ; lo contrario será cierto si la prevalencia es elevada.

La evaluación clínica de una prueba debe incluir los siguientes pasos:

- ❖ Planteamiento explícito de la hipótesis nula antes de la recolección de los datos. Esta hipótesis debe establecer: (i) la cuestión clínica precisa que se pretende resolver con la prueba; (ii) la naturaleza de la población estudiada, y (iii) el método utilizado para determinar la verdadera respuesta a la cuestión clínica, es decir, el diagnóstico verdadero.

- ❖ Elección de sujetos representativos de la población clínica a la que se aplicará la prueba. Debe evaluarse en un grupo de individuos con sospecha clínica de la enfermedad que se quiera detectar.

INTRODUCCION

Este grupo incluirá a dos subgrupos que no necesitan estar en la misma proporción: aquellos pacientes afectados por dicha enfermedad y los no afectados. La muestra de enfermos utilizada para calcular la sensibilidad debe ser representativa del conjunto de enfermos a los que se aplicará la prueba en condiciones normales y rutinarias, es decir, en un intervalo amplio de variación en cuanto a la gravedad del proceso, la extensión del mismo, su duración y su asociación con otros trastornos o enfermedades. De manera análoga, en el grupo control deben incluirse sujetos de edades, procedencias y situaciones semejantes a las de aquellos a quienes va dirigida la prueba. Es importante analizarla en individuos que, sin padecer la enfermedad en estudio, posean los cuadros más usuales en el diagnóstico diferencial de dicha enfermedad, trastornos de la misma localización anatómica o de la misma naturaleza fisiológica.

- ❖ Establecimiento del diagnóstico verdadero mediante métodos rigurosos, exactos e independientes de la prueba que se va a estudiar.

- ❖ Realización de la prueba a evaluar evitando sesgos. Existen pruebas en las que la subjetividad puede afectar al resultado, por lo que el conocimiento del diagnóstico verdadero puede influir mejorando injustificadamente la estimación de la SE y la ES.

- ❖ Cálculo de la SE y la ES. Evaluación y comparación de pruebas diagnósticas a todos los niveles de decisión usando las curvas ROC. Como se ha comentado, en aquellas pruebas que ofrecen resultados en un intervalo continuo es necesario establecer un valor de corte que divida los resultados en dos grupos (positivo y negativo) para poder calcular su SE y su ES frente a un método de referencia. Para cualquier prueba en la que la distribución de los resultados de los grupos no enfermos y enfermos se solapen, existe un equilibrio entre SE y ES. Ambas varían en direcciones opuestas: si al modificar el valor de corte aumenta la SE, la ES disminuye, y viceversa. Por tanto, las pruebas diagnósticas no tienen un sólo par SE/ES, sino muchos, uno por cada nivel de valor de corte que se adopte. La curva ROC proporciona una visión del espectro completo de pares SE/ES para todos los valores de corte de un número alto de muestras ($n = 30$), por lo que es una herramienta fundamental en la evaluación y comparación de pruebas diagnósticas (Burgueño y col., 1995; Greiner y col., 1995; Faustini y col., 2007).

2.3.3.1. Las curvas ROC

La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares SE/ES resultantes de la variación continua de los valores de corte en todo el intervalo de resultados observados. En el eje y de coordenadas se sitúa la sensibilidad o fracción de verdaderos positivos calculada en el grupo de enfermos y en el eje x se sitúa la fracción de falsos positivos o 1-especificidad calculada en el subgrupo no afectado (**Figura 2.25**).

INTRODUCCION

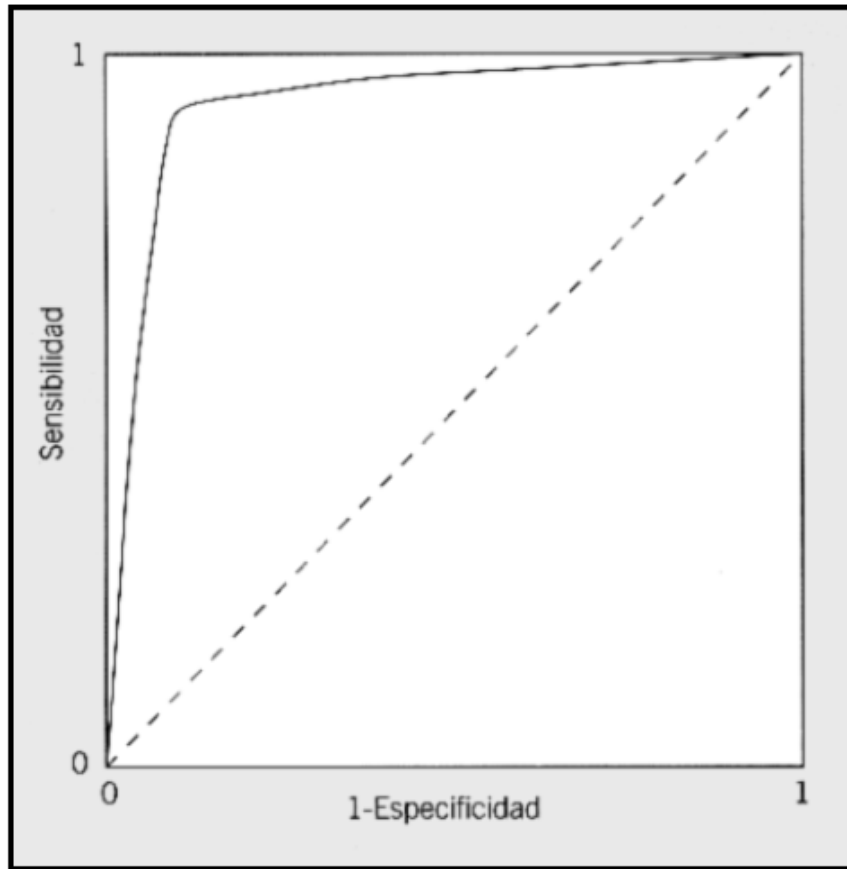


Figura 2.25. Curva ROC.

Cada punto de la curva representa un par SE/1-ES correspondiente a un valor de corte determinado. Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde SE y ES toman valores máximos (línea continua en la **Figura 2.25**). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, da lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha (línea punteada en la **Figura 2.25**). La mayoría de las curvas ROC caen entre estos dos extremos. Cualitativamente, cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba (Burgueño y col., 1995). La **Tabla 2.7** resume las ventajas y desventajas de las curvas ROC (Zweig y Campbell, 1993).

INTRODUCCION

Tabla 2.7. Ventajas y Desventajas de las curvas ROC

Ventajas	Desventajas
Representan la capacidad de discriminación de la prueba en todo el intervalo de puntos de corte.	Los valores de corte son usados para generar el gráfico pero no aparecen en él.
Son gráficas simples y fáciles de interpretar visualmente.	El número de sujetos de la muestra no aparece en el gráfico.
No requieren un valor de corte particular porque está incluido todo el espectro de valores.	Al disminuir el tamaño de la muestra, la curva ROC tiende a hacerse más escalonada y desigual.
Son independientes de la prevalencia, ya que la SE y la ES se obtienen en distintos subgrupos.	La generación de las curvas y el cálculo de sus parámetros son difíciles de realizar de manera manual.
Proporcionan una comparación visual directa entre pruebas en una escala común.	Los programas informáticos existentes no están ampliamente distribuidos.
La ES y la SE son accesibles en el gráfico.	

Las curvas ROC no sólo aportan información cualitativa, sino que también permiten los análisis estadísticos para la evaluación cuantitativa de las pruebas diagnósticas a través de diferentes índices de validez. Algunos de ellos como SE, ES, falsos positivos y negativos se han definido anteriormente; otros se definirán a continuación:

❖ *Área bajo la curva ROC (ABC)*: es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos no enfermos y enfermos. Por convenio, el ABC es siempre mayor o igual que 0,5; tomando valores entre 0,5, si no existen diferencias en la distribución de resultados de la prueba entre los subgrupos enfermos y no enfermos, y 1,0, cuando existe separación perfecta entre las dos distribuciones.

❖ *Razón de verosimilitud de un ensayo positivo (+LR)*: es la relación entre la probabilidad de una prueba positiva en sujetos que tienen el resultado clínico confirmado para la enfermedad y la probabilidad de una prueba positiva en sujetos que no tienen el resultado clínico confirmado.

❖ *Razón de verosimilitud de un ensayo negativo (-LR)*: es la relación entre la probabilidad de una prueba negativa en sujetos que tienen el resultado clínico confirmado para la enfermedad y la probabilidad de una prueba negativa en sujetos que no tienen el resultado clínico confirmado.

Algebraicamente, los LR son calculados como $+LR = SE/(1 - ES)$ y $-LR = (1 - SE)/ES$; indicando buenas características de discriminación entre grupos cuanto mayor sea +LR y menor -LR (Chien y Khan, 2001).

INTRODUCCION

❖ *Índice Youden (J)*: como función de SE y ES, es la distancia vertical máxima (más cercano a la esquina superior izquierda) con la línea indiferente diagonal (Chien y Khan, 2001). Este índice oscila entre 0 y 1, con valores de 1 que indican una eficiencia del biomarcador grande y valores cercanos a 0 que expresan una eficiencia limitada.

2.4. LA ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celíaca, una de las condiciones clínicas más prevalentes (Farrel y Nelly, 2002; Sabatino y Corazza, 2009), es una enteropatía autoinmune inducida en individuos genéticamente susceptibles mediante la ingestión de gluten (Arranz y Garrote, 2010; Crespo Pérez y col., 2012; Sakly y col., 2012). Si la enfermedad persiste sin tratamiento incrementa el riesgo hacia problemas graves de salud, como osteomalacia (reblandecimiento de huesos por pérdida de sales calcáreas), úlceras digestivas y procesos malignos como neoplasia gastrointestinal (Dieterich y col., 1997; Mora y col., 2010).

A pesar de que esta enfermedad fue considerada rara en muchos países europeos, la disponibilidad de ensayos serológicos sensibles no invasivos han permitido detectar la enfermedad celíaca en la población en general. Diversos estudios epidemiológicos han estimado una prevalencia mundial de un caso cada 130-400 individuos (Green y Jabri, 2003; Mulder y Cellier, 2005; Green y Cellier, 2007; Schuppan y col., 2009), siendo los países asiáticos los que presentan la prevalencia más baja. En Argentina, se han publicado dos trabajos de prevalencia: uno en población adulta (Gomez y col., 2001) y otro en población pediátrica (Mora y col., 2010) con resultados de 0,6 y 1,26%, respectivamente. Además, la prevalencia fue el doble (1:124) en mujeres que en hombres (1:251) (Mandal y Mayberry, 2000; Gomez y col., 2001).

La enfermedad celíaca puede comenzar en los primeros años de vida y permanecer sin diagnosticar hasta la edad adulta (en Estados Unidos de América el retraso es de 11 años) o recién manifestarse en la edad adulta (Fernandez-Bañares y col., 2005). Es altamente infradiagnosticada, ya que por cada paciente diagnosticado hay 5-10 pacientes que no lo son (Riestra y col., 2000; Fasano y col., 2003; Mäki y col., 2003).

2.4.1. Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca

Se ha avanzado mucho en el conocimiento de la enfermedad con la identificación de los heterodímeros del HLA clase II (antígeno leucocitario humano, por sus siglas en inglés) DQ2 y DQ8, su papel en la presentación del gluten a los linfocitos T CD4⁺ específicos y de la acción directa de ciertos fragmentos de gliadina sobre el epitelio. La inflamación de la mucosa y el desarrollo de la

INTRODUCCION

lesión intestinal son secundarios a la activación secuencial y, la superposición de las respuestas innata y adaptativa que conducen a la alteración de la producción puntual de citoquinas por los linfocitos T locales.

El modelo patogénico más aceptado integra multi-factores (factores genéticos, inmunológicos y medioambientales). El gluten es una mezcla compleja de polipéptidos presentes en los cereales, tales como trigo, cebada, centeno y avena. Consiste en dos fracciones: una fracción soluble llamada gliadina, hordeina, secalina o avenina dependiendo del cereal de origen (trigo, cebada, centeno y avena, respectivamente) y una fracción insoluble llamada glutenina. Dado el alto contenido en residuos prolina y glutamina de las proteínas del gluten, ellos son altamente resistentes a la digestión por las enzimas gastrointestinales, ya que carecen de los principales puntos de escisión de tales proteasas. Cuando estos péptidos procesados incompletamente alcanzan la lámina propia, ellos son un sustrato adecuado para la enzima transglutaminasa (TG2), la cual los deamina y transforma a los residuos glutamina en ácido glutámico, produciendo péptidos cargados negativamente, que son presentados por las moléculas HLA clase II DQ2 y DQ8. Uno de estos péptidos, conocido como 33-mer, tiene una secuencia altamente inmunogénica que es reconocida por los linfocitos T de la mucosa intestinal, aunque no es el único, ya que se conocen más de 200 péptidos inmunogénicos de gluten. Ellos desencadenan la activación de los linfocitos T CD4 helper en la lámina propia, conduciendo a la inflamación intestinal y, posteriormente, a la hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades intestinales. Una cuestión sin definir aún es como los péptidos de gluten llegan a la lámina propia del intestino. Hay alguna evidencia de que esto ocurriría mediante transcitosis epitelial y por una ruta para-celular a través del desensamble de uniones epiteliales estrechas. Después de la presentación de los antígenos de los péptidos inmunogénicos a los linfocitos T CD4⁺ en la lámina propia, los linfocitos T producen citoquinas principalmente mediada por la secreción de INF- γ (interferón-gamma) y de que otras citoquinas como las interleuquinas (IL) 15, 21, 23 y 17. El resultado final es el daño intestinal, con atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas, con una reducida superficie absorptiva intestinal (**Figura 2.26**) (Crepo Pérez y col., 2012).

INTRODUCCION

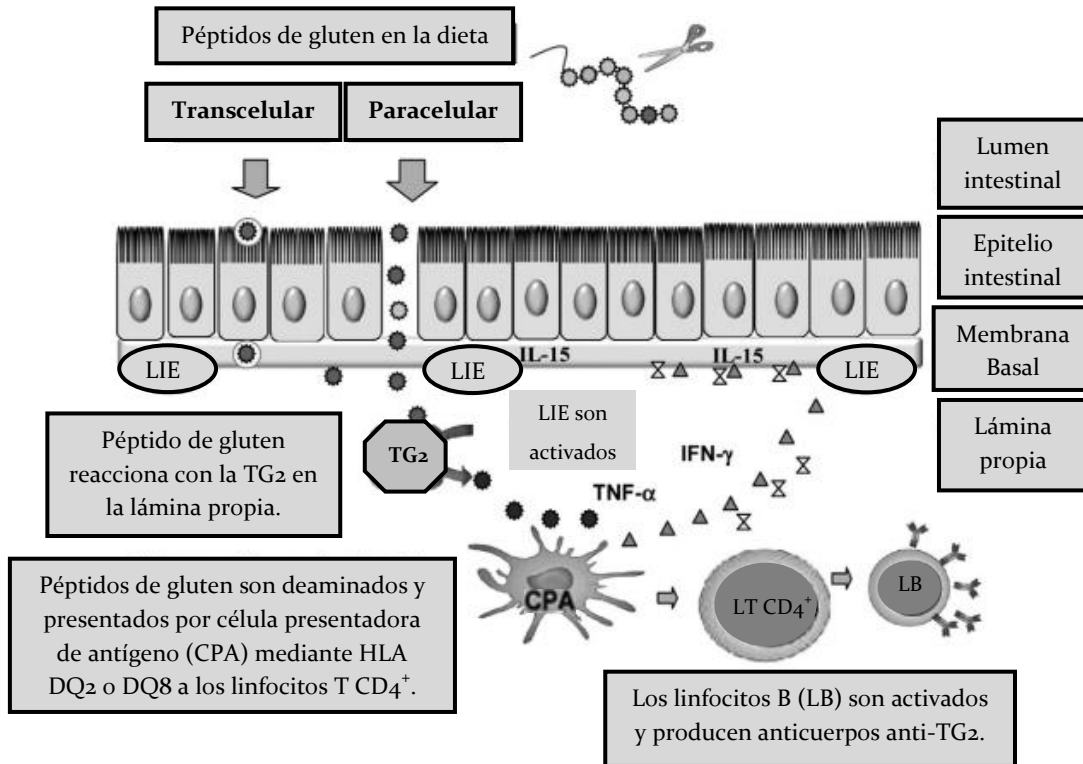


Figura 2.26. Patogénesis de la enfermedad celíaca. Los péptidos del gluten en la dieta son altamente resistentes a hidrólisis por las proteasas intestinales. Se cree que ellos atraviesan el epitelio intestinal mediante rutas trans-celular (mediada por receptores) y para-celular (a través de uniones estrechas abiertas). Una vez en la lámina propia, ellos son deaminados por la TG2, produciendo epitopes altamente inmunogénicos. Estos epitopes son presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) mediante HLA DQ2 o DQ8 a los linfocitos T CD4⁺. La activación de estos linfocitos permite la producción de citoquinas inflamatorias y aumenta los linfocitos intraepiteliales (LIE), permitiendo eventualmente la remodelación de la mucosa con hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades. Además, la activación de los linfocitos B y la pérdida de tolerancia posibilita la producción de anticuerpos anti-TG2 (Crespo Pérez y col., 2012).

El hecho de que sólo unos pocos individuos portadores del HLA de riesgo desarrollan la enfermedad, posiblemente se deba a que, además de los factores genéticos, existen otros factores, como los ambientales (ejemplo, la composición de la flora intestinal) que influyan en la capacidad individual de inducción y control de la respuesta innata, y en la susceptibilidad del individuo.

2.4.2. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca

De acuerdo a los criterios de la ESPGHAN (Sociedad Europea para Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición, por sus siglas en inglés), el diagnóstico de la enfermedad celíaca se basa en los hallazgos anatomopatológicos en la biopsia intestinal cuando el paciente toma una dieta que

INTRODUCCION

contiene gluten, y la normalización clínica e histológica tras una dieta de exclusión. En relación con la ingestión de gluten, se ha observado todo un espectro de cambios histopatológicos e inmunológicos en el intestino; cuyas lesiones histológicas duodenales, en muchos casos, muestran daños en las vellosidades e infiltrados inflamatorios que no son específicos de la enfermedad celíaca y pueden ser detectados en otras patologías (Brown y col., 2006; Salvatore y col., 2008). Además, los individuos con enteropatía mínima y síntomas asociados al gluten, o con alteraciones inmunológicas similares a los pacientes celíacos pero sin sintomatología clínica definida, suponen un reto para el diagnóstico de la enfermedad. Por esta razón, en los últimos años hubo un gran interés en la identificación de pruebas serológicas que permitan la detección de individuos con expresión mínima o atípica de la enfermedad.

Históricamente, la detección de la enfermedad celíaca se basaba en un ensayo de malabsorción (D-xilosa) o en ensayos serológicos para anticuerpos anti-gliadina (AGA) y anticuerpos anti-endomisio (EMA). Luego se incorporaron la detección de los ATG₂ y, más recientemente, de los APDG (Armstrong y col., 2011).

Los AGA no son específicos de la enfermedad celíaca, se detectan también en otras enfermedades, tales como alergias a los alimentos y, menos frecuentemente, en individuos asintomáticos (Barbato y col., 2011). No es clara su relación con la enfermedad celíaca y pueden reflejar un aumento de la permeabilidad intestinal, como también indicar la producción de anticuerpos contra otras proteínas de la dieta. Los AGA séricos se elevan en la enfermedad celíaca en paralelo con la ingestión de gluten, pero mientras los niveles de AGA-IgA disminuyen rápidamente tras retirar el gluten, los de isotipo IgG tienen una cinética más lenta y, en algunos casos, no llegan a desaparecer nunca. La edad influye en los niveles de AGA, siendo más elevados en los pacientes menores de 2 años, en especial los de isotipo IgA, y su valor diagnóstico disminuye en los niños mayores y adultos. Tanto para el valor aislado de AGA-IgA como de forma conjunta con los AGA-IgG, los valores de SE y ES, son muy variables, encontrándose comprendidos entre el 50 y el 100%, dependiendo de la marca de los ensayos ELISA comerciales.

Los EMA del isotipo IgA se evalúan en los enfermos celíacos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre cortes de esófago de mono o cordón umbilical humano, con cifras de SE y ES superiores al 95%. Dieterich y col., 1997 identificaron la TG₂ como el mayor antígeno reconocido por EMA en pacientes con enfermedad celíaca (Mankai y col., 2005). Los inconvenientes que presentan estos anticuerpos se deben tanto a las limitaciones de trabajar con tejidos de mono como a los problemas técnicos ocasionados por la subjetividad de la interpretación de los resultados del analista. Por lo tanto, el método IFI para EMA es preferentemente usado como ensayo de confirmación y no ensayo de rutina (Tunutti y col., 2003; Vermeersch y col., 2011).

INTRODUCCION

Estos problemas pudieron ser resueltos con la detección de los ATG2. Debido a que los ATG2 reconocen el mismo antígeno que los EMA, estos se pueden diferenciar por el método de detección utilizados en cada caso, siendo IFI para los EMA y ELISA óptico para ATG2 con SE cercanas al 100% y especificidades entre el 89 y el 96% (Castillo-Ortiz y col., 2011; Kumar y col., 2011). Diversos estudios demostraron buena correlación entre los ATG2-IgA y los EMA-IgA (Donaldson y col., 2007; Vetrano y col., 2007). Sin embargo, se han descrito resultados falsos negativos a ATG2-IgA con EMA-IgA positivos a la enfermedad celíaca y resultados falsos positivos a ATG2-IgA con EMA-IgA negativos (Wong y col., 2002). Cabe resaltar que, en muchos de estos estudios, se utilizó como antígeno a la TG2 proveniente del hígado de cobayo, el cual tiene sólo una homología del 81% con la TG2 recombinante humana (Sugai y col., 2000). Además, en múltiples trabajos, el uso de TG2 recombinante humana se ha asociado con menores resultados falsos positivos y negativos y un rendimiento analítico global de similares características que el ensayo EMA-IgA mediante IFI (Bonamico y col., 2001; Leon y col., 2001; Fasano y Catassi, 2001). Wong y col. (2002) compararon 13 ELISA comerciales de los cuales 7 tenían como antígeno de captura a TG2 de hígado de cobayo y 6 a TG2 recombinante humano. Ellos informaron que, en general, los ensayos basados en TG2 recombinante humana demostraron un rendimiento analítico superior (especialmente especificidad) que los ensayos basados en TG2 de hígado de cobayo. Además, atribuyeron el hecho de que algunos ELISA basados en TG2 de hígado de cobayo presentaran mayor rendimiento analítico, a factores tales como el origen del antígeno. Debido a que los ATG2 han mostrado una fuerte correlación con la fase aguda de la enfermedad, se los consideran marcadores sensibles, específicos y muy útiles para tanto su diagnóstico como su seguimiento (Alaedini y Green, 2008). En general los EMA-IgA parecen ser los más específicos y los ATG2-IgA los más sensibles. Para el control de la dieta, los ATG2-IgA son los más adecuados, aunque se han perfilado otras alternativas como los anticuerpos combinados ATG2-IgA/IgG o los APDG (Arranz y Garrote, 2010).

En 2001, se comenzó a estudiar la relación entre la enfermedad celíaca y los APDG del isotipo IgG e IgA, ya que en la enfermedad celíaca, los péptidos de gliadina ingeridos en la dieta son selectivamente deaminados en el intestino por la enzima TG2 (Aleanzi et. al., 2001; Gianfrani et. al., 2005). Esta deaminación selectiva puede ser el evento que inicia la respuesta inmune al gluten en individuos predispuestos genéticamente (Sakly y col., 2012). Los métodos que se han desarrollado para detectar estos anticuerpos se basan en ensayos ELISA con detección óptica (Volta y col., 2008; Barbato y col., 2011; Sakly y col., 2012) y un ensayo inmunofluorimétrico (Ankelo y col., 2007). Estudios recientes han demostrado que el rendimiento analítico de los APDG-IgG es comparable a ATG2-IgA y tan bueno como los APDG-IgA (Vermeersch y col., 2011) o, hasta en algunos casos, mejores que estos últimos (Barbato y col., 2011). Además los APDG-IgG son más sensibles y específicos que los AGA-IgG (Vermeersch y col., 2010). Es importante destacar que entre un 2-5% de

INTRODUCCION

enfermos celíacos presenta deficiencia de IgA (Cataldo y col., 1997), por lo cual los tradicionales ATG₂ y EMA darían falsos negativos. Además, como se comentó anteriormente, en los niños menores de 2 años los AGA y los APDG se encuentran más elevados que los ATG₂.

2.4.3. Inmunosensores en el diagnóstico de la enfermedad celíaca

El primer inmunosensor para detectar anticuerpos específicos en la enfermedad celíaca fue desarrollado por Balkenhohl y Lisdat, 2007. Estos autores desarrollaron un inmunosensor impedimétrico para detectar ATG₂ IgA e IgG usando SPE modificados con una capa de poli (ácido 4-estirensulfónico de sodio) (Balkenhohl y Lisdat, 2007a). Los mismos autores también desarrollaron un inmunosensor similar para la determinación de AGA IgA e IgG, usando ácido 3-mercaptopropiónico para modificar la superficie de SPE de oro (Balkenhohl y Lisdat, 2007b). La cuantificación de estos autoanticuerpos en sueros positivos y negativos fueron determinadas mediante un análisis cualitativo, a través de Espectroscopía de Impedancia. Con este desarrollo se logró una sensibilidad aceptable, aunque con muy baja precisión cuando se compararon los resultados con los obtenidos mediante un ensayo ELISA.

Posteriormente, se diseñó un inmunosensor amperométrico basado en la adsorción física de la TG₂ en electrodos GEC (composite grafito-epoxi, por sus siglas en inglés). Se analizaron 10 muestras de suero positivos y 10 negativos, obteniendo una SE del 70% y una ES del 100%, comparadas con un ELISA comercial. En este método basado en un sistema cualitativo de respuesta binaria si/no, no fue correlacionada la señal analítica con la concentración de ATG₂-IgA (Pividori y col., 2009).

Luego se desarrolló un inmunosensor microfluídico acoplado con detección electroquímica para la cuantificación de AGA-IgG. La metodología requirió un tiempo de respuesta de 29 minutos y utilizó un electrodo de oro con canal central de vidrio poroso modificado con 4-aminopropilo, en el cual la gliadina fue inmovilizada. La cuantificación de ésta se realizó mediante un ELISA no competitivo, en el cual la gliadina interaccionó con los AGA-IgG y, luego, este complejo fue revelado mediante un anticuerpo anti-IgG rotulado con fosfatasa alcalina. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparables a los de un ensayo ELISA comercial. Si bien los autores argumentan que la deficiencia de IgA es muy frecuente en los enfermos celíacos y por ello determinan AGA-IgG, se considera que los AGA-IgA son más específicos de la enfermedad y también deberían haber sido evaluados (Pereira y col., 2010).

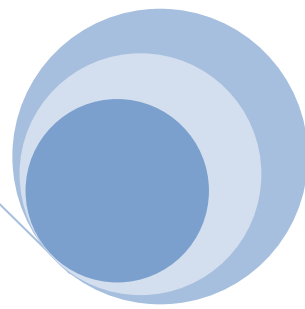
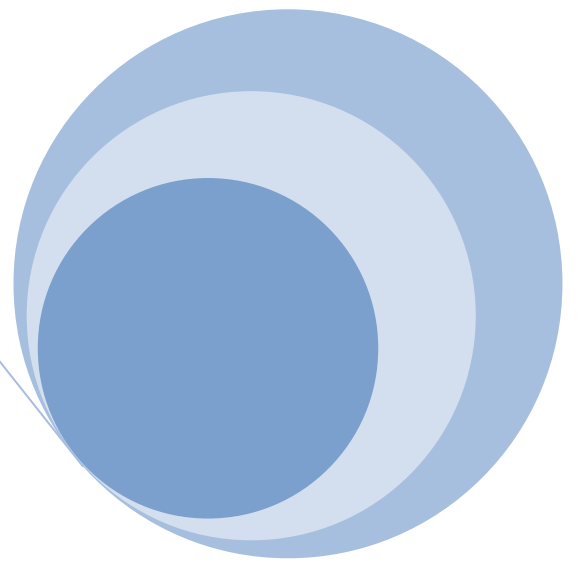
Por otro lado, una plataforma supramolecular electroquímica basada en electrodos de superficie de oro modificado con ciclodextrina fue utilizada para detectar AGA en muestras de sueros. En este trabajo, una detección amperométrica de AGA IgA e IgG en muestras de pacientes celíacos en tres

INTRODUCCION

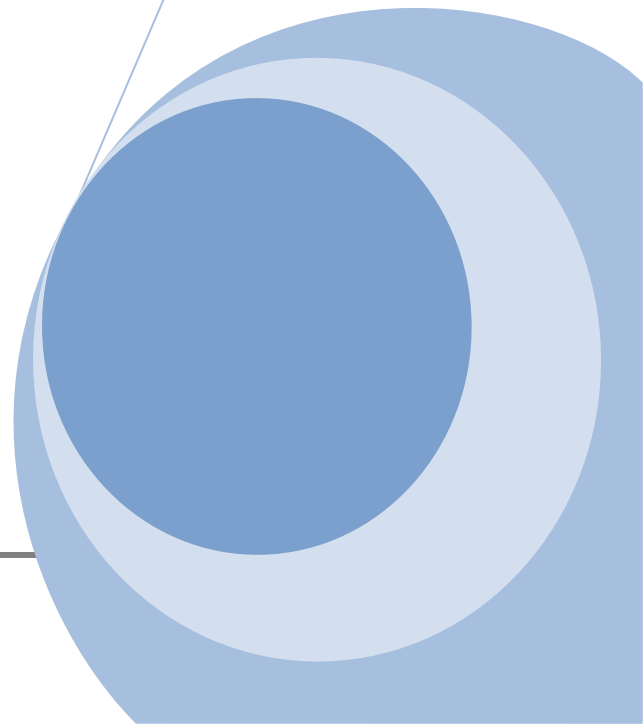
estados de la enfermedad fueron logrados, con resultados que muestran una buena correlación con los obtenidos mediante un ensayo ELISA (Ortiz y col., 2011).

Otros dos inmunosensores electroquímicos que proveen una estimación cualitativa y semicualitativa del contenido de ATG2 IgA e IgG (Dulay y col., 2011) y AGA IgA e IgG (Rosales-Rivera y col., 2011) en muestras de sueros fueron desarrollados. En ambos sensores, el antígeno (es decir, TG2 o gliadina) fue covalentemente unido a las monocapas autoensambladas de un grupo alcanotiol bipodal con terminación carboxílica, el cual se encontraba inmovilizado sobre electrodos de oro. El rendimiento analítico de los inmunosensores tuvo una buena correlación con los obtenidos mediante un ensayo ELISA comercial. En muchos casos, los electrodos de superficie renovable y las celdas electroquímicas convencionales tienen serias desventajas, como efectos de memoria y procesos de limpieza tediosos.

Para la descentralización del diagnóstico, la investigación tiende a dispositivos simples, miniaturizados y portátiles, por lo que otro grupo de investigación desarrolló tres inmunosensores electroquímicos monouso, en los cuales la señal analítica fue obtenida mediante voltametría cíclica. Dos de ellos detectaban en muestras de suero ATG2 IgA e IgG (Neves y col., 2012b) y AGA IgA e IgG (Neves y col., 2012c) y el otro los dos anticuerpos simultáneamente (Neves y col., 2012a). Los tres inmunosensores fueron desarrollados en SPE modificados con un sistema híbrido de nanotubos de carbono/nanopartículas de oro como superficie transductora para mejorar su robustez y eficiencia. En el caso del inmunosensor para detección de AGA y ATG2 simultáneamente se utilizaron SPE duales, constituidos por dos electrodos de trabajo de carbono, más un electrodo de pseudo-referencia de plata y un auxiliar de carbono. En cuanto a los resultados, el inmunosensor electroquímico para detectar ATG2 presentó buena correlación cualitativa con el ELISA; mientras que el inmunosensor para AGA mostró valores más altos que los obtenidos mediante el ensayo ELISA comercial. Sin embargo, ellos argumentan que su objetivo fue la puesta a punto de la metodología para su posterior implementación en el inmunosensor electroquímico, capaz de detectar simultáneamente AGA y ATG2. Los resultados para el inmunosensor electroquímico dual revelaron una buena concordancia con los resultados de los ensayos ELISA comerciales para cada isotipo de los anticuerpos.



3. OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVOS

En esta tesis se desarrollaron metodologías basadas en ensayos de bioafinidad acoplados a la detección electroquímica y fluorescente con la finalidad de detectar diferentes analitos a partir de complejas matrices, como son los alimentos y los fluidos biológicos. Para mejorar la preconcentración y recuperación de los analitos se utilizaron partículas magnéticas funcionalizadas, que también actuaron como soporte de la reacción de bioafinidad. La captura de las partículas magnéticas modificadas se realizó con un simple magneto y para la revelación del ensayo se empleó un sistema enzimático optimizado.

Los objetivos generales de la tesis involucraron el desarrollo de metodologías analíticas, especialmente electroanalíticas, basadas en magnetos sensores de afinidad para la determinación de moléculas biológicas, específicamente anticuerpos, con la finalidad de ofrecer metodologías innovadoras y acordes con las tendencias que persigue la Química Analítica.

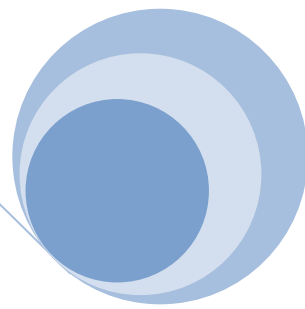
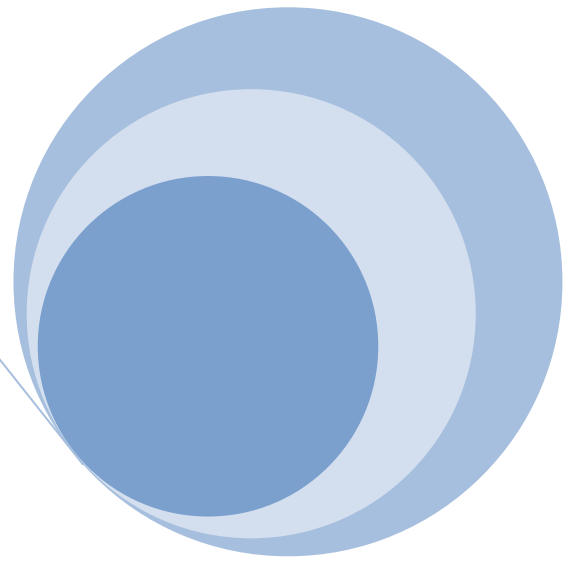
En cuanto a los objetivos específicos, estos se resumen en los siguientes puntos:

- ❖ Construcción y estandarización de los electrodos de trabajo utilizados como transductores electroquímicos en los ensayos de bioafinidad.
- ❖ Optimización de los sistemas de revelación, basados en la reacción enzimática de HRP frente a H_2O_2 como sustrato y diferentes cosustratos. Selección del sistema con mayor rendimiento analítico al ser evaluados mediante detección fluorescente y electroquímica.
- ❖ Estimación de la capacidad de funcionamiento de las partículas magnéticas en su doble rol, como elemento de preconcentración y aislamiento de analitos biológicos a partir de matrices complejas y como soporte de la reacción de afinidad, utilizando como modelo de determinación a la vitamina biotina a partir de una matriz alimentaria.
- ❖ Determinación de los anticuerpos ATG2 (isotipo IgA) en muestras provenientes de pacientes celíacos y no celíacos, clínicamente diagnosticados.
- ❖ Determinación de los anticuerpos APDG (isotipo IgA e IgG) y evaluación de su utilidad como nuevos marcadores serológicos para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

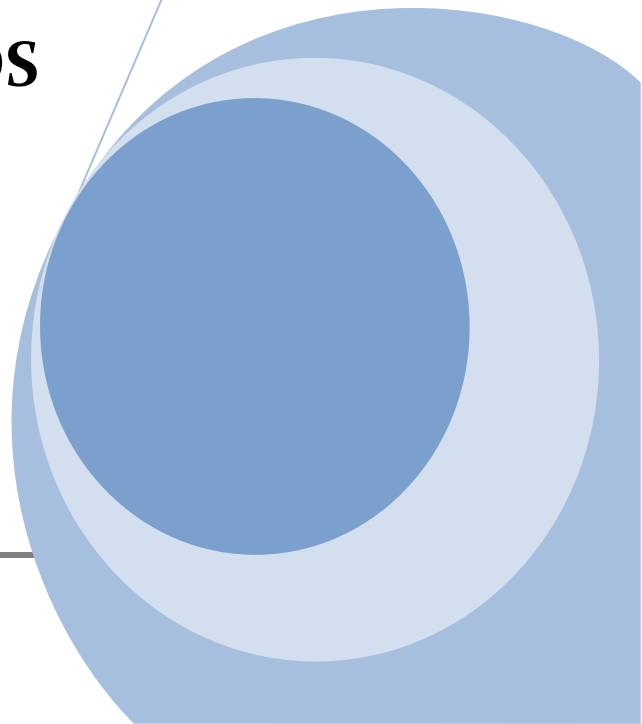
OBJETIVOS

- ❖ Comparación del rendimiento analítico de magnetos inmunosensores electroquímicos, destinados a la detección de ATG2 y APDG, con la finalidad de mejorar el poder diagnóstico de la enfermedad celíaca.
- ❖ Validación de las metodologías desarrolladas, con posterior transmisión y difusión de los resultados, pretendiendo que estos prototipos en desarrollo constituyan la base de futuros dispositivos comerciales, de alto rendimiento analítico en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, de manera que puedan ser implementados como metodologías de rutina en cualquier centro de salud.
- ❖ Incorporación de nuevos conocimientos, experiencias y actitudes frente a las diferentes etapas que involucran el método científico; para que capaciten al futuro doctorando en la resolución de futuros problemas analíticos en un marco social.

En los próximos capítulos se presentan las actividades experimentales, junto a resultados, discusiones y conclusiones, llevados a cabo en la generación de las diferentes metodologías analíticas desarrolladas en este trabajo de tesis. Para una mejor comprensión, se ha dividido cada capítulo en cinco puntos principales: (i) *Evaluación de siete cosustratos en la cuantificación de la enzima peroxidasa por voltametría de onda cuadrada* (Kergaravat y col., 2012a), (ii) *Determinación de biotina en alimentos suplementarios mediante un magneto biosensor electroquímico* (Kergaravat y col., 2012b), (iii) *Magneto inmunoensayo fluorescente para el diagnóstico de enfermedad celíaca* (Kergaravat y col., 2013b), (iv) *Magneto inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos anti-TG2 en enfermos celíacos* (Kergaravat y col., 2013b) y (v) *Magnetos inmunosensores electroquímicos para la detección de anticuerpos anti-TG2 y anti-PDG en enfermos celíacos*.



4. MATERIALES Y METODOS



4.1. EVALUACION DE SIETE COSUBSTRATOS EN LA CUANTIFICACION DE LA ENZIMA PEROXIDASA POR VOLTAMETRIA DE ONDA CUADRADA

4.1.1. Reactivos y soluciones

HRP (1310 U mg^{-1}), hidroquinona, TMB y pirocatecol se adquirieron en Sigma. El resto de los reactivos, tal como peróxido de hidrógeno, fenol, p-clorofenol, OPD, p-benzoquinona y p-aminofenol fueron de grado analítico. Las soluciones de fenol, hidroquinona, H_2O_2 y pirocatecol se prepararon con agua MilliQ. Las soluciones de OPD, p-clorofenol, p-aminofenol y benzoquinona se disolvieron en etanol:agua MilliQ (50:50), mientras la solución de TMB en dimetilsulfóxido. Las soluciones tampón fueron fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (para regular el pH de 5,0 a 7,0) y acetato/fosfato/borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (para regular el pH de 4,0 a 9,0).

4.1.2. Instrumental

Las técnicas electroquímicas de voltametría cíclica, onda cuadrada, amperometría y cronoamperometría se realizaron con un analizador voltamétrico Epsilon BAS, Bioanalytical Systems Inc. (West Lafayette Indiana, E.E.U.U.), con un sistema de tres electrodos basados en GEC como electrodo de trabajo (Céspedes y col., 1996; Santandreu y col., 1997; Céspedes y Alegret, 2000;); platino como electrodo auxiliar y Ag/AgCl en solución 3 mol L^{-1} de NaCl como electrodo de referencia (Orion 92-02-00). El área efectiva de los electrodos de trabajo fue de $0,21 \text{ cm}^2$, con un coeficiente de variación porcentual (CV%) = 14%, $n = 10$. La misma se obtuvieron mediante cronoamperometría, usando 2 mM de ferricianuro de potasio a través de la ecuación de Cottrell (Bard y Faulkner, 2001), usando un valor de $7,26 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ como coeficiente de difusión del ferricianuro de potasio (Petrovic, 2000).

MATERIALES Y METODOS

4.1.3. Comportamiento electroquímico de los cosustratos

El comportamiento electroquímico de fenol, OPD, TMB, hidroquinona, p-clorofenol, pirocatecol y p-aminofenol se analizaron mediante voltametría cíclica (velocidad de barrido = $0,1 \text{ V s}^{-1}$) en el intervalo de potencial desde 800 a -800 mV . En estos ensayos se utilizaron soluciones de cosustrato de $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, en solución tampón de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 6,00.

4.1.4. Optimización de las condiciones experimentales

Los ensayos enzimáticos en la celda de reacción de 5,0 mL consistieron en 4,0 mL de solución tampón y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH variable, donde se adicionaron pequeños volúmenes (μL) de enzima HRP, cosustrato y H_2O_2 a diferentes concentraciones. Por un lado, se realizó un procedimiento de optimización sistemática de cuatro factores involucrados en la reacción enzimática mediante el uso de MSR a través de un diseño central compuesto (DCC) (Design-Expert 7.1.6). Los factores evaluados fueron el pH de la solución tampón acetato/fosfato/borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH desde 4,0 a 9,0), la concentración enzimática (de 9,5 a 38,2 nM), la concentración de cosustratos (de 0,5 a $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) y la concentración de H_2O_2 (de 2 a $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Por otro lado, la selección de la técnica electroquímica entre voltametría de onda cuadrada y amperometría se realizó para cada sistema HRP-cosustrato- H_2O_2 . Para ello, se mantuvieron las concentraciones de cosustrato, H_2O_2 y enzima en las condiciones óptimas establecidas mediante el DCC.

4.1.5. Detección electroquímica

4.1.5.1. Amperometría

El voltaje óptimo aplicado en amperometría para cada sistema se determinó mediante voltametrías hidrodinámica. Estas voltametrías se realizaron mediante amperometría, en agitación de las soluciones enzimáticas, aplicando potenciales decrecientes sobre el electrodo de trabajo en saltos de potencial de 50 mV en la rama catódica. Luego, las respuestas de corriente de reducción en estado estacionario se graficaron en función del potencial (E) aplicado. Cada ensayo se realizó por triplicado con un electrodo nuevo y los resultados mostrados representan los valores de intensidad de corriente (IC) de reducción promedio. La **Tabla 4.1** muestra las condiciones experimental de los sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 , analizada mediante voltametría hidrodinámica.

4.1.5.2. Voltametría de onda cuadrada

Los parámetros de las voltametrías de onda cuadrada no se optimizaron, sino que se aplicaron en los valores aconsejados por el fabricante del analizador voltamétrico, es decir, $\Delta E = 4$ mV, $E_{\text{voc}} = 25$ mV y frecuencia ($f_{\text{voc}} = 15$ Hz). Las VOC se llevaron a cabo después de 3 min de reacción enzimática, barriendo el voltaje en la rama catódica para cada sistema enzimático. La **Tabla 4.1** muestra las condiciones experimentales de los siete sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 analizados mediante VOC.

MATERIALES Y METODOS

Tabla 4.1. Condiciones de los siete sistemas HRP-cosustrato-H₂O₂ en voltametría hidrodinámica y VOC

Sistemas	^a Voltametría hidrodinámica				^a VOC			
	[HRP] (mol L ⁻¹)	[cosustrato] (mol L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] (mol L ⁻¹)	pH	[HRP] (mol L ⁻¹)	[cosustrato] (mol L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] (mol L ⁻¹)	pH
HRP-H ₂ O ₂ -fenol	1,9 x 10 ⁻⁸	0,1 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	7,0	3,8 x 10 ⁻⁸	0,5 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	7,5
HRP-OPD- H ₂ O ₂	9,5 x 10 ⁻⁹	0,25 x 10 ⁻³	0,125 x 10 ⁻³	6,0	9,5 x 10 ⁻⁹	2,5 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³	6,0
HRP-p-clorofenol- H ₂ O ₂	1,9 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	6,0	1,9 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	6,0
HRP-hidroquinona- H ₂ O ₂	1,9 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	7,5	1,9 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	7,5
HRP-TMB- H ₂ O ₂	1,9 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	6,0	3,8 x 10 ⁻⁸	1,0 x 10 ⁻³	4,0 x 10 ⁻³	7,0
HRP- pirocatecol - H ₂ O ₂	9,5 x 10 ⁻⁹	0,5 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	6,0	9,5 x 10 ⁻⁹	2,0 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻³	6,0
HRP-p-aminofenol- H ₂ O ₂	3,8 x 10 ⁻⁸	0,25 x 10 ⁻³	0,125 x 10 ⁻³	5,0	3,8 x 10 ⁻⁸	2,5 x 10 ⁻³	2,5 x 10 ⁻³	5,0

^aen solución tampón fosfato 0,1 mol L⁻¹ y KCl 0,1 mol L⁻¹

MATERIALES Y METODOS

4.1.6. Determinación de las constantes aparentes de Michaelis

Se evaluaron las constantes aparentes de Michaelis (K_m) y las velocidades máximas aparentes (V_{max}) en la reacción de varios cosustratos y H_2O_2 con HRP. En todos los ensayos la actividad enzimática y el pH de la solución tampón se mantuvieron en las condiciones óptimas del DCC. Por un lado, la concentración de H_2O_2 fue constante y la concentración del cosustrato se varió en el intervalo desde $0,5$ a $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para cada sistema. Por otro lado, la concentración del cosustrato fue constante y la concentración de H_2O_2 se evaluó en el intervalo desde $0,5$ a $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Las constantes aparentes de cosustratos y H_2O_2 en cada sistema se obtuvieron usando el método de Lineweaver–Burk para el mecanismo ping-pong de dos sustratos del sistema enzimático de la peroxidasa (Lai y col., 2006; Zacco y col., 2006; Shivakumar y col., 2010). Además, se calcularon las constantes catalíticas (K_{cat}) y las eficiencias catalíticas (E_f).

4.1.7. Curvas de calibración para la determinación de la concentración enzimática

Las curvas de calibración de la respuesta enzimática se realizaron como densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) en función de la concentración enzimática (mol L^{-1}). Los pH de las soluciones tampones se mantuvieron en las condiciones óptimas del DCC, mientras que las concentraciones enzimáticas se variaron desde $1,9 \times 10^{-11}$ a $5,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Se realizó el ensayo de homocedasticidad, aplicando un ensayo F para un intervalo de confianza del 95%, para determinar si se debía ajustar la calibración mediante OLS (cuadrados mínimos ordinarios, por sus siglas en inglés) o WLS (cuadrados mínimos ponderados, por sus siglas en inglés). Debido a que los datos presentaron distribución heterocedástica, las curvas de calibración se analizaron mediante WLS utilizando la versión de MATLAB 7.6.0. (R2008a) (Massart y col., 1997; Olivieri y Goicoechea, 2007).

4.2. DETERMINACION DE BIOTINA EN ALIMENTOS SUPLEMENTARIOS MEDIANTE UN MAGNETO BIOSENSOR ELECTROQUIMICO

4.2.1. Reactivos y soluciones

PM de $1 \mu\text{m}$ de diámetro modificadas con estreptavidinas (*Dynabeads M-280 Streptavidin*, Cat. Nº 602.10) se adquirieron en Invitrogen (Oslo, Norway). Biotina (Cat. Nº B4501) y biotina-HRP (*peroxidase - biotinamido caproyl conjugate lyophilized powder*, Cat. Nº P9568) se obtuvieron en Sigma. Las soluciones concentradas de partículas magnéticas activadas con estraptavidinas, biotina u

MATERIALES Y METODOS

biotina-HRP se prepararon en solución tampón de citrato (citrato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ y NaCl $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0). La solución de biotina se solubilizó inicialmente en NaOH 1 mol L^{-1} . El resto de los reactivos de alto grado analítico se compraron en Sigma o Merck. La solución de OPD se preparó en metanol:agua Milli-Q (50:50). Las soluciones tampón fueron fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 6,0 y acetato/fosfato/borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (regulando el pH desde 4,0 a 9,0).

4.2.2. Instrumental

Las técnicas electroquímicas de voltametría cíclica, de onda cuadrada y cronoamperometría se aplicaron a partir de un analizador voltamétrico Epsilon BAS, Bioanalytical Systems Inc (West Lafayette Indiana—E.E.U.U.) con un sistema de tres electrodos, m-GEC como electrodo de trabajo (Pividori y Alegret, 2005; Zacco y col., 2006; Pividori y col., 2007); platino como electrodo auxiliar y Ag/AgCl en solución 3 mol L^{-1} de NaCl como electrodo de referencia (Orion 92-02-00). El área efectiva de los electrodos de trabajo fue de $0,43 \text{ cm}^2$ (CV% = 13%, n = 20). Las mismas se obtuvieron mediante cronoamperometría, usando 2 mM de ferricianuro de potasio a través de la ecuación de Cottrell (Bard y Faulkner, 2001), usando un valor de $7,26 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ como coeficiente de difusión del ferricianuro de potasio (Petrovic, 2000).

4.2.3. Análisis estadístico

El ensayo de ANOVA (Análisis de varianza por sus siglas en inglés) se utilizó para comparar muestras diferentes y/o pre-tratamientos. Los ensayos paramétricos se procesaron teniendo en cuenta que los datos cumplieran con la distribución normal y la homogeneidad de varianza. Un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ se aplicó en todos los ensayos estadísticos.

4.2.4. Magneto biosensor electroquímico para la cuantificación de biotina en suplemento dietario y formulación infantil

El ensayo competitivo para la detección de biotina se realizó acorde a la estrategia 2, en tubos Eppendorff mediante la adición de pequeños volúmenes de biotina estándar o proveniente de una muestra a una solución de $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-estreptavidina, hasta lograr un volumen final de $250 \mu\text{L}$ con solución tampón de citrato. Luego de la etapa de incubación inicial, se adicionó $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de biotina-HRP y se realizó una segunda incubación. Posteriormente, se aplicaron las etapas de separación magnética y lavado con agitación a temperatura ambiente durante 15 y 5 min, respectivamente. Para la separación magnética se utilizó el transductor m-GEC. Cuando todas las

MATERIALES Y METODOS

partículas magnéticas modificadas migraron al electrodo, éste se sumergió en la celda electroquímica, conteniendo los sustratos enzimáticos y se obtuvo la respuesta electroquímica mediante VOC en el intervalo desde 0 a -400 mV durante 60 s. El pico de IC de reducción, informada como densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) se registró a -170 mV (CV% = 11%) contra Ag/AgCl en solución 3 mol L⁻¹ de NaCl como electrodo de referencia.

La concentración de biotina se analizó mediante el magneto biosensor electroquímico en el intervalo desde $1,4 \times 10^{-8}$ a $3,57 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, obteniendo una curva de biotina de densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) en función de la concentración de biotina (mol L⁻¹). La ecuación logística de cuatro parámetros se ajustó acorde a la Ecuación 4.1:

$$y = \left\{ (IC_{\max} - IC_{\min}) / [1 + 10 \exp((\log CE_{50} - \log X) * D)] \right\} + IC_{\min} \quad (4.1)$$

donde IC_{\max} y IC_{\min} son la respuesta electroquímica máxima y mínima, respectivamente, CE_{50} es la concentración del analito en estudio que produce el 50% de la respuesta máxima, X es la concentración del analito en estudio y D es la pendiente Hill en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. El LD y el límite de cuantificación (LC) se calcularon como el 90% y el 80% de la señal electroquímica de la curva estándar, respectivamente. Los ensayos de repetibilidad y exactitud se determinaron a una concentración de biotina estándar de $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (n = 4).

Las cuantificaciones de biotina se realizaron en suplementos dietarios fortificados con biotina y en muestras de formulación infantil, cuyas concentraciones indicadas en los envases fueron 150 y 12,1 μg de biotina en 100 g, respectivamente. Además, las muestras declaraban los siguientes nutrientes cada 100 g: (i) Suplemento dietario: 19,3 g de azúcares, 15,9 g de proteínas, 14 g de grasas, 360 mg de sodio, 1170 UI de vitamina A, 95 UI de vitamina D₃, 11 UI de vitamina E; 18 μg de vitamina K₁, 68 mg de vitamina C, 0,72 mg de vitamina B₁, 0,80 mg de vitamina B₂, 1 mg de vitamina B₆, 3,1 μg de vitamina B₁₂, 10 mg NE de niacina, 200 μg de ácido fólico, 5 mg de ácido pantoténico, 136 mg de colina, 670 mg de potasio, 610 mg de cloruro, 280 mg de calcio, 230 mg de fósforo, 230 mg de magnesio, 5,4 mg de zinc, 4,4 mg de hierro, 0,52 mg de cobre, 1,2 mg de manganeso, 34 μg de yodo, 19 μg de selenio, 20 μg de cromo y 38 μg de molibdeno; (ii) Formulación infantil: 56,7 g de carbohidratos, 10,7 g de proteínas, 26,5 g de grasas, 190 mg de sodio, 492 mg de potasio, 388 mg de cloro, 402 mg de calcio, 252 mg de fósforo, 41,4 mg de magnesio, 3,9 mg de zinc, 6 mg de hierro, 320 μg de cobre, 50 μg de manganeso, 77 μg de yodo, 11,4 μg de selenio, 230 μg RE de vitamina A, 9,1 μg de vitamina D, 7 μg - α -TE de vitamina E, 38,3 μg de vitamina K₁, 61 mg de vitamina C, 0,76 mg de vitamina B₁, 0,76 mg de vitamina B₂, 0,31 mg de vitamina B₆, 1,5 μg de vitamina B₁₂, 3,3 mg NE de niacina, 91 μg de ácido fólico, 2,5 mg de ácido pantoténico, 75 mg de colina y 35 mg de taurina.

MATERIALES Y METODOS

Los pretratamientos de las muestras se llevaron a cabo acorde al procedimiento optimizado en bibliografía (Nelson y col., 2006), donde 2 g de muestra se extrajeron con 5 mL de ácido fórmico 1,5% v/v, con agitación durante 5 min. Luego, todas las muestras se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm. Para analizar el contenido de biotina mediante el magneto biosensor electroquímico, se tomaron 15 y 100 μL del sobrenadante de suplemento dietario fortificado con biotina y de la formulación infantil, respectivamente. La concentración de biotina se calculó a partir de la curva de calibración y se informó como mg de biotina en 100 g de muestra.

4.3. MAGNETO IMMUNOENSAYO FLUORESCENTE PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA

4.3.1. Reactivos y soluciones

PM de 2,8 μm de diámetro modificadas con grupos tosilos (*Dynabeads MyOneTM Tosylactivated*, Cat. no. 655.01) se adquirieron en Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norway). Transglutaminasa tipo II de hígado de cobayo se compró en Sigma-Aldrich (Cat. nº T5398-2UN y T5398-1UN). Las soluciones se prepararon en solución tampón de fosfato 0,01 mol L⁻¹ y NaCl 0,15 mol L⁻¹ a pH 7,4 y se conservaron a -15 °C hasta su uso. BSA (Albúmina sérica bovina, por sus siglas en inglés), anticuerpo anti-transglutaminasa tipo II (antisuero total, desarrollado en cabra) (T7066), el anticuerpo desarrollado en conejo antiIgG de cabra rotulado con HRP (antiIgG cabra-HRP) (A5420) y el anticuerpo desarrollado en cabra antiIgA de humana rotulado con HRP (antiIgA humana-HRP) (Ao295) se adquirieron en Sigma-Aldrich. El ensayo ELISA comercial anti-TG2 isotipo IgA (QUANTA Lite® 708760 INOVA Diagnostics, Inc.) se adquirió en Ianus s.a. La solución Bradford (*Bradford Coomassie*, Cat.nº 23200), el peróxido de hidrógeno, el Tritón X-100, el TMB y la OPD utilizadas para las medidas ópticas y fluorescentes se obtuvieron en Sigma.

Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua milliQ. La composición de las soluciones usadas en las etapas de inmovilización fueron: solución tampón de inmovilización (borato de sodio 0,1 M, pH 9,5); PBST (solución tampón de fosfato 0,01 M, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Tween 20, pH 7,4); solución tampón de bloqueo y lavado (PBST con 0,5% y 0,1% m/v de BSA añadida, respectivamente); solución tampón de conservación (PBST con 0,1% m/v de BSA y 0,02% m/v de azida sódica añadida). Las soluciones de OPD-H₂O₂ y Tritón X-100 se prepararon en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 mientras que la solución de TMB-H₂O₂ en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, con dimetilsulfóxido 1% a pH 4,2.

La inmovilización de TG2 a las PM se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Es decir, un volumen de 160 μL de PM tosilo (30 mg mL⁻¹) se lavó dos veces con 100 μL de solución tampón de

MATERIALES Y METODOS

inmovilización. Posteriormente, las PM se resuspendieron en un volumen final de 250 μL , comprendido por 240 μL de la solución tampón de inmovilización y 10 μL de la solución de TG2 de 10 mg mL^{-1} (preparada en solución tampón de fosfato 0,01 mol L^{-1} , 0,15 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,4). Luego, las PM se incubaron durante 24 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$ y 700 rpm. Después de la incubación, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para la cuantificación de proteínas remanentes mediante el ensayo Bradford (Hinton y col., 2004). Las partículas modificadas se resuspendieron en el mismo volumen total (250 μL) de solución tampón y se incubaron durante 6 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$ y 700 rpm, para la inactivación de los grupos tosilos. Las PM modificadas se sometieron a tres etapas de lavado con la solución tampón de lavado y, finalmente, se resuspendieron en la solución tampón de conservación para lograr una solución de 25 mg mL^{-1} , que sería conservada a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes de cada ensayo, las PM-TG2 se lavaron tres veces con PBST y se resuspendieron a un volumen final a la concentración de PM deseada.

4.3.2. Instrumental

Tanto la inmovilización de TG2 a las PM, como las etapas de incubación y lavado se llevaron a cabo usando un rotador básico IKA MS3 (Modelo SA0741724) con rotación controlada. Las placas de microtitulación "MaxiSorp" F96 blancas y negras se compraron en Nunc (Dinamarca). La separación magnética de las partículas durante las etapas de lavado se realizó utilizando el separador magnético para las placas de microtitulación diseñado en nuestro laboratorio (**Figuras 4.1a y b**). Para ello, se cortó una pieza de acrílico de 227 mm de largo y 85 mm de ancho con la máquina LGC (máquina láser de grabado y corte - Consys Laser Mod 5030 40 W - China). Luego se realizaron ocho perforaciones de 4 mm de diámetro y 8 mm de alto en el centro de la plataforma de acrílico mediante la máquina LGC. En esas perforaciones, se incorporaron ocho imanes de neodimio de 200 mT de inducción magnética (4 mm de diámetro y 8 mm de alto). Todos los cortes se realizaron a 16 W de potencia del láser y 20 mm s^{-1} de velocidad de grabado. Con la finalidad de mejorar la aspiración del sobrenadante en la etapa de la separación magnética, los imanes se colocaron entre dos pocillos. Esto permitió aspirar fácilmente el sobrenadante de uno de los costados sin tomar a las PM modificadas.

MATERIALES Y METODOS

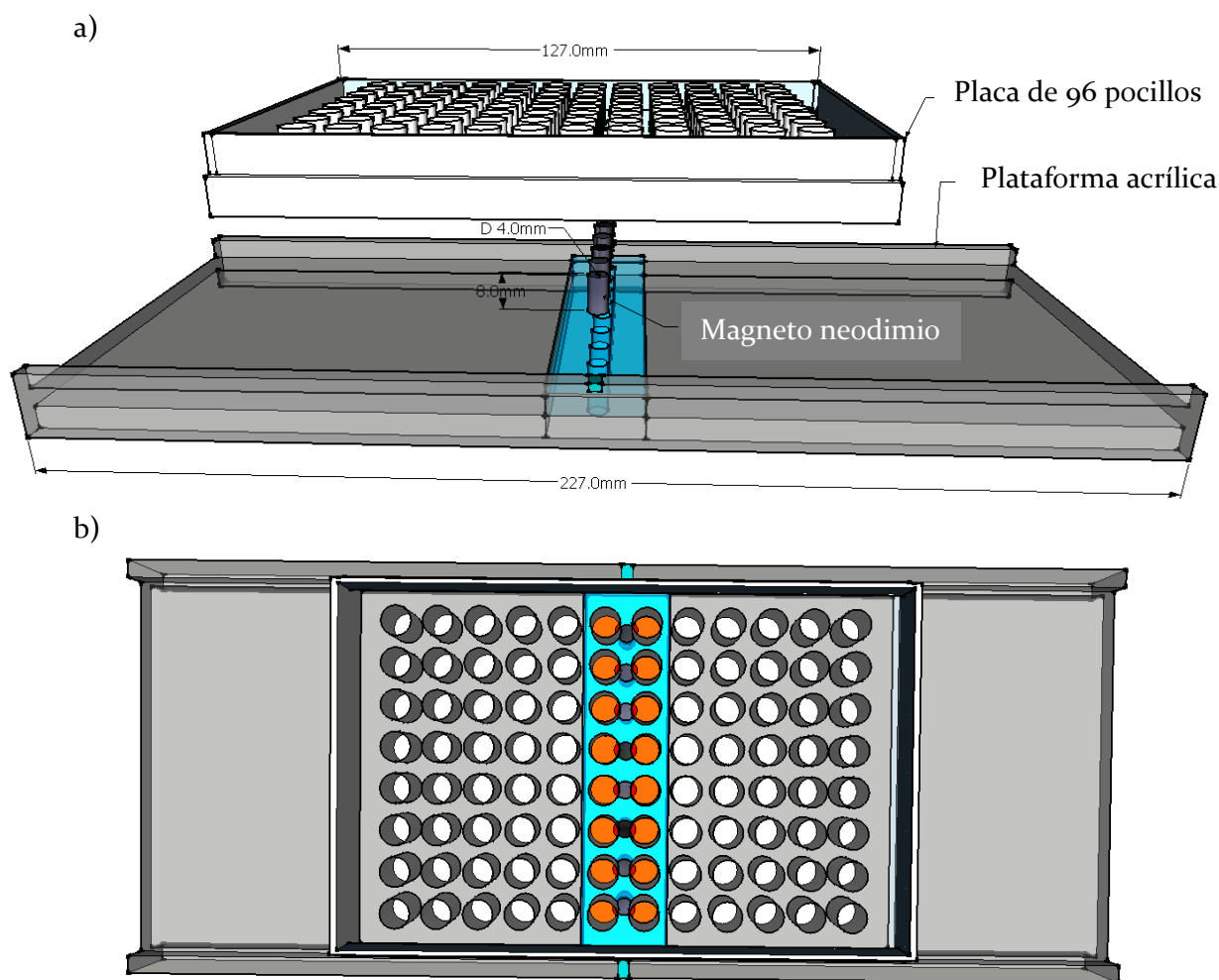


Figura 4.1. Soporte magnético construido para las placas de microtitulación de 96 pocillos. (a) Vista lateral, en la cual se observa la plataforma acrílica, donde 8 magnetos se colocaron en la zona central para luego servir de soporte a las placas; (b) Vista superior, en la cual la placa ha sido posicionada sobre el soporte magnético de tal manera que los magnetos queden en la zona central de dos filas de pocillos, mejorando así la extracción del sobrenadante en cada etapa de reacción inmunológica, sin aspiración de las partículas magnéticas modificadas.

Las medidas de absorción electrónica y de fluorescencia se realizaron con un espectrofotómetro Lambda 20 y un espectrómetro luminiscente LS 55, respectivamente, ambos instrumentos de marca Perkin-Elmer (Llantrisant, Reino Unido). Las curvas competitivas se analizaron con la ecuación logística de cuatro parámetros usando el software Graph Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

4.3.3. Medida fluorescente

La reacción enzimática de la HRP con OPD como cosustrato y H₂O₂ como sustrato se evaluó en la placa de microtitulación de 96 pocillos mediante métodos fluorescentes. Para ello, $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de OPD y H₂O₂ se añadieron a las soluciones conteniendo HRP (o PM-inmunocomplejo) y se incubaron durante 20 min en oscuridad. Luego, se adicionó Tritón X-100 a fin de alcanzar una concentración de 2% m/v y se incubó durante 2 min. El volumen final fue de 300 μL y el medio de reacción fue solución tampón de citrato-fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0.

La fluorescencia del producto de OPD se registró a una longitud de onda de excitación y emisión (λ_{exc} y λ_{em}) de 440 nm y 540 nm, respectivamente.

4.3.4. Magneto inmunoensayo fluorescente

El magneto inmunoensayo fluorescente se representa esquemáticamente en la **Figura 4.2**. Los pasos del ensayo fueron: (i) primer etapa de incubación: 100 μL de la solución PM-TG2 ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) se adicionaron a 100 μL de ATG2 (títulos entre 1:68000 a 1:300) en condiciones de agitación durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados con 100 μL de PBST, aplicando un campo magnético entre los lavados con la finalidad de separar las PM modificadas del sobrenadante. (ii) Segunda etapa de incubación: se adicionaron 100 μL de anticuerpo antiIgG cabra-HRP 1:20000 y el inmunocomplejo resultante se incubó durante 30 min a temperatura ambiente bajo condiciones de agitación. Posteriormente, se aplicó nuevamente la etapa de lavado. (iii) Medida fluorescente (sección 4.4.3.).

MATERIALES Y METODOS

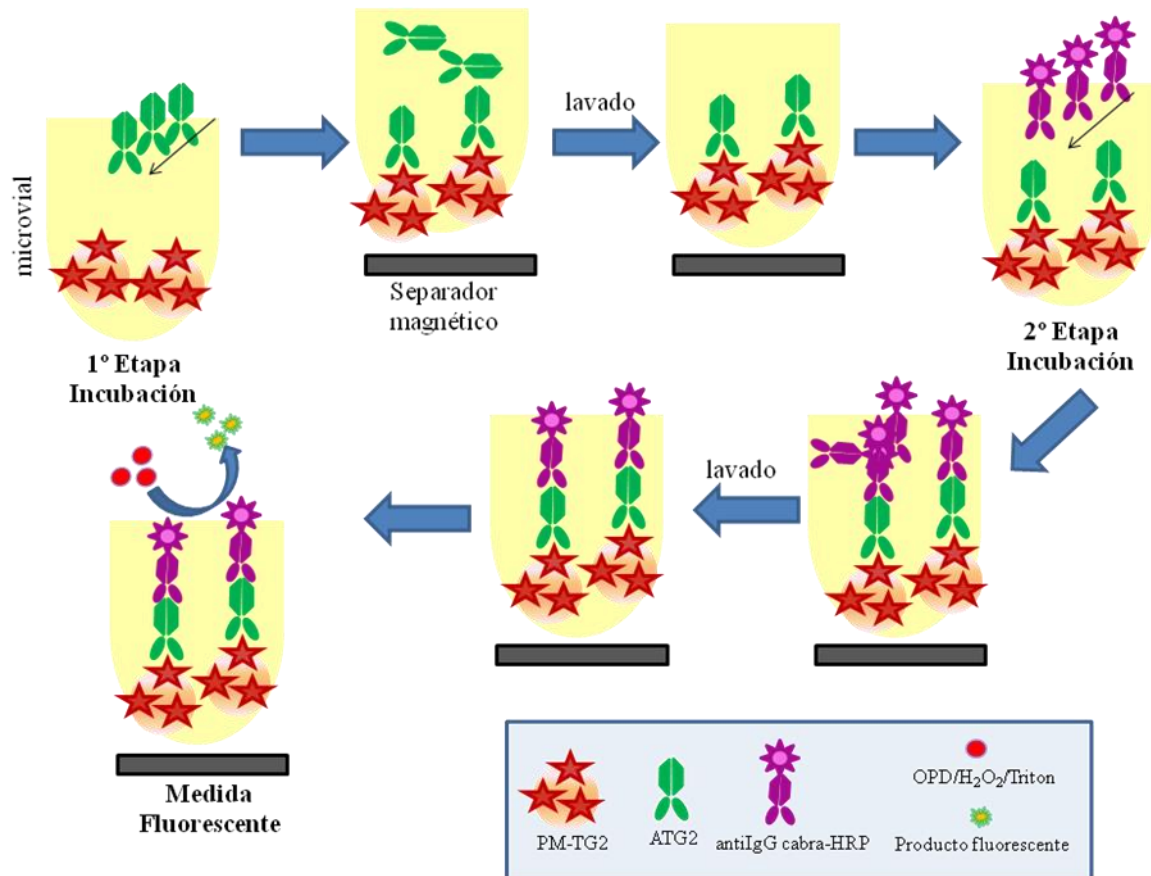


Figura 4.2. Representación esquemática de la reacción inmunológica sobre la superficie de las partículas magnéticas localizadas en los viales de las placas de microtitulación.

La curva estándar se ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 4.1). El LD, LC y la CE₅₀ se calcularon como el 10, 20 y 50% de intensidad de fluorescencia (IF) a partir de la curva estándar, respectivamente. El intervalo dinámico se estableció entre el 20 al 80% de IF.

4.3.5. Ensayos de validación

Los ensayos de precisión se realizaron para títulos de ATG₂ de 1:40000, 1:15000 y 1:4000. La precisión intra- e inter-ensayo se evaluaron mediante análisis múltiple ($n = 3$) en un día de ensayo y análisis en cinco corridas analíticas diferentes, respectivamente. Las condiciones experimentales para este ensayo fueron $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG₂ y 1:20000 de antiIgG cabra-HRP. Además, la precisión intermedia se realizó para dos lotes de TG₂ (6,28 y 3,14 mU mg PM⁻¹ por ensayo) en dos días y con dos instrumentos diferentes. Las condiciones experimentales fueron $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG₂, 1:15000 de ATG₂ y 1:20000 de antiIgG cabra-HRP.

MATERIALES Y METODOS

Para evaluar el efecto matriz, se construyeron curvas de calibración para títulos de ATG₂ en el intervalo desde 1:70000 a 1:300 en solución tampón de fosfato 0,01 mol L⁻¹, 0,15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7,4 (PBS), plasma y suero negativos diluidos 1:25.

Luego, los ensayos de recuperación se realizaron para tres títulos de ATG₂ (1:1000, 1:2000 y 1:4000) adicionados en suero negativo diluido 1:25 y tres títulos de ATG₂ (1:2000, 1:4000 y 1:8000) en plasma negativo diluido 1:25.

4.3.6. Ensayos serológicos

Los Hospitales “Iturraspe” y de Niños “Dr. O. Alassia” de la ciudad de Santa Fe (Argentina) suministraron 48 muestras provenientes de pacientes a quienes se les había realizado el estudio serológico a la enfermedad celíaca y la confirmación histológica mediante biopsia intestinal. Del total de casos resultaron 29 positivos y 19 negativos a la enfermedad celíaca.

Las 48 muestras se analizaron mediante el magneto inmunoensayo fluorescente y la distribución de los resultados obtenidos para las dos poblaciones se evaluaron mediante el ensayo de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Hinton y col., 2004). Debido a que las desviaciones de la normalidad fueron estadísticamente significativas para ambas poblaciones (obteniendo un $P < 0,05$), la comparación entre grupos se realizó mediante el ensayo U de Mann-Whitney. Posteriormente, se determinó el mejor valor de corte de ATG₂, que discrimine entre pacientes con y sin enfermedad celíaca mediante las curvas ROC con los softwares SPSS y MedCalc. Luego, los resultados obtenidos mediante el magneto inmunoensayo fluorescente se correlacionaron con los obtenidos mediante un ensayo ELISA comercial.

4.4. MAGNETO INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG₂ EN ENFERMOS CELIACOS

4.4.1. Reactivos y soluciones

Los reactivos PM, TG₂, ATG₂, antiIgG cabra-HRP y antiIgA humana-HRP fueron los mismos que los detallados en la sección 4.3.1. Ianus s.a. suministró el ensayo comercial ELISA anti-TG₂ isotipo IgA (INOVA). Todos los reactivos de grado analítico se adquirieron en Sigma. El polvo de grafito, con un tamaño de partícula de 50 µm, se obtuvo en Merck, mientras que la resina Epoxy Epo-Tek H77 en Epoxy Technology 100 (Billerica, MA, E.E.U.U.). Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua milliQ. Las soluciones usadas en la etapa de inmovilización tuvieron la misma composición que la descrita en la sección 4.3.1.

4.4.2. Instrumental

Las medidas electroquímicas se realizaron con el analizador voltamétrico Epsilon BAS, Bioanalytical Systems Inc. (West Lafayette Indiana, E.E.U.U.). Los parámetros de la VOC fueron los mismos que los detallados en la sección 4.1.5.2. Otros instrumentos utilizados fueron un Lector de placas Multiskan Automatic (Labsystem), un Multímetro “Yu Fung” Model YF 3130 (China) y un Teslámetro de efecto Hall, con una sonda axial “Leybold Didactic GMBH” (Alemania). Los imanes cilíndricos de neodimio (inducción magnética promedio = 200 mT, CV% = 1,2%, n = 10) se compraron en Magnum S.R.L. (Argentina). La máquina LGC se utilizó en la construcción del conector para los SPE. Además se utilizó un separador magnético para eppendorff Dynal MPC-S (Alemania) y un rotor básico IKA MS₃ (Modelo SA0741724). Las curvas competitivas se analizaron con la ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 4.1).

4.4.3. Celdas electroquímicas

Se utilizaron dos celdas electroquímicas. La primera consistió en un sistema de tres electrodos independientes: un electrodo c-GEC (compósito grafito-epoxi con conector magnético, por sus siglas en inglés) como trabajo; un electrodo de platino como auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl en solución 3 mol L⁻¹ de NaCl como referencia (Orion 92-02-00). Los electrodos c-GEC se desarrollaron en nuestro laboratorio (**Figura 4.3**). Brevemente, un tubo de cobre (3 mm de diámetro interno, 5 mm de diámetro externo y 17 mm de largo) se insertó dentro de un cuerpo cilíndrico de acrílico (5 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 20 mm de largo). El tubo de cobre se pegó al cuerpo de acrílico con unas gotas de cloroformo a través del extremo inferior, dejando 2 mm libres en el extremo superior. Luego, se dejó secar 5 minutos a temperatura ambiente. Para preparar el compósito, el polvo de grafito y la resina epoxi se mezclaron manualmente en una relación 1:4 (m/m) acorde a lo aconsejado en bibliografía (Cespedes y col., 1996; Santandreu y col., 1997; Cespedes y Alegret, 2000) y luego, esta pasta se colocó en la cavidad de 2 mm del extremo superior. Después del llenado, los electrodos se curaron a 60 °C por 3 o 4 días hasta obtener un compósito rígido. Antes de cada uso, la superficie de los GEC se renovó mediante un simple procedimiento de pulido. Para ello, la superficie de los GEC se humedeció con agua destilada y luego se pulió en el siguiente orden de granulación del papel de lija: 240, 600 y 800. Además, un conector magnético para los electrodos c-GEC se diseñó para capturar las partículas magnéticas. Este conector se construyó con un cuerpo de bronce de 2,90 mm de diámetro y 60 mm de alto. Se colocó material termocontraíble a una distancia de 35 mm desde la zona central. A partir de 15 mm del extremo inferior se calaron 2 mm y se soldaron a cada lado del conector una capa de bronce de 2 mm de ancho y 60 μm de espesor. Luego

MATERIALES Y METODOS

un disco de acero de 2,5 mm de diámetro y 1 mm de espesor se soldó en el extremo inferior y se adicionó sobre ese lado un imán de neodimio (3 mm de diámetro y 2 mm de alto). Se prepararon diez electrodos c-GEC con sus conectores magnéticos y el CV% obtenido del promedio de las inducciones magnéticas medidas en el centro de la superficie del electrodo fue 6,4%.

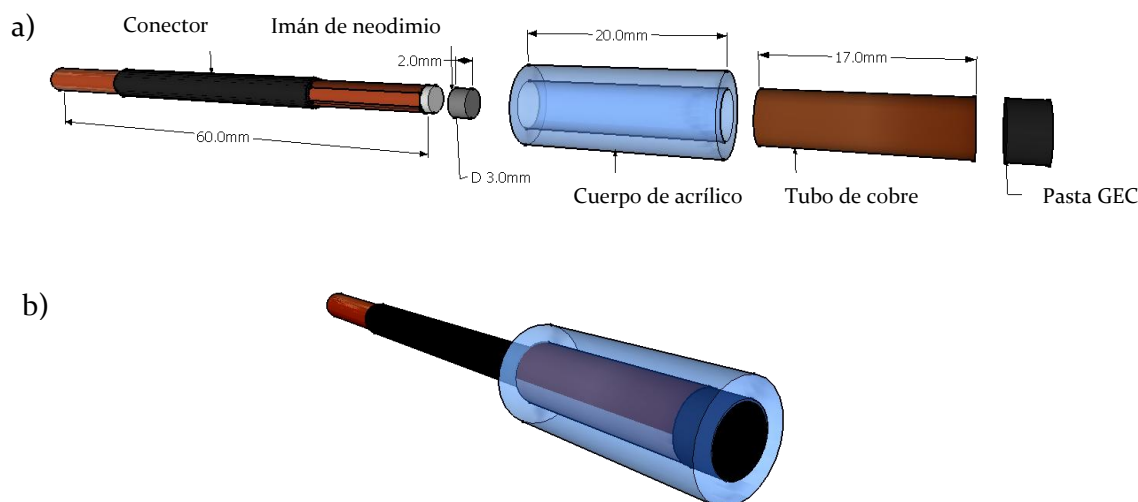
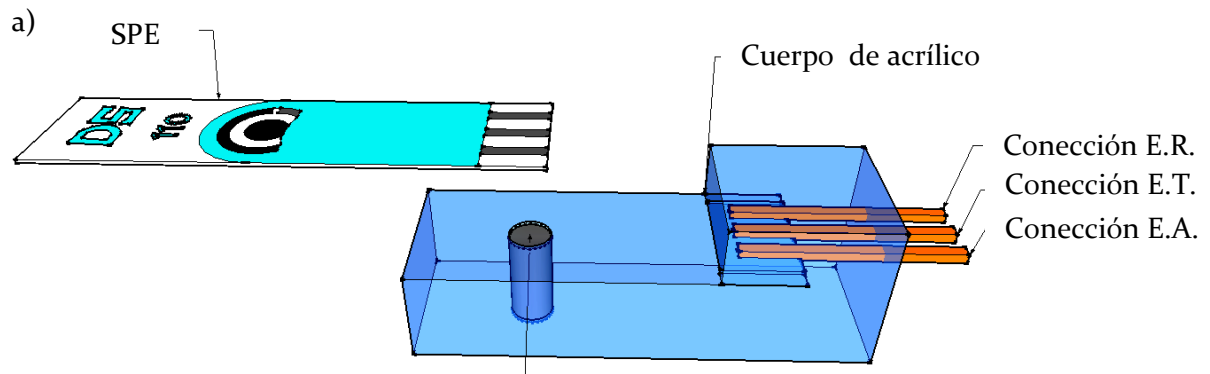


Figura 4.3. Construcción del electrodo c-GEC. (a) Partes constituyentes del electrodo c-GEC y (b) electrodo c-GEC ensamblado.

En la segunda celda electroquímica se utilizaron los SPE DS 110 provistos por DropSens (Oviedo, Spain). Los SPE están formados por carbón como electrodos de trabajo y auxiliar, y Ag como electrodo de pseudo-referencia. Un conector magnético para los SPE se realizó en el laboratorio como se muestra en la **Figura 4.4**. Este dispositivo consistió en dos cuerpos de vidrio acrílico (cuerpos superior e inferior). El cuerpo superior se construyó a partir de una pieza de acrílico de 5 mm de espesor mediante la máquina LGC (potencia del láser = 16 W y velocidad de grabado = 25 mm s⁻¹). Se marcaron tres surcos rectangulares (2 mm de espesor y 8 mm de largo) en la cara inferior del cuerpo superior mediante la máquina LGC (potencia láser = 10 W y velocidad de grabado = 30 mm s⁻¹). Luego, se inmovilizaron tres conectores de cobre de 0,35 mm de espesor y 15 mm de largo en los surcos, los cuales permitieron conectar cada electrodo del SPE al analizador voltamétrico. El cuerpo inferior se construyó a partir de una pieza de acrílico de 8 mm de espesor mediante la máquina LGC (potencial del láser = 18 W y velocidad de grabado = 15 mm s⁻¹). Además, en estas condiciones se cortó una cavidad en la parte inferior del electrodo, en la cual se introdujo un imán de neodimio de 4 mm de diámetro y 8 mm de alto, de manera de localizar las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo de trabajo. Luego, los dos cuerpos se unieron con cloroformo. Posteriormente, se

MATERIALES Y METODOS

soldaron tres conectores de acero a tres hilos monofilamento de 0,5 mm y se cubrieron con material termocontraible.



Magneto de neodimio: $D = 4 \text{ mm}$; $A = 8 \text{ mm}$

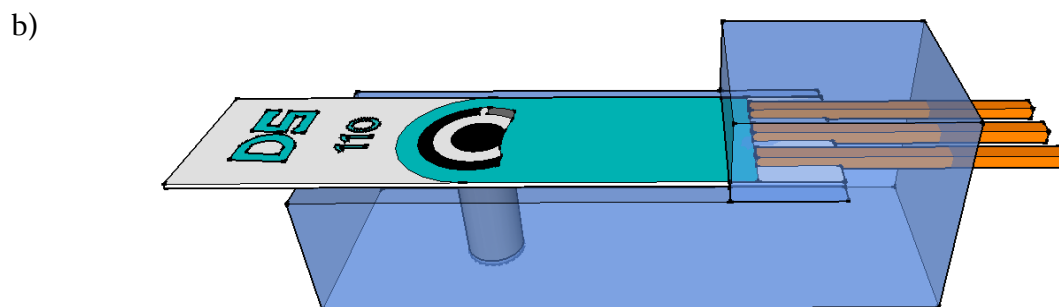


Figura 4.4. Conector para SPE. (a) Partes que constituyen el conector para SPE y el SPE, siendo E.R. = electrodo de referencia, E.T. = electrodo de trabajo, E.A. = electrodo auxiliar; (b) SPE ensamblado en el conector y listo para usar.

4.4.4. Magneto inmunosensor electroquímico

La inmovilización de TG2 sobre las PM se llevó a cabo como se detalló en la sección 4.3.1. El ensayo del inmunosensor se basó en un formato indirecto ilustrado en la **Figura 4.5**.

MATERIALES Y METODOS

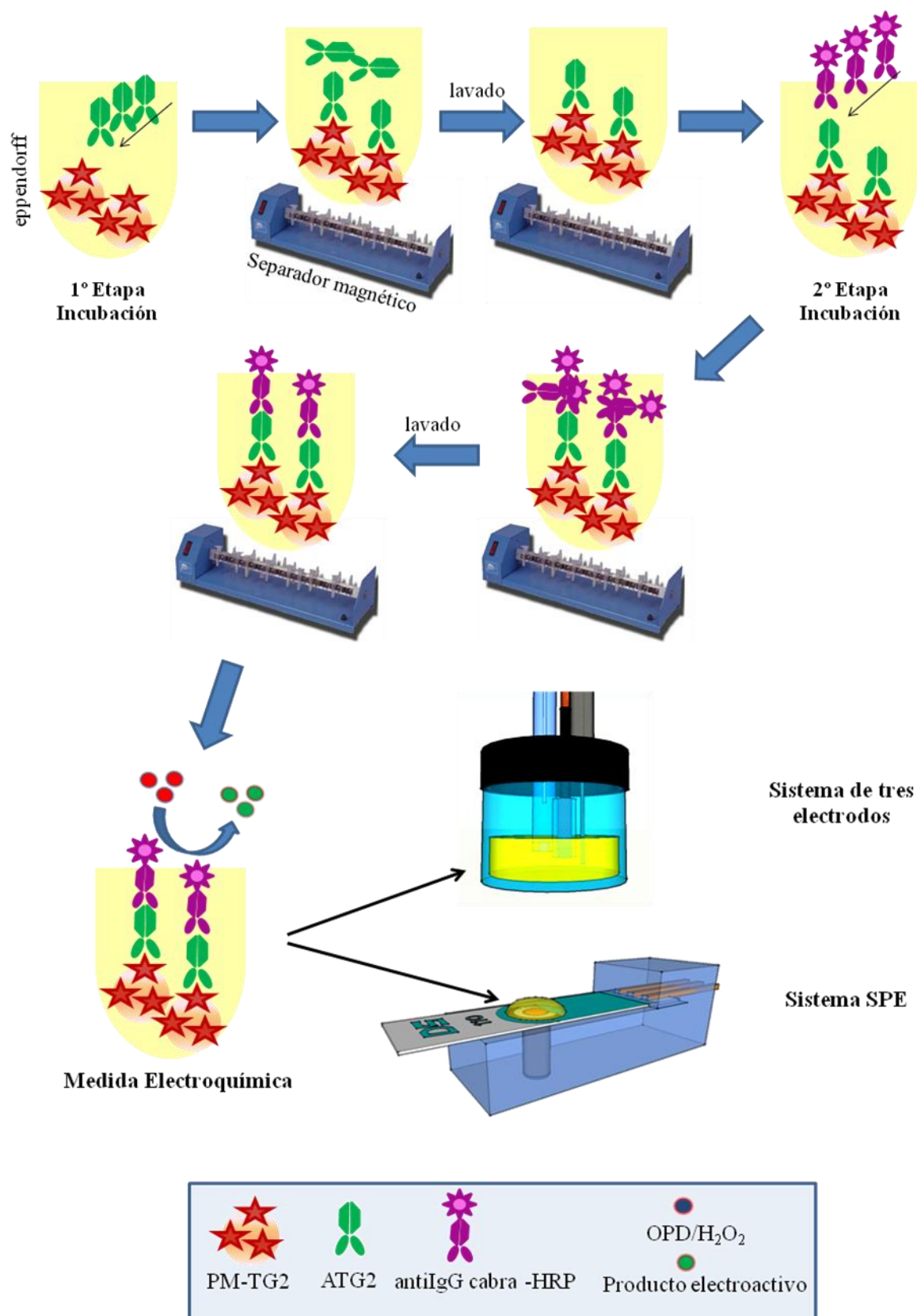


Figura 4.5. Esquema del protocolo del magneto inmunosensor electroquímico utilizando los sistemas de tres electrodos y SPE como transductores.

MATERIALES Y METODOS

El ensayo se realizó en tubos eppendorff de 2 mL en tres pasos: (i) Primer etapa de incubación: 70 μL de solución PM-TG₂ (1,5 mg mL⁻¹) se mezclaron con 70 μL de ATG₂ (títulos desde 1:20000 a 1:800) en condiciones de agitación durante 30 min a temperatura ambiente y, luego, PM-TG₂-ATG₂ se lavaron tres veces con 100 μL de PBST durante 5 min, luego de cada lavado se realizó la separación magnética mediante la aplicación de un campo magnético. (ii) Segunda etapa de incubación: 140 μL de anticuerpo antiIgG cabra-HRP diluido 1:20000 se adicionó y el inmunoensayo se incubó durante 30 min a temperatura ambiente bajo condiciones de agitación. Posteriormente, la etapa de lavado se aplicó nuevamente. (iii) Medida electroquímica:

(A) Para el sistema de tres electrodos independientes, las partículas se suspendieron en 140 μL de PBST y se captaron por inmersión de los electrodos c-GEC dentro de los tubos. El electrodo c-GEC se colocó en la celda de reacción con 300 μL de solución tampón de fosfato a pH 6,0 y los cosustratos enzimáticos (2,5 y 1,25 x 10⁻³ mol L⁻¹ de OPD y H₂O₂, respectivamente). Luego de una incubación de 2,5 minutos, la respuesta electroquímica se obtuvo mediante la técnica VOC en el intervalo desde 0 a -400 mV. La IC del pico de reducción se registró a -185 mV (CV% = 4,6%) contra el electrodo de referencia de Ag/AgCl en solución 3 mol L⁻¹ de NaCl.

(B) Para el sistema SPE, las partículas se resuspendieron en tubos Eppendorff con 300 μL de solución tampón de fosfato a pH 6,0 y con los cosustratos enzimáticos (2,5 y 1,25 x 10⁻³ mol L⁻¹ de OPD y H₂O₂, respectivamente). Luego de la incubación de 2,5 minutos, se transfirieron 70 μL de suspensión al SPE, siendo las partículas atraídas sobre el electrodo de trabajo debido a la inducción magnética del conector. La respuesta electroquímica se obtuvo a los 60 segundos de reacción mediante VOC en el intervalo desde -175 a -400 mV. La IC del pico de reducción se registró a -250 mV (CV% = 2,2%) contra Ag como electrodo de pseudo-referencia.

La curva estándar se ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 4.1). El LD, LC, CE₅₀ y intervalo dinámico se establecieron de igual manera que en la sección 4.3.4.

4.4.5. Ensayos de validación

Los ensayos de precisión se realizaron para títulos de ATG₂ de 1:9200, 1:4800 y 1:3200. La precisiones intra- e inter-ensayo se evaluaron mediante análisis múltiple (n = 3) en un día de ensayo y análisis en tres corridas analíticas diferentes, respectivamente. Las condiciones experimentales para este ensayo fueron 0,75 mg mL⁻¹ de PM-TG₂ y 1:20000 de antiIgG cabra-HRP.

Para evaluar el efecto matriz, se construyeron curvas de calibración para títulos de ATG₂ en el intervalo desde 1:20000 a 1:1500 en solución tampón de fosfato 0,01 M, 0,15 M NaCl, pH 7,4 (PBS), plasma y suero negativos diluidos 1:25.

MATERIALES Y METODOS

Luego, los ensayos de recuperación se realizaron para tres títulos de ATG₂ (1:5110, 1:3540 y 1:2000) adicionados en suero y plasma negativos diluidos 1:25.

4.4.6. Ensayos serológicos

Las muestras y el procesamiento de las mismas fue igual al detallado en la sección 4.3.6, utilizando en este caso el magneto inmunosensor electroquímico en las condiciones experimentales optimizadas previamente.

4.5. MAGNETOS INMUNOSENSORES ELECTROQUIMICOS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG₂ Y ANTI-PDG EN ENFERMOS CELIACOS

4.5.1. Reactivos y soluciones

PM de 1 µm de diámetro modificadas con grupos tosilo (*Dynabeads MyOneTM Tosylactivated*) se adquirieron en Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norway). GenScript sintetizó los péptidos deaminados de gliadina (PDG) (99,2% pureza) mientras que la TG₂ (2 U, cat n°. Too6) se adquirió en Zerida (Alemania). TG₂ se preparó en agua deionizada a 8,06 mg mL⁻¹, se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20°C. Los anticuerpos desarrollados en cabra antiIgG de humana rotulado con HRP (antiIgG humana-HRP) (cat. n° 55226) y antiIgA humana-HRP (cat. n° A0295) se adquirieron en MP Biomedicals (EE.UU.) y Sigma-Aldrich, respectivamente. Ianus s.a. suministró el ensayo ELISA comercial anti-TG₂/anti-PDG (INOVA). Todos los reactivos de grado analítico se adquirieron de Sigma.

En el desarrollo del inmunosensor para detectar APDG se utilizaron PM tosilo y PM específicas para unir péptidos, mientras que sólo las PM tosilo se usaron en el inmunosensor para ATG₂. Los procedimientos de inmovilización se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. Luego de las inmovilizaciones, las soluciones concentradas finales de PM-TG₂ o PM-PDG fueron 25 mg mL⁻¹ o 4 mg mL⁻¹, respectivamente.

4.5.2. Instrumental

La inmovilización de las PDG sobre las PM se llevó a cabo usando un Termomixer Eppendorf. Se utilizaron placas ELISA de poliestireno marca Nunc (Cat. no. 269787, Roskilde, DK). La separación magnética de las partículas se realizó mediante un separador magnético Dynal MPC-S (Product no. 120.20D, Dynal, Norway). En las etapas de incubaciones y lavados se utilizaron un Miniagitador MS1

MATERIALES Y METODOS

(IKA, Germany) y un Termomixer Eppendorf. Las medidas ópticas y electroquímicas se realizaron con un lector de placas TECAN Sunrise y con un controlador amperométrico LC-4C (BAS Bioanalytical System Inc., E.E.U.U.). Un sistema de tres electrodos constituido por un electrodo auxiliar de platino (Crison 52-67 1), un electrodo de referencia Ag/AgCl (Orion 900200) con 0,1 M KCl como solución de referencia externa y un electrodo de trabajo renovable y rígido m-GEC ampliamente descrito en aplicaciones de inmunosensores electroquímicos y genesensores (Pividori y Alegret, 2005; Zacco y col., 2006; Pividori y col., 2007;). Antes de cada uso, una etapa de pulido se aplicó a la superficie de los electrodos m-GEC.

4.5.3. Inmunoensayos para la detección de anti-TG2 y anti-PDG

Para la detección de ATG2-IgA se diseñó un magneto inmunosensor electroquímico, cuyo protocolo se esquematiza en la **Figura 4.6**.

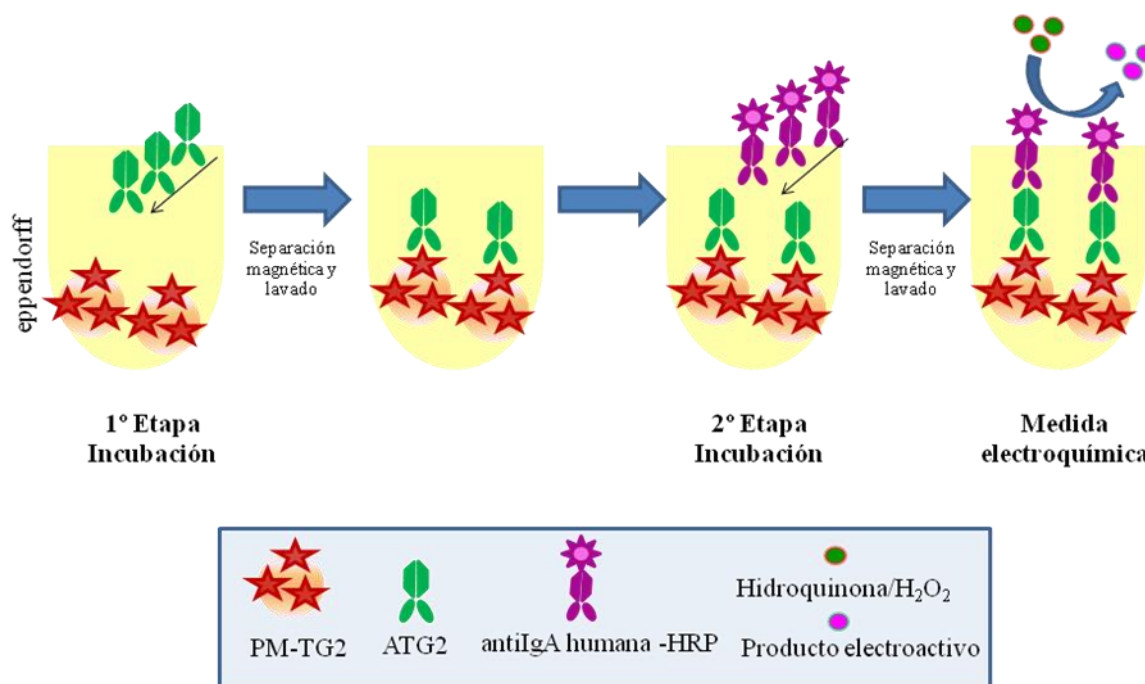


Figura 4.6. Esquema del protocolo del magneto inmunosensor electroquímico destinado a la detección de ATG2.

El ensayo se realizó en tubos Eppendorff de 2 mL en tres pasos: (i) Primer etapa de incubación: 70 μ L de una solución de 1,0 mg mL⁻¹ PM-TG2 se incubaron con 70 μ L de los controles positivo y negativo a 800 rpm y 25°C durante 30 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante con la ayuda de un separador magnético y se realizaron tres etapas de lavado con 100 μ L de PBST a 800 rpm y 25°C durante 3 minutos, aplicando el separador magnético después de cada etapa. (ii) Segunda etapa de incubación: se adicionaron 140 μ L de antiIgA humana-HRP diluido 1:20000 y se incubaron a 800 rpm

MATERIALES Y METODOS

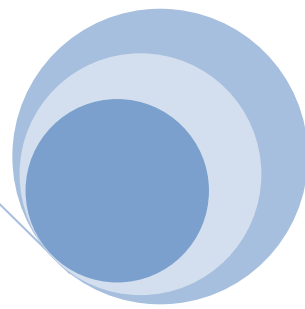
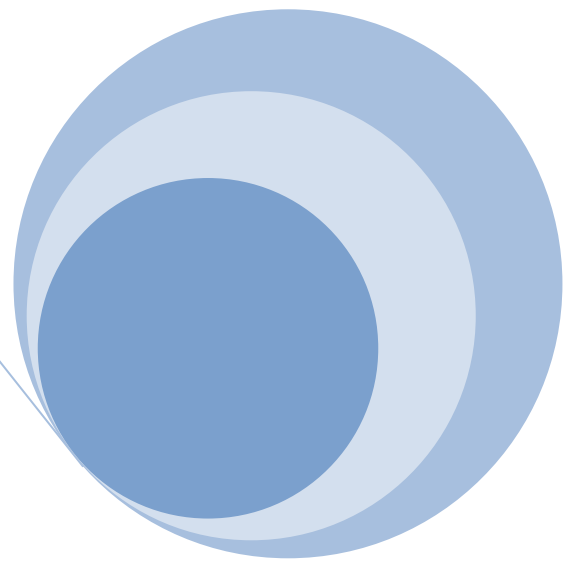
y 25°C durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicaron las etapas de lavado de igual manera que en el paso (i). (iii) Medida electroquímica: en la última etapa de lavado se capturaron las PM modificadas mediante los electrodos m-GEC y este electrodo de trabajo junto con los electrodos de referencia y auxiliar se sumergieron en 20 mL de PBS contenido en una celda electroquímica. La medida electroquímica se determinó por polarización del electrodo de trabajo a $E = -0,050$ V (contra Ag/AgCl en solución 3 mol L^{-1} de NaCl como electrodo de referencia). La señal amperométrica se basó en la actividad enzimática de HRP después de la adición de hidroquinona ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) como mediador y H_2O_2 ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) como sustrato.

Para la detección de ADGP tanto del isotipo IgA como IgG se desarrollaron magnetos inmunosensores electroquímicos y ELISA, siendo los detalles de los protocolos reservados por los autores debido a que se encuentra en trámite de patentamiento.

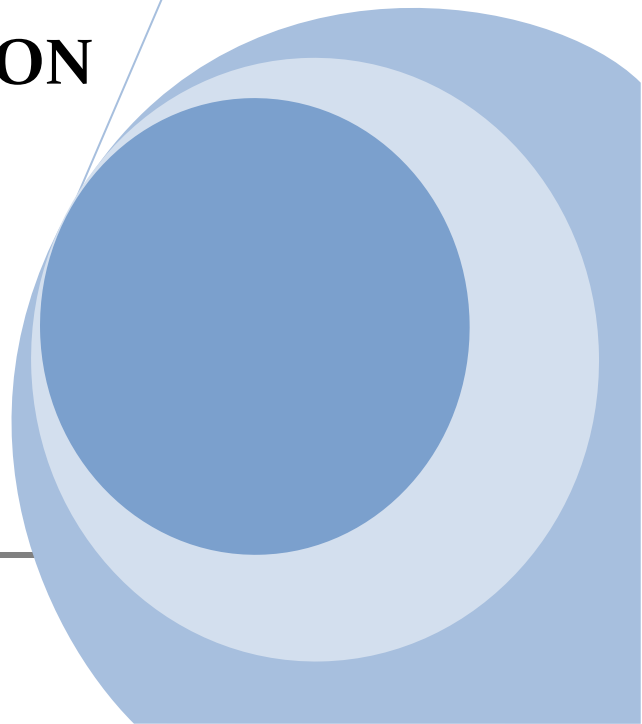
4.5.4. Ensayos serológicos

A través de un convenio existente entre el Grupo de Sensores y Biosensores de la Universidad Autónoma de Barcelona (España) y una empresa financiadora de proyectos para el desarrollo de tecnologías innovadoras, se pudo disponer de 70 sueros provenientes de hospitales españoles. Los mismos comprendían a 42 casos positivos y 28 negativos hacia la enfermedad celíaca. De la totalidad de los sueros recibidos, sólo se informaba que 23 de los mismos habían sido confirmados histológicamente con biopsia duodenal, de los cuales, a su vez, 13 y 10 sueros fueron clasificados como celíacos y no celíacos, respectivamente.

Los 70 sueros se analizaron mediante los magnetos inmunosensores electroquímicos destinados a la detección individual de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2-IgA. El procedimiento seguido para las muestras fue similar al descrito en la sección 4.3.6.



5. RESULTADOS Y DISCUSION



RESULTADOS y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. EVALUACION DE SIETE COSUSTRATOS EN LA CUANTIFICACION DE LA ENZIMA PEROXIDASA POR VOLTAMETRIA DE ONDA CUADRADA

En esta sección se propone evaluar la reacción enzimática de HRP frente a H_2O_2 como sustrato y siete cosustratos diferentes, con la finalidad de seleccionar el sistema que presente las mejores características en la detección electroquímica, para ser utilizado como sistema de revelación en los diferentes ensayos de bioafinidad planteados en esta tesis.

5.1.1. Comportamiento electroquímico de los cosustratos

En muchos inmunoensayos, las enzimas HRP y fosfatasa alcalina son utilizadas como rótulos o marcas en los sistemas de revelación. HRP es ideal para estas aplicaciones debido a que es más pequeña, estable y económica que la fosfatasa alcalina. Además, tiene una alta velocidad de recambio lo cual genera grandes cantidades de producto, traduciéndose en una elevada señal analítica en un tiempo reducido (Azevedo y col., 2003). La reacción enzimática de HRP sigue un mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento (Veitch, 2004; Lai y col., 2006; Zacco y col., 2006; Shivakumar y col., 2010). En la primera etapa, una molécula de peróxido se une a un sitio de coordinación libre del hierro (Fe^{III}) en la HRP y se reduce a agua en un proceso rápido de dos electrones, por lo cual el compuesto I es generado como un intermediario primario estable. El compuesto I es la especie oxiferril ($(Fe^{IV} = O)P^*$), constituido por un átomo de oxígeno proveniente de la molécula de peróxido, un electrón del hierro y otro electrón del grupo hemo para generar el catión radical porfirina π . En la próxima etapa, el catión radical porfirina π es reducido por una molécula del cosustrato (en su especie reducida) a la especie del compuesto II ($(Fe^{IV} = O)P$) el cual es posteriormente reducido por otra molécula del cosustrato (en su especie reducida), regenerando así a la enzima nativa (Fe^{III}). Posteriormente, las dos moléculas de cosustrato oxidado obtenidas en la reacción enzimática pueden ser reducidas sobre la superficie del electrodo (**Figura 5.1a**). Las moléculas de cosustrato pueden ser aminas aromáticas, fenoles, hexacianoferratos, ascorbatos y yodo (Marko-Varga y col., 1995; Reviejo y Pingarron, 2000; Gorton, 2005). Algunos ejemplos de cosustratos donadores de electrones son los

RESULTADOS y DISCUSION

fenoles (Alemzadeh y Nejati, 2009), OPD (Jiau y col., 2000; Bilal y Holze, 2006), TMB (He y col., 1997; Fanjul-Bolado y col., 2005; Conneely y col., 2007), hidroquinona (Zwirtes de Oliveira y Cruz Vieira, 2006; Zhang y Zheng, 2007), p-clorofenol (Gomez y col., 2009), pirocatecol (Korkut y col., 2008) y p-aminofenol (Sun y col., 2001) (**Figura 5.1b**).

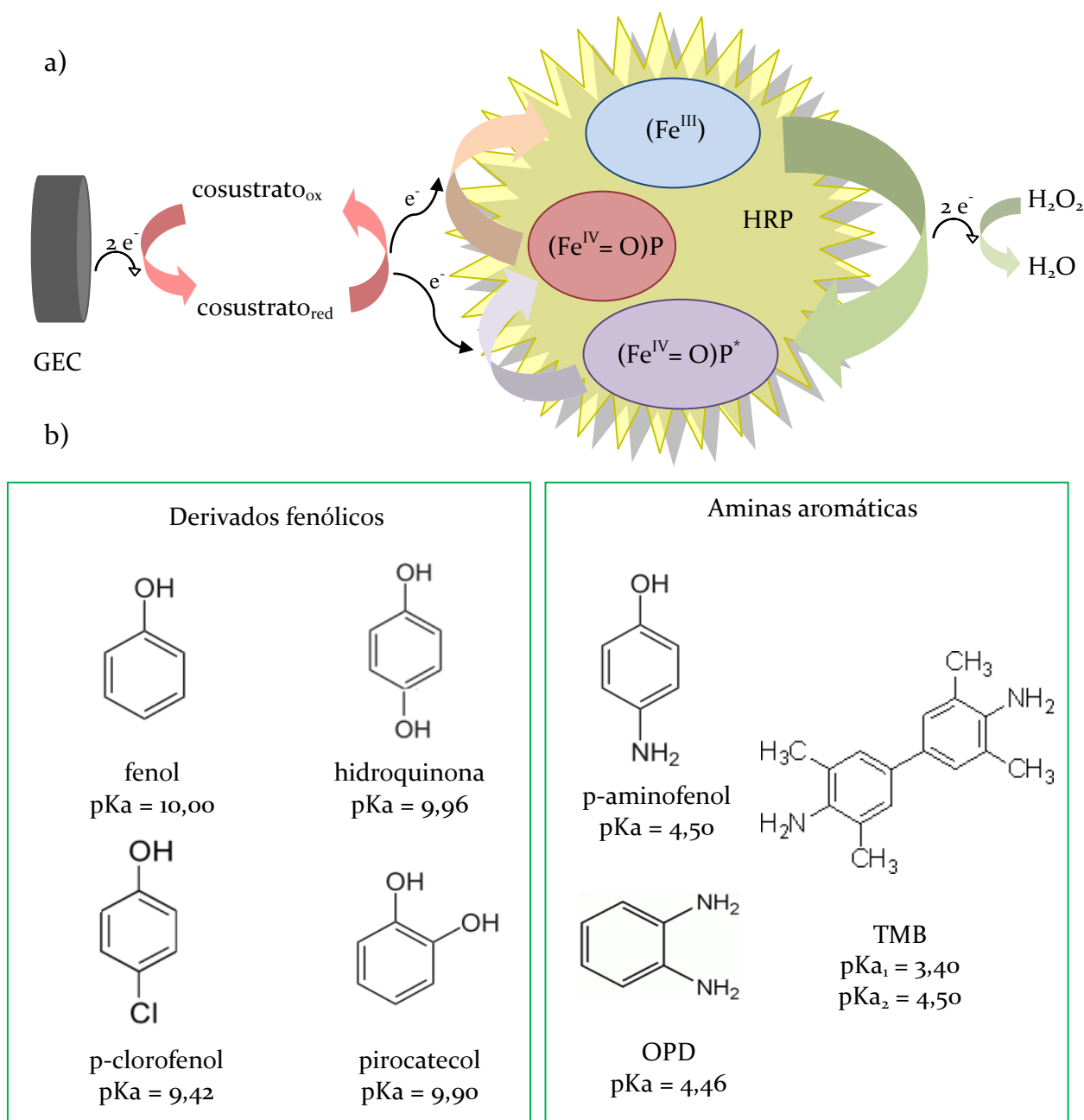


Figura 5.1. (a) Mecanismo enzimático de HRP sobre la superficie del electrodo, y (b) Estructuras químicas de los cosustratos de HRP.

Como es bien documentado en bibliografía, los métodos de rutina para la determinación de la actividad de HRP involucran técnicas fluorimétricas y colorimétricas. En las últimas décadas, la utilización de dispositivos electroquímicos busca la miniaturización y la generación de prototipos

RESULTADOS y DISCUSION

potencialmente automáticos, con mayor sensibilidad y señales analíticas más rápidas. Estos dispositivos electroquímicos son potencialmente útiles en la determinación de analitos de diferentes naturalezas.

En primer lugar, se caracterizaron electroquímicamente siete cosustratos de HRP (fenol, OPD, TMB, hidroquinona, p-clorofenol, pirocatecol y p-aminofenol) mediante voltametría cíclica. Esta caracterización permitió conocer el comportamiento electroquímico de cada uno de ellos, para su posterior implementación en los sistemas de revelación. En las voltametrías cíclicas se registraron los potenciales de reducción y oxidación con sus correspondientes intensidades de corrientes. Las separaciones entre los potenciales de los picos de oxidación y reducción fueron mayores que 0,059 V/n en todos los casos, evidenciando que la transferencia electródica de los mismos fue más lenta que el valor establecido teóricamente para un cosustrato ideal. Además, la relación de corrientes entre los picos de reducción y oxidación fueron menores a 0,1 para fenol, OPD y p-clorofenol y fueron cercanos a 1 para hidroquinona, TMB, pirocatecol y p-aminofenol (ver **Tabla 4.1**). Por lo tanto, estos compuestos se clasificaron como sistemas cuasi-irreversible y cuasi-reversible considerando las condiciones experimentales, la naturaleza del electrodo de trabajo y los comportamientos electroquímicos observados, cuando las relaciones de corrientes fueron menores a 0,1 y cercanas a 1, respectivamente (Wang, 2001).

Posteriormente, con la finalidad de seleccionar la técnica electroquímica más sensible en la determinación de la actividad de HRP frente a H_2O_2 y los siete cosustratos se evaluaron la amperometría y la VOC. Para seleccionar el E aplicado en amperometría, la voltametría hidrodinámica se realizó para cada sistema enzimático con agitación. Las voltametrías hidrodinámicas y los E que causan la máxima señal electroquímica son mostrados en la **Figura 5.2**. Los E de 200, -125, -350, -210, -50, 50 y 50 mV se seleccionaron como E aplicados en el análisis amperométrico para los sistemas de fenol, OPD, p-clorofenol, hidroquinona, pirocatecol, TMB y p-aminofenol, respectivamente. Los sistemas con OPD, pirocatecol, TMB y p-aminofenol como cosustratos, cuyos E están cercanos a cero podrían ser los más ventajosos para las futuras aplicaciones, ya que ellos tendrían menos probabilidad de interferencias electroquímicas. La **Figura 5.3** muestra los voltamogramas para cada sistema enzimático mediante VOC, cuyos E de reducción se desplazaron hacia la derecha con respecto a los E obtenidos en voltametría cíclica. Además, se muestra el análisis amperométrico para TMB. Los picos de IC catódica de 265, -140, -280, -150, 50 y 100 mV se seleccionaron como señales electroquímicas para los sistemas con fenol, OPD, p-clorofenol, hidroquinona, pirocatecol y p-aminofenol como cosustrato, respectivamente.

RESULTADOS y DISCUSION

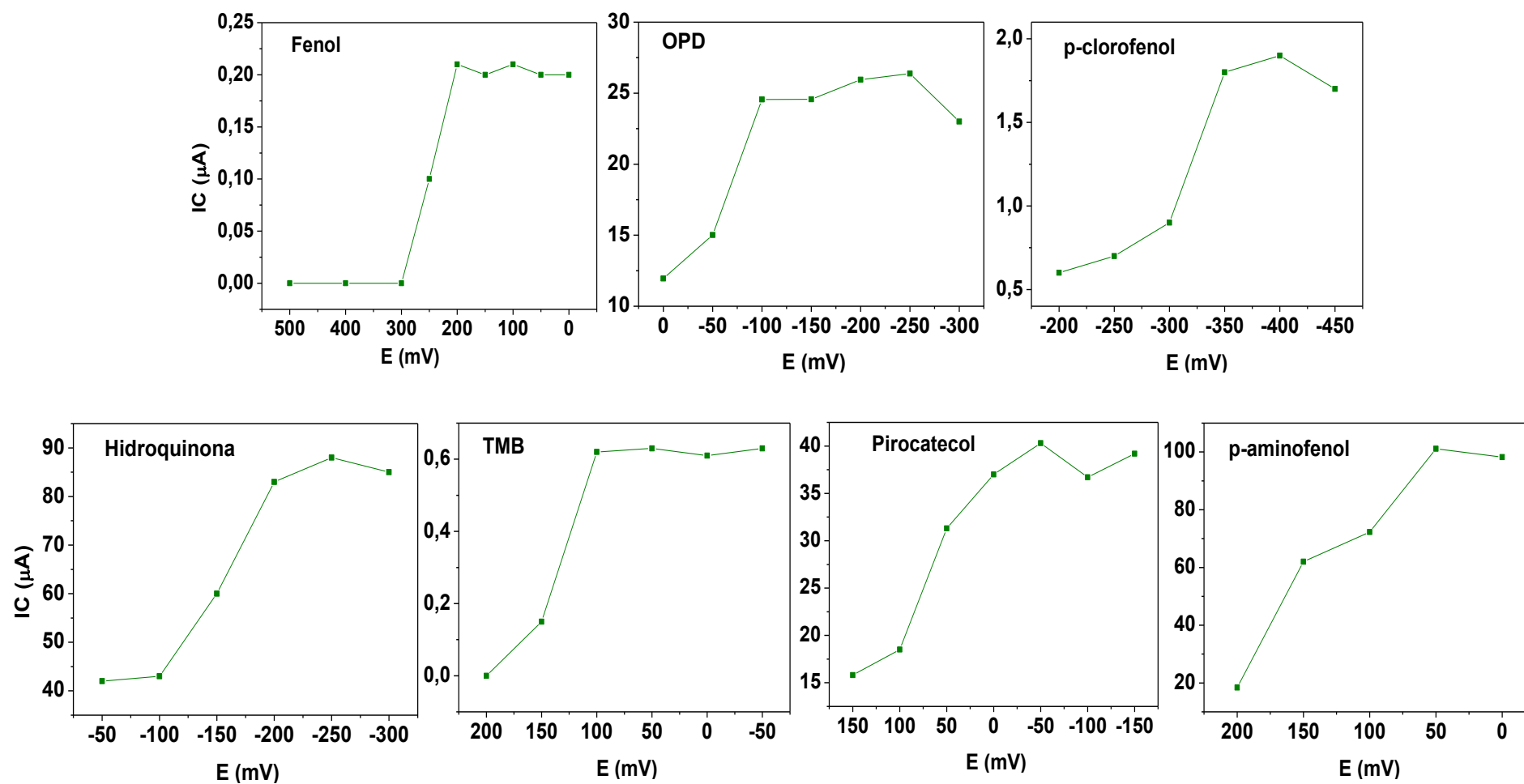


Figura 5.2. Voltametría Hidrodinámica. En la **Tabla 4.1** se muestran las condiciones experimentales para los siete sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 .

RESULTADOS y DISCUSION

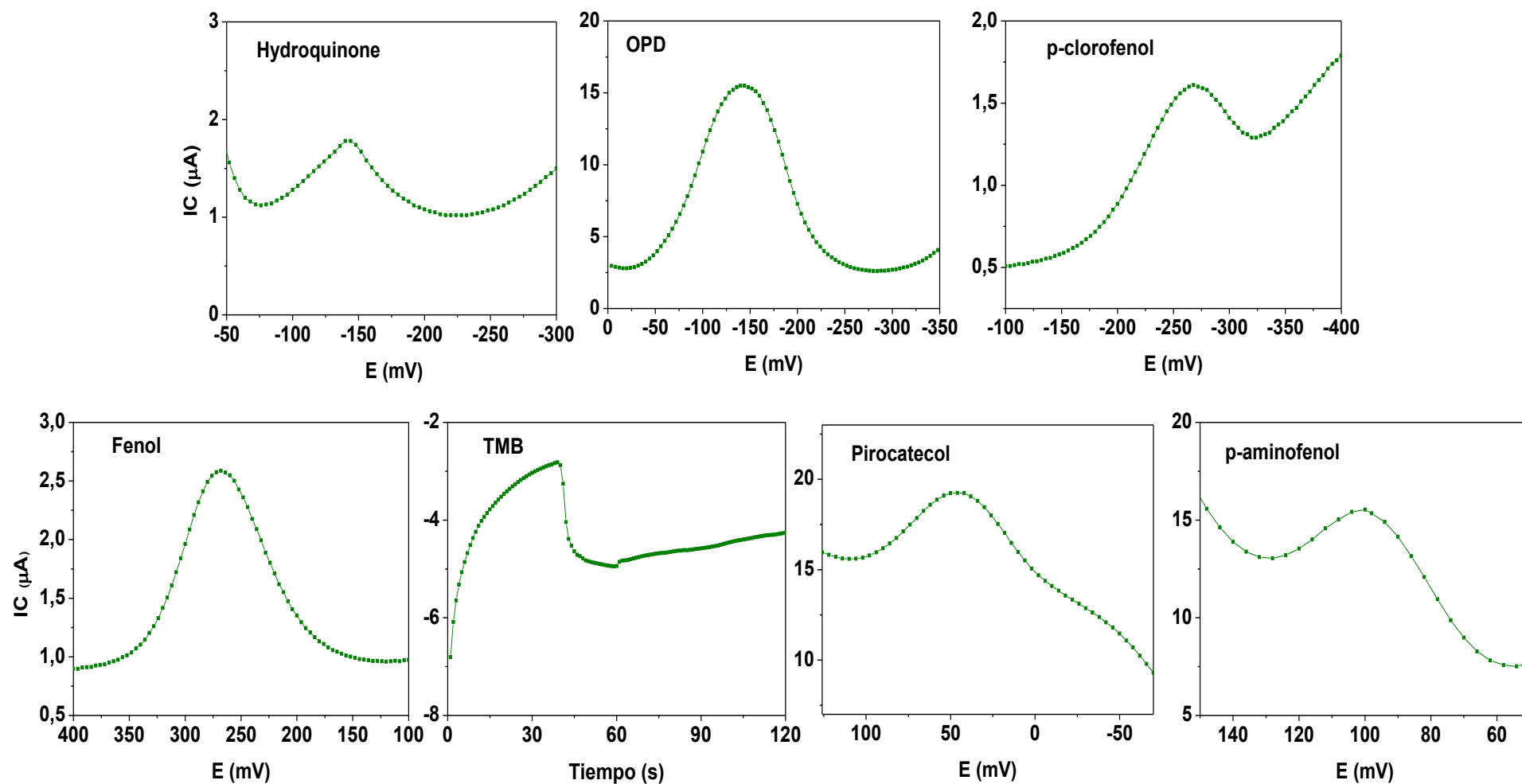


Figura 5.3. Voltametría de onda cuadrada y amperometría. En la **Tabla 4.1** se muestran las condiciones experimentales para los siete sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 .

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Todos los cosustratos presentaron voltamogramas típicos con picos bien definidos en VOC excepto TMB, debido a que su forma oxidada se generaba en el E inicial de la VOC y como consecuencia se obtenía una corriente de reducción indeseada. Por lo tanto, la amperometría fue la única técnica de detección electroquímica aplicada para el sistema con TMB como cosustrato.

5.1.2. Optimización de las condiciones experimentales

La optimización de un sistema analítico busca mejorar su rendimiento para obtener la máxima respuesta, con economía de recursos. Tradicionalmente, la optimización de una respuesta experimental en química analítica se lleva a cabo con el análisis de un factor a la vez. En este caso, un parámetro o factor es cambiado mientras los otros están a un nivel constante. Esta técnica de optimización es llamada optimización de una variable a la vez o de un factor. Su mayor desventaja es que no incluyen efectos por interacción entre los factores estudiados, por lo tanto, estas técnicas no describen los efectos completos de los parámetros sobre la respuesta. Otra desventaja es el incremento en el número de ensayos, lo cual causa incremento en el tiempo y consumo de reactivos. Además, estas condiciones de trabajo pre-seleccionadas pueden estar distantes de las “condiciones óptimas” en el sistema. Para solucionar este problema, las técnicas estadísticas multivariadas pueden ser usadas en la optimización de procedimientos analíticos, siendo una de las más importantes la MSR (Saleh y col., 1984; Bezerra y col., 2008). La MSR, un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útil en la optimización sistemática, es usada para explorar, analizar y optimizar un sistema cuya respuesta depende de diversos factores. Antes de aplicar la MSR, la selección de un diseño experimental debería ser llevado a cabo para definir los ensayos en la región experimental estudiada. El DCC es ampliamente utilizado en la construcción y estimación de superficies de respuesta (Faguet y col., 1977; Sendall y col., 1983; Loeffler y Ebey, 1989).

A continuación, la evaluación de la secuencia de adición de sustratos, el tiempo de reacción, la relación cosustrato:H₂O₂ y la técnica electroquímica se analizaron mediante optimización de un factor, mientras que el pH de la solución tampón, la actividad enzimática y las concentraciones de los cosustratos y H₂O₂ para cada sistema se seleccionaron, simultáneamente, mediante la metodología de superficie respuesta.

Primero, para seleccionar la secuencia de adición que garantice una señal electroquímica máxima a los 3 minutos de reacción, los ensayos se realizaron en dos secuencias siendo primero adicionado el cosustrato y posteriormente el H₂O₂, y viceversa. Según la bibliografía, la unión entre la enzima y sus sustratos proceden de forma aleatoria y no es necesario que el peróxido se una a la enzima antes de que esta se una al cosustrato (Cuadrado y col., 2012). Estos ensayos demostraron que el orden de adición cosustrato-H₂O₂ producía la señal electroquímica máxima para todos los

RESULTADOS y DISCUSION

cosustratos, excepto para aquel con la molécula más simple, es decir el fenol. Esto sugiere que los cosustratos con las moléculas más complejas que el H_2O_2 y el fenol serían los reactivos limitantes en la generación de un gradiente de difusión apropiado para originar la reacción enzimática.

Segundo, para seleccionar el tiempo de reacción, el cual es el tiempo de muestreo de la señal electroquímica, se realizó un estudio cinético para cada sistema mediante VOC. La **Figura 5.4** muestra las respuestas cinéticas del sistema cuyo cosustrato fue hidroquinona. Un primer intervalo de 10 ciclos se realizó desde 0 a 10 min y debido a que al minuto se obtuvo la señal máxima, se evaluó un segundo intervalo desde 0 a 3 min, registrando las señales electroquímicas cada 20 s (ver inserto en la **Figura 5.4**).

Como se puede observar, se alcanza una densidad de corriente máxima a los 20 s y luego la

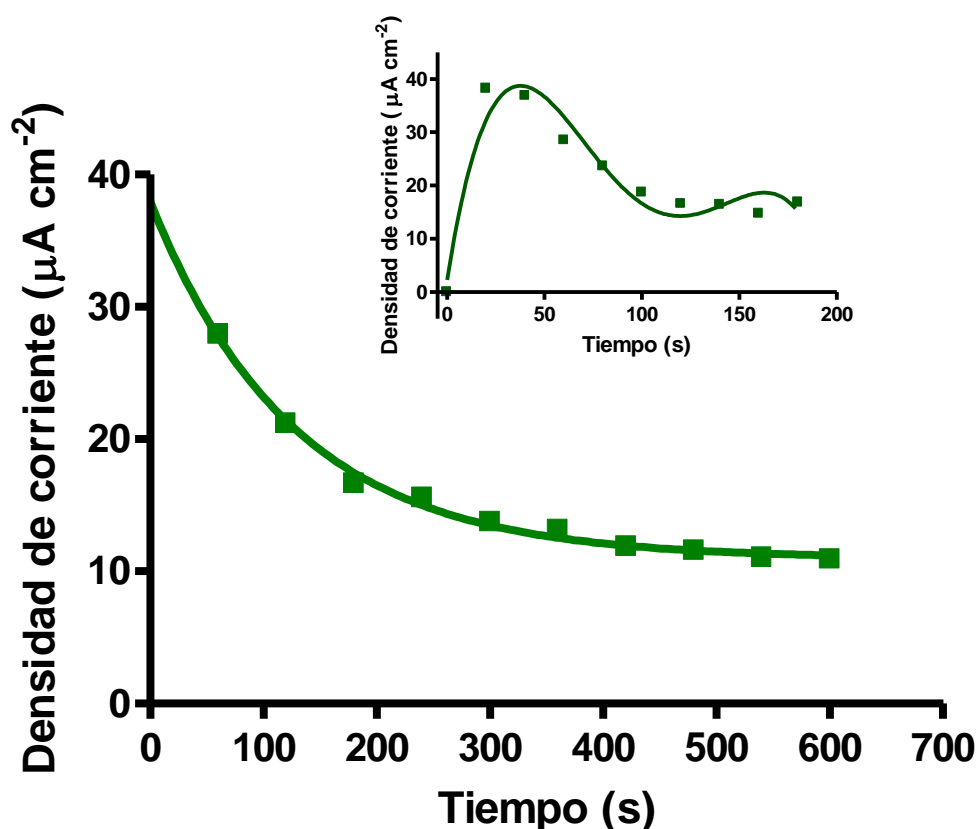


Figura 5.4. Estudios cinéticos de la reacción enzimática con hidroquinona- H_2O_2 como sustratos. El gráfico de la densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) obtenido por VOC en función del tiempo de reacción (s) para $1,9 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} de HRP, 2×10^{-3} mol L^{-1} de hidroquinona, 2×10^{-3} mol L^{-1} de H_2O_2 y solución tampón de fosfato $0,1$ mol L^{-1} y KCl $0,1$ mol L^{-1} , pH 7,50 como medio de reacción. Primero, se evaluaron 10 ciclos consecutivos cada 60 s durante 10 min. En el gráfico inserto, se recolectó la señal electroquímica cada 20 s durante 3 min.

RESULTADOS y DISCUSION

respuesta comienza a disminuir. Este efecto pudo ser observado en todos los cosustratos evaluados, por lo cual, se puede deducir que estos compuestos se van depositando sobre la superficie del electrodo, causando el pasivamiento de la señal electroquímica. Un comportamiento cinético contrastante pudo ser observado entre los compuestos estudiados (ver los tiempos seleccionados para cada sistema en la **Tabla 5.1**), ya que los sistemas con hidroquinona y p-aminofenol como cosustratos fueron los más rápidos (20 s), mientras los sistemas con fenol y pirocatecol necesitaron un tiempo mayor de reacción (300 s). Para los otros sistemas, los tiempos de reacción variaron entre 40 y 60 s.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.1. Resultados del DCC y las respuestas obtenidas experimentalmente para cada sistema

Sistemas	Tiempo de reacción (s)	Condiciones óptimas				DG	Respuesta predicha ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Respuesta obtenida ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
		Factores ^a						
		A	B	C	D			
HRP-H ₂ O ₂ -fenol	300	7,5	38	0,5	5,0	0,83	22,5	[26 ± 4] n = 3
HRP-OPD-H ₂ O ₂	60	6,0	38	2,5	6,0	0,81	295	[305 ± 60] n = 4
HRP-p-clorofenol-H ₂ O ₂	40	6,0	19	2,0	2,0	0,86	27,5	[30 ± 4] n = 4
HRP-hidroquinona-H ₂ O ₂	20	7,5	38	5,0	2,5	0,73	350	[360 ± 70] n = 3
HRP-TMB-H ₂ O ₂	40	6,0	38	2,0	4,0	0,62	12,8	[13 ± 2] n = 3
HRP-pirocatecol-H ₂ O ₂	300	6,0	9,5	2,0	2,0	0,97	102	[105 ± 10] n = 4
HRP-p-aminofenol-H ₂ O ₂	20	5,0	9,5	2,0	5,0	0,96	27,8	[31 ± 2] n = 3

^a Factores: A = pH de la solución tampón; B = concentración enzimática en 10^{-9} (mol L⁻¹); C = concentración de cosustrato en 10^{-3} (mol L⁻¹); D = concentración de H₂O₂ en 10^{-3} (mol L⁻¹).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tercero, con la finalidad de optimizar la respuesta enzimática acoplada a la detección electroquímica se seleccionaron las combinaciones óptimas de los factores experimentales para los siete sistemas. Los factores estudiados fueron el pH de la solución tampón, la concentración enzimática, la concentración de los cosustratos y la concentración del H_2O_2 . Por lo tanto, se realizó un DCC de 30 ensayos con seis puntos centrales. Este diseño es frecuentemente usado como herramienta útil para reducir el número de ensayos y para permitir delimitar los intervalos de trabajo de cada factor. En este diseño, se evaluaron amplios intervalos de concentraciones de los sustratos y cosustratos para determinar las cinéticas de la reacción catalizada por la enzima. Se aplicó un ANOVA a cada sistema HRP-cosustrato- H_2O_2 , esperando obtener un modelo ajustado significativamente y una falta de ajuste no significativa (P debería ser menor y mayor a 0,05, respectivamente). Después de obtener el modelo ajustado, se debe seleccionar la combinación de factores que provee el mejor “valor de respuesta deseable”. En la etapa de optimización, se buscó obtener la respuesta electroquímica máxima, ya que ésta se relaciona directamente con la concentración enzimática. Para lo cual, las concentraciones de los sustratos debían estar presentes en exceso, es decir la reacción debía ser independiente de las concentraciones de los sustratos (cinética de reacción de orden cero). La función de deseabilidad global (DG), calculada a partir de los criterios de importancia y peso para todos los factores y respuestas, toma valores desde 0 (donde las combinaciones no cumplen los requerimientos solicitados) y 1 (donde todas las respuestas tienen un valor de deseabilidad simultánea) (Myers y Montgomery, 1995). La **Tabla 5.1** muestra la función de deseabilidad global, la repuesta predicha y la respuesta obtenida experimentalmente para cada sistema. Al analizar las respuestas experimentales y predichas mediante un ensayo de comparación de medias, se obtuvo que, en todos los casos, no se observaban diferencias significativas entre las medias de ambas respuestas ($P > 0,05$) (Miller y Miller, 1993; Massart y col., 2003). En este contexto, la función de deseabilidad global puede ser considerada como una medida de eficiencia conjunta de la actividad enzimática y la transferencia electroquímica. Los valores porcentuales de la función de deseabilidad global mayores que 70 se obtuvieron en todos los sistemas enzimáticos, excepto para el sistema con TMB como cosustrato y detección amperométrica (DG = 62%). Suponemos que el bajo rendimiento analítico se podría deber a la técnica de detección de menor sensibilidad usada para este sistema y a la estructura molecular compleja de TMB, la cual podría retardar la transferencia electródica dentro del sitio activo de la enzima mediante impedimento estérico. Los valores óptimos de los factores para cada sistema son también mostrados en la **Tabla 5.1**. Los pH de las soluciones tampones estuvieron comprendidos entre 5,0 y 7,5. Fenol, p-clorofenol, pirocatecol e hidroquinona tienen sus pK_a mayores a 7,5; mientras OPD, p-aminofenol y TMB tienen sus pK_a menores a 5,0. Esto sugiere que la enzima tendría mayor afinidad por las aminas aromáticas no-cargadas y los

 RESULTADOS y DISCUSION

compuestos fenólicos. Además, estos intervalos de pH favorecerían la reducción de los productos de la reacción enzimática en la superficie del electrodo.

Cuarto, a pesar de que existe mucha información sobre HRP como sistema de revelación de los inmunoensayos, hay una gran discrepancia en cuanto a la relación que debe existir entre las concentraciones de H_2O_2 y cosustrato, especialmente para los sistemas de detección electroquímicos. Por ejemplo, para el cosustrato más ampliamente usado, TMB, las relaciones TMB: H_2O_2 fueron 1:1 ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); 2:1 ($2,5: 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); 1:2 ($2: 4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); 1,5:1 ($4,2: 2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) acorde a las respectivas referencias (Sardy y col., 2007; Yuzhen y col., 2009; Hong-Xu y col., 2009; Wouters y col., 2009). Teniendo en cuenta lo anteriormente citado, se decidió ajustar los resultados de relación cosustrato: H_2O_2 obtenidos mediante el DCC evitando la inactivación enzimática. Se debe tener en cuenta, que el peróxido de hidrógeno a altas concentraciones es un sustrato suicida, el cual convierte las especies del compuesto II ($(Fe_{IV} = O)P$) a radicales libres peróxido altamente reactivos (Fe_{III} -porfirina), llamado compuesto III. Cuando otra molécula del peróxido de hidrógeno reacciona con este radical libre, un radical hidróxido es producido, el cual puede atacar a la estructura tetrapirrol del grupo hemo produciendo la inactivación irreversible de la hemoenzima (Torres y col., 2003). Este riesgo es mayor cuando la concentración del cosustrato es mucho menor que la concentración del peróxido de hidrógeno. En consecuencia, se seleccionó la máxima respuesta enzimática para cada sistema en la región de saturación enzimática. Para ello, las relaciones cosustrato: H_2O_2 se evaluaron en el intervalo 1:10 y 10:1 mientras las concentraciones enzimáticas y los pH de las soluciones tampones se mantuvieron constantes en los valores óptimos obtenidos en el DCC. La relación cosustrato: H_2O_2 elegida para los sistemas con fenol, OPD y pirocatecol como cosustratos fue de 2:1, mientras que para los sistemas con cosustratos para-sustituidos (hidroquinona y p-aminofenol) fue de 1:1. Por otro lado, se obtienen las relaciones óptimas de 1:4 para los sistemas con TMB y p-clorofenol como cosustratos.

Quinto, a pesar de que la amperometría es la técnica electroquímica más frecuentemente utilizada en la detección de los productos de la reacción catalizada por HRP (Marko-Varga y col., 1995; Conneely y col., 2007; Zhang y Bin Zheng, 2007), las técnicas de pulso como las VPD y las VOC son altamente sensibles y veloces (Wang, 2001). Por ello, en este trabajo se evaluaron las respuestas electroquímicas de cada sistema HRP-cosustrato- H_2O_2 mediante amperometría y VOC. La **Figura 5.5** muestra las respuestas relativas (como densidad de corriente/concentración enzimática) en función de los sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 para cada técnica electroquímica.

RESULTADOS y DISCUSION

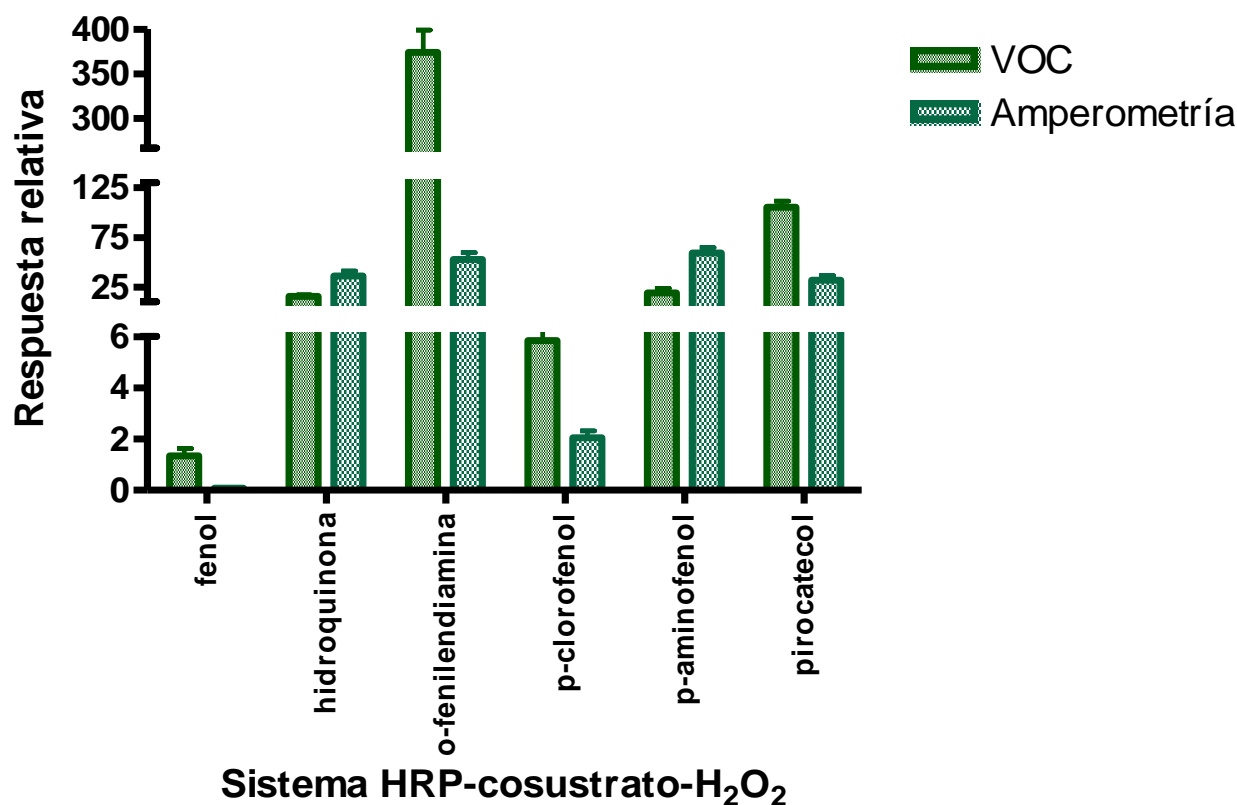


Figura 5.5. Gráfico de la respuesta relativa (densidad de corriente/concentración enzimática) en $\mu\text{A cm}^{-2}/10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ en función de los sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 para VOC y amperometría. Las condiciones de reacción para el sistema HRP-fenol- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{fenol}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 7,5; para el sistema HRP-OPD- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{OPD}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-p-clorofenol- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 1,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{p-clorofenol}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-hidroquinona- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{hidroquinona}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 7,5; para el sistema HRP-pirocatecol- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 9,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{pirocatecol}] = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a un pH de 6,0; para el sistema HRP-p-aminofenol- H_2O_2 fueron $[\text{HRP}] = 9,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{p-aminofenol}] = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \times 10^{-3}$ a un pH de 5,0. Para todos los sistemas la solución tampón fue fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. La desviación estándar se calculó para $n = 3$.

Estas respuestas relativas permiten la comparación de la sensibilidad de los sistemas, independientemente de la concentración enzimática. La sensibilidad depende de la naturaleza de los cosustratos donadores de electrones, la estabilidad de los compuestos radicales libres producidos en la reacción enzimática, el material del electrodo y los parámetros de la técnica electroquímica (E aplicado, barrido de E, etc.). Un compuesto radical libre es estabilizado por disipación de carga a través de su conjugación con la molécula; por lo tanto, es muy importante que los sustituyentes incrementen la densidad electrónica. Un compuesto radical libre estabilizado retarda las reacciones del proceso de polimerización o dismutación. Por otro lado, si la técnica de reducción no es lo

RESULTADOS y DISCUSION

suficientemente rápida, los compuestos radicales libres pueden polimerizar, causando la pasivación de la superficie del electrodo y la pérdida de sensibilidad. En la **Figura 5.5** se puede observar que para ambas técnicas, los sistemas con fenol y p-clorofenol como cosustratos presentaron las menores sensibilidades. Esto puede deberse a que las moléculas de estos cosustratos no tienen sustituyentes apropiados que estabilicen a los compuestos radicales libres y, en consecuencia, estos radicales inestables pueden generar compuestos no electroactivos que causarían una baja sensibilidad en la detección. Por otro lado, se obtuvieron similares rendimientos analíticos para los sistemas amperométricos con OPD y p-aminofenol como cosustratos. Además, estos sistemas fueron más sensibles que los que utilizan compuestos fenólicos substituidos con hidroxilos como cosustratos. Estos resultados estuvieron de acuerdo a lo informado en trabajos previos (Marko-Varga y col., 1995; Munteanu y col., 1998; Solna y col., 2005). El sistema HRP-OPD-H₂O₂ presentó la mayor respuesta, es decir, $375 \pm 25 \mu\text{A cm}^{-2} 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ mediante VOC y ésta fue aproximadamente cuatro veces más sensible que el próximo sistema (con pirocatecol como cosustrato). Por otro lado, este sistema mostró la mayor relación VOC/amperometría con un valor aproximado de 7, seguido del sistema con pirocatecol, fenol, p-clorofenol, hidroquinona y p-aminofenol, como cosustratos, respectivamente. La técnica de VOC fue más sensible que la amperometría en todos los casos, excepto para los sistemas con hidroquinona y p-aminofenol como cosustratos; probablemente debido a que la velocidad de la VOC no fue suficiente para evitar la pérdida de la sensibilidad por el envenenamiento o pasivación del electrodo a causa de una rápida polimerización y/o dimerización de estos compuestos. Para la mayoría de los sistemas, en las condiciones experimentales óptimas, la VOC fue la técnica más sensible y más rápida en comparación con la amperometría (aproximadamente seis veces más veloz). En consecuencia, la VOC fue seleccionada como técnica electroquímica para todos los sistemas excepto para aquel con TMB como cosustrato, que sólo pudo ser analizado mediante amperometría, como ya se explicó en la sección 5.1.1.

5.1.3. Determinación de las constantes aparentes de Michaelis

La V'_{max} y K'_m se calcularon para H₂O₂ y los cosustratos en cada sistema con el método de Lineweaver-Burk. Para ello, la recíproca de la concentración del cosustrato se graficó en función de la recíproca de la velocidad inicial. Esta velocidad se expresó como la concentración del cosustrato oxidado en el tiempo ($\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Debido a que el único cosustrato oxidado disponible comercialmente fue el de hidroquinona (p-benzoquinona), se realizaron curvas de calibración para p-benzoquinona e hidroquinona oxidada electroquímicamente en el intervalo de E desde -100 a 300 mV. Estas curvas mostraron sensibilidades analíticas similares (ver **Figura 5.6**).

RESULTADOS y DISCUSION

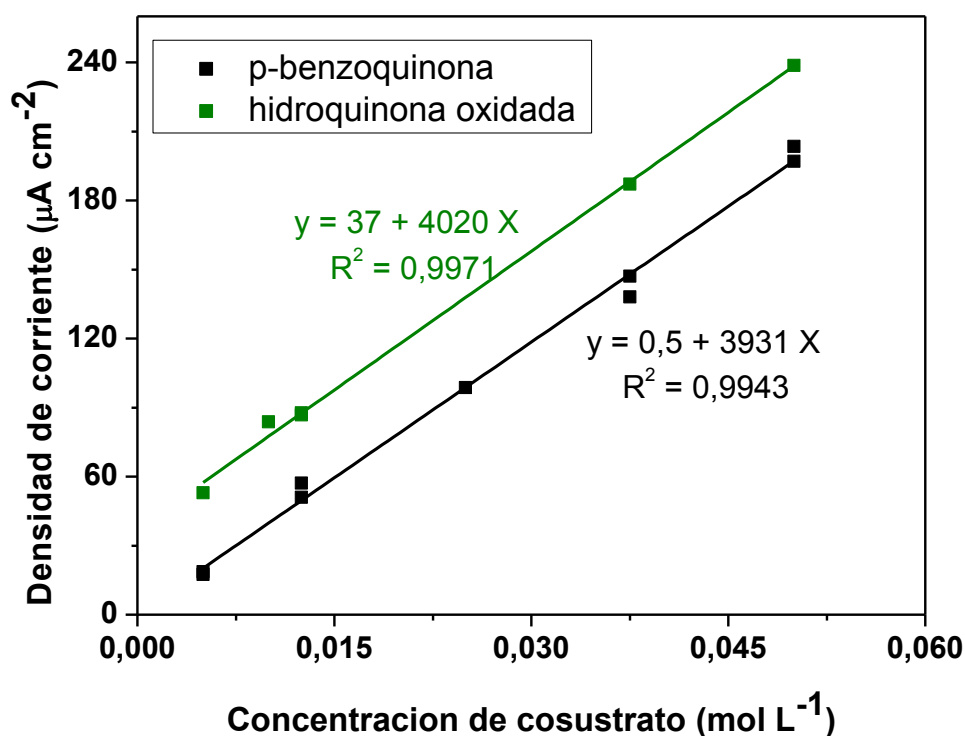


Figura 5.6. Curvas de calibración para el cosustrato oxidado comercial p-benzoquinona (negro) e hidroquinona oxidada electroquímicamente (verde oliva).

Consecuentemente, las curvas de calibración para los otros cosustratos cuyas formas oxidadas no estaban disponibles comercialmente se realizaron mediante la oxidación electroquímica (Figura 5.7). Las oxidaciones se lograron mediante barridos en VOC para todos los cosustratos, excepto para TMB que fue oxidado por amperometría al E de 350 mV. Los intervalos de E en VOC fueron desde 0 a 500 mV, desde 300 a 900 mV, desde -100 a 200 mV, desde 100 a 400 mV y desde 0 a 300 mV para OPD, fenol, p-clorofenol, pirocatecol y p-aminofenol, respectivamente.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

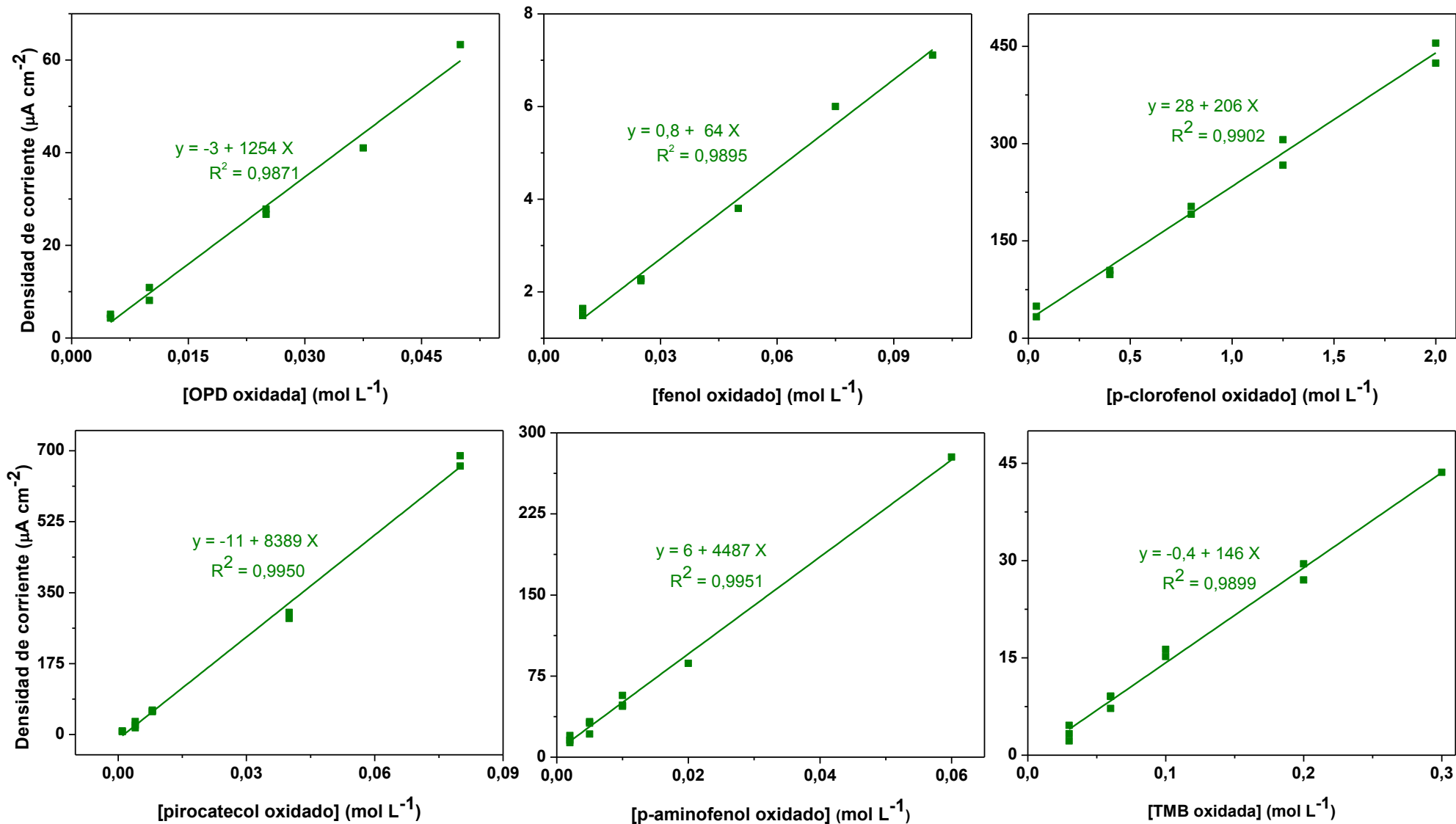


Figura 5.7. Curva de calibración de la respuesta electroquímica en función de la concentración de los cosustratos oxidados electroquímicamente.

La gráfica de la concentración de OPD en función de la velocidad inicial se muestra en la **Figura 5.8**. Primero, los parámetros cinéticos de OPD se ensayaron en el intervalo desde $0,6$ a $6,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} a 6×10^{-3} mol L^{-1} de concentración de H_2O_2 (**Figura 5.8a**). Segundo, se realizó un análisis similar para determinar los parámetros de H_2O_2 en el intervalo desde $0,5$ a 6×10^{-3} mol L^{-1} a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de concentración de OPD (**Figura 5.8b**).

RESULTADOS y DISCUSION

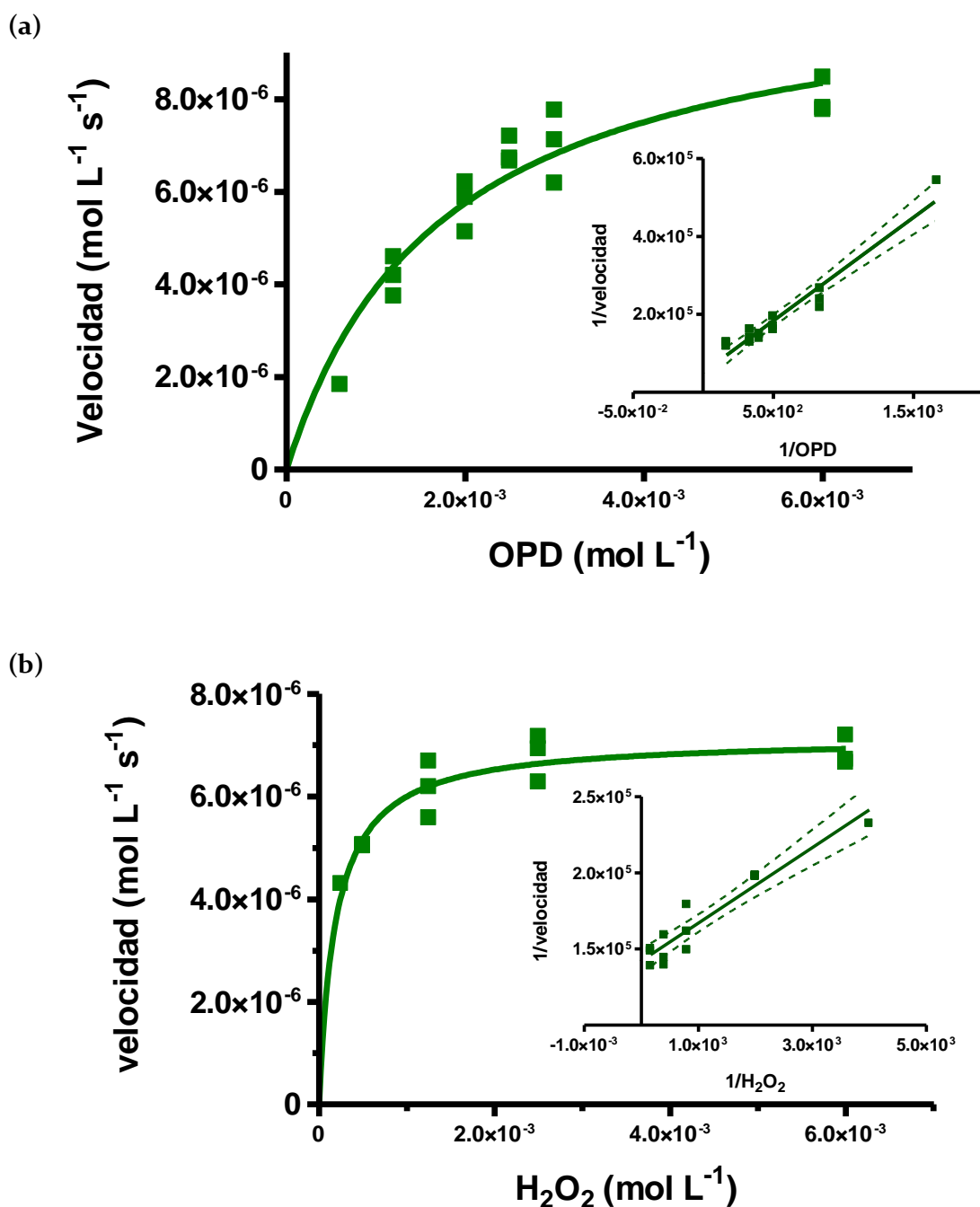


Figura 5.8. Curva cinética enzimática para el sistema HRP-OPD-H₂O₂ y gráfico recíproco de Lineweaver-Burk en el gráfico inserto. Condiciones de reacción: solución tampón de fosfato 0,1 mol L⁻¹ y KCl 0,1 mol L⁻¹ a pH de 6,0; concentración HRP = $3,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. (a) Concentración H₂O₂ constante = 6×10^{-3} mol L⁻¹; (b) concentración OPD constante = $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Los otros cosustratos fueron analizados similarmente. V'_{\max} , K'_m , K_{cat} y E para cada cosustrato y H₂O₂ en cada sistema enzimático se resumen en la **Tabla 5.2**. Recordando que un alto V'_{\max} y un bajo K'_m indican alta afinidad del cosustrato por la enzima y que el número de recambio se calcula como

 RESULTADOS y DISCUSION

$K_{cat} = V_{max}' / [enzima]$, la afinidad de los cosustratos evaluados por HRP disminuyen en el siguiente orden OPD > p-aminofenol > pirocatecol > fenol > TMB > hidroquinona. Por otro lado, las eficiencias catalíticas calculadas como $E = K_{cat}' / K_m$, disminuyen en la secuencia de OPD > p-aminofenol ~ pirocatecol > fenol > p-clorofenol ~ hidroquinona > TMB. Diferentes autores informaron una tendencia similar y parámetros cinéticos con órdenes de magnitud acorde a estos resultados (Zapata y col., 1998; Gomez y col., 2005; Bodalo y col., 2007; Shivakumar y col., 2011). Sin embargo, las ligeras diferencias entre los parámetros radican, principalmente, en que estos trabajos se realizaron mediante otras técnicas de detección en condiciones experimentales diferentes. Después de la evaluación, tanto de la afinidad como de la eficiencia para cada compuesto, OPD demostró las mejores características cinéticas y, por lo tanto, este fue considerado como el cosustrato más eficiente para HRP.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos de HRP con concentraciones variables de cosustratos a una concentración constante de H₂O₂ y concentraciones variables de H₂O₂ a concentraciones constantes de cosustratos

Sistemas	^a Cosustrato				^a H ₂ O ₂			
	V'max 10 ⁻⁶ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K'm 10 ⁻³ (mol L ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Ef 10 ⁴ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	V'max 10 ⁻⁶ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K'm 10 ⁻³ (mol L ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Ef 10 ⁴ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
HRP-H ₂ O ₂ -fenol	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	52 ± 2	2,7 ± 0,1	30,8 ± 0,5	0,031 ± 0,003	805 ± 40	2590 ± 700
HRP-OPD- H ₂ O ₂	12,0 ± 0,8	1,8 ± 0,3	313 ± 15	17,4 ± 0,8	7,7 ± 0,2	0,15 ± 0,02	200 ± 30	134 ± 25
HRP-p-clorofenol- H ₂ O ₂	2,5 ± 0,8	6,5 ± 0,9	260 ± 35	4,0 ± 0,3	8,1 ± 0,8	0,8 ± 0,1	845 ± 80	106 ± 36
HRP-hidroquinona- H ₂ O ₂	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2	37 ± 5	2,2 ± 0,6	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2	26 ± 3	2,4 ± 0,1
HRP-TMB- H ₂ O ₂	0,90 ± 0,06	0,05 ± 0,01	23 ± 4	47 ± 2	0,87 ± 0,06	0,7 ± 0,2	23 ± 5	3,2 ± 0,6
HRP- pirocatecol - H ₂ O ₂	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	146 ± 20	13,3 ± 0,9	0,70 ± 0,06	0,10 ± 0,08	73 ± 10	73 ± 20
HRP-p-aminofenol- H ₂ O ₂	1,6 ± 0,6	3,2 ± 0,4	42 ± 10	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,7	31 ± 8	2,1 ± 0,7

^a Las curvas recíprocas de Lineweaver-Burk fueron construidas para cinco concentraciones de cosustratos o H₂O₂ por triplicado.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1.4. Curvas de calibración para la determinación de la concentración enzimática

Se realizaron curvas de calibración para la determinación de la concentración enzimática en cada sistema, buscando obtener un amplio intervalo lineal debido a que en los futuros inmunoensayos, se determinarán analitos, cuya concentración estará relacionada con la respuesta de HRP.

Como los datos presentaron una distribución heterocedástica, las curvas se analizaron mediante WLS. La **Tabla 5.3** muestra los parámetros analíticos para cada sistema enzimático. Se obtuvieron sensibilidades analíticas desde 0,3 a 1,3 nmol L⁻¹ de concentración de HRP. Las desviaciones estándares de las pendientes, evaluadas mediante CV%, en todos los casos fueron menores al 10%, excepto para fenol (CV% = 12,9%, n = 3). El sistema con uno de los cosustratos más eficientes (OPD) presentó el más amplio intervalo lineal con el menor LD. Estos valores fueron similares a los encontrados en bibliografía (Guo y col., 1999; Fanjul-Bolado y col., 2005; Fornera y Walde, 2010). A diferencia del presente trabajo, Fornera y Walde (2010) y Guo y col. (1999) describen sistemas de HRP con OPD y bromopirogalol como cosustratos, respectivamente, en los cuales se aplica detección óptica; mientras Fanjul-Bolado y col. (2005) detalla un sistema con TMB como cosustrato, usando detección amperométrica. A pesar de que el p-aminofenol fue el segundo mejor cosustrato con amplio intervalo lineal, las concentraciones de HRP fueron mayores a lo documentado en bibliografía (Sun y col., 2001). Sin embargo, en ese artículo se aplica un E fijo de -0,56 V (contra Ag/AgCl en solución 3 mol L⁻¹ de NaCl), el cual puede ser desventajoso, debido a que a altos potenciales se pueden reducir algunas interferencias en la muestra. Los rendimientos analíticos de los sistemas con pirocatecol y p-clorofenol como cosustratos fueron similares entre sí, pero con LD más altos y intervalos de linealidad más estrechos que los sistemas con OPD y p-aminofenol como cosustratos. Finalmente, la única ventaja de los sistemas con fenol, TMB e hidroquinona como cosustratos fue el hecho de que presentaron un amplio intervalo lineal.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.3. Parámetros analíticos de las curvas de regresión de HRP mediante WLS

Sistema	Condiciones experimentales			Sensibilidad	^b CV% (n = 3)	Intervalo	LC	LD	Epico (mV)	Detección
	[cosustrato] 10 ⁻³ (mol L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] 10 ⁻³ (mol L ⁻¹)	^a pH	analítica 10 ⁻⁹ (L mol ⁻¹)		lineal 10 ⁻⁹ (mol L ⁻¹)	10 ⁻⁹ (mol L ⁻¹)	10 ⁻⁹ (mol L ⁻¹)		
HRP-H ₂ O ₂ -fenol	0,5	0,25	7,5	0,3 ₄	12,9	35 - 38	35	12	265	VOC
HRP-OPD- H ₂ O ₂	0,25	0,125	6,0	0,7 ₅	0,06 ₀	0,096 - 19	0,096	0,032	-140	VOC
HRP-p-clorofenol- H ₂ O ₂	2,0	2,0	6,0	1,2	6,1	7,4 - 19	7,4	2,4	-280	VOC
HRP-hidroquinona- H ₂ O ₂	2,0	2,0	7,5	1,1	6,9	4,9 - 9,7	4,9	1,6	-150	VOC
HRP-TMB- H ₂ O ₂	0,5	2,0	6,0	0,3 ₇	8,8	24 - 38	24	8,1	50	Amperometría
HRP- pirocatecol - H ₂ O ₂	0,5	0,25	6,0	1,3	5,8	7,1 - 19	7,1	2,3	50	VOC
HRP-p-aminofenol- H ₂ O ₂	0,25	0,25	5,0	1,0	1,4	3,9 - 38	3,9	1,3	100	VOC

^aEn solución tampón de fosfato 0,1 mol L⁻¹ y KCl 0,1 mol L⁻¹ y ^bCV% fueron calculados como $\left(\frac{DE_b}{b}\right) \times 100$, donde DE_b es la desviación estándar de la pendiente

y b es la pendiente de la curva de regresión lineal.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.2. DETERMINACION DE BIOTINA EN ALIMENTOS SUPLEMENTARIOS MEDIANTE UN MAGNETO BIOSENSOR ELECTROQUIMICO

En esta sección se desea estimar el rendimiento analítico de las partículas magnéticas con su doble función, la de recuperar y preconcentrar al analito de interés a partir de una matriz compleja y, la de actuar como soporte de la reacción de bioafinidad.

5.2.1. Optimización del magneto biosensor electroquímico

La biotina (también llamada vitamina B8, B7 o H) es una vitamina soluble en agua y un co-factor esencial para cinco enzimas carboxilasas dependientes de biotina, sintetizada en una amplia variedad de bacterias y plantas. Sin embargo, diversos microorganismos como también mamíferos no son capaces de sintetizarla y necesitan adquirirla a partir de la dieta (Livaniou y col., 2000). Además de las características clínicas típicas, evidencias recientes indican que la mujer embarazada desarrolla deficiencia de biotina durante el embarazo normal (Staggs y col., 2004; Stratton y Smith, 2006). A pesar de que el nivel de biotina máximo no está especificado, 1,5 µg en 100 kcal es recomendable por las normas alimentarias regulatorias en las formulaciones infantiles, que normalmente reemplazan la leche materna, brindándole al infante los requerimientos nutricionales de los primeros meses de vida (Código Alimentario Argentino, 2007). Consecuentemente, el diagnóstico de la deficiencia de biotina y el monitoreo de sus niveles en pacientes recibiendo tratamiento de biotina son puntos importantes, como también su determinación en alimentos y en productos como los suplementos alimentarios. Es por ello, que se decidió desarrollar un magneto biosensor electroquímico para detectar biotina en diferentes matrices alimentarias.

Tradicionalmente, las técnicas analíticas para la determinación de biotina comprenden a los métodos microbiológicos, bioensayos, métodos instrumentales y ensayos de afinidad (Livaniou y col., 2000; Bitsch, 2003). Los *métodos microbiológicos* son los más comunes, basados en el crecimiento de microorganismos cuando en los medios de cultivo hay biotina, ya que esta vitamina es un nutriente esencial para el desarrollo de los microorganismos (Kosugi y col., 2000). Este ensayo es sensible, pero tiene baja especificidad, es tedioso y consume mucho tiempo (Fukui y col., 1994). El *bioensayo* de biotina consiste en alimentar determinados animales con una cantidad de biotina conocida. La ganancia de peso se relaciona con el logaritmo de la concentración de biotina (Kallakunta y col., 2010). Este método tiene la ventaja de poder estimar la biodisponibilidad de biotina presente en las muestras alimentarias (Bonjour, 1984). Los principales *métodos instrumentales* para la detección de biotina incluyen la espectroscopía, colorimetría, cromatografía y electroforesis. Estos métodos muestran alta sensibilidad, siendo más simples y rápidos que los

RESULTADOS y DISCUSION

métodos microbiológicos. La principal ventaja es la discriminación entre biotina y sus metabolitos (Lahely y col., 1999; Höller y col., 2006). Sin embargo, el equipamiento es caro y sofisticado y se necesita de personal entrenado. Los *ensayos de afinidad* se basan en la extremada especificidad y alta afinidad de interacción entre biotina y la glicoproteína avidina y su gli (constante de asociación, $K_a = 10^{15} \text{ mol L}^{-1}$) lo cual permite fuertes asociaciones, similares a la formación de uniones covalentes. Esta interacción es fuertemente resistente en un amplio intervalo de químicos (detergentes, desnaturalizantes de proteínas), variación de pH y altas temperaturas (Gan y Marquardt, 1999; Mishra y col., 2005). Estos ensayos muestran alta precisión y mejoran el límite de detección, son simples y presentan una gran habilidad para analizar gran número de muestras en corto tiempo. Además, existen sistemas que distinguen entre biotina y sus metabolitos basados en la reacción de afinidad acoplada a métodos fisicoquímicos, tales como los colorimétricos (Martin y col., 2008), los fluorescentes (Tanaka y col., 1999), los cromatográficos (Höller y col., 2006; Thompson y col., 2006), los cromatográficos con detección electroquímica (Kizek y col., 2005), la microbalanza de cristal de cuarzo (Deng y col., 2006) y los electroquímicos (Vreeke y col., 1995; Wright y Rawson, 1995; Sugawara y col., 1995; Sugawara y col., 1996; Tanaka y col., 1997; Fowler y col., 2008). Finalmente, se han implementado sistemas analíticos modernos más sofisticados, basados en la interacción entre la biotina y anticuerpos anti-biotina (Lu y col., 1997; Ho y col., 2010; Khora y col., 2011).

Con la finalidad de reducir o eliminar los inconvenientes que presentan los métodos tradicionales de detección de biotina, se recurrió a los biosensores de afinidad con detección electroquímica, debido a que tanto los sensores electroquímicos (Ikariyama y col., 1985) como los biosensores (Delgado Reyes y col., 2001; Stuetz, 2003; Gao y col., 2008;) han revolucionado el análisis moderno, debido a la simplicidad y rapidez en la respuesta mediante un equipamiento electrónico de transducción directa (Lermo y col., 2009).

Inicialmente, se optimizaron las etapas que incluyen la reacción de afinidad, incubación, separación magnética y lavado, para lo cual se evaluaron tres procedimientos experimentales diferentes, esquematizados en la **Figura 5.9**, acorde a la bibliografía (Zacco y col., 2006; Zacco y col., 2007; Laube y col., 2011).

RESULTADOS y DISCUSION

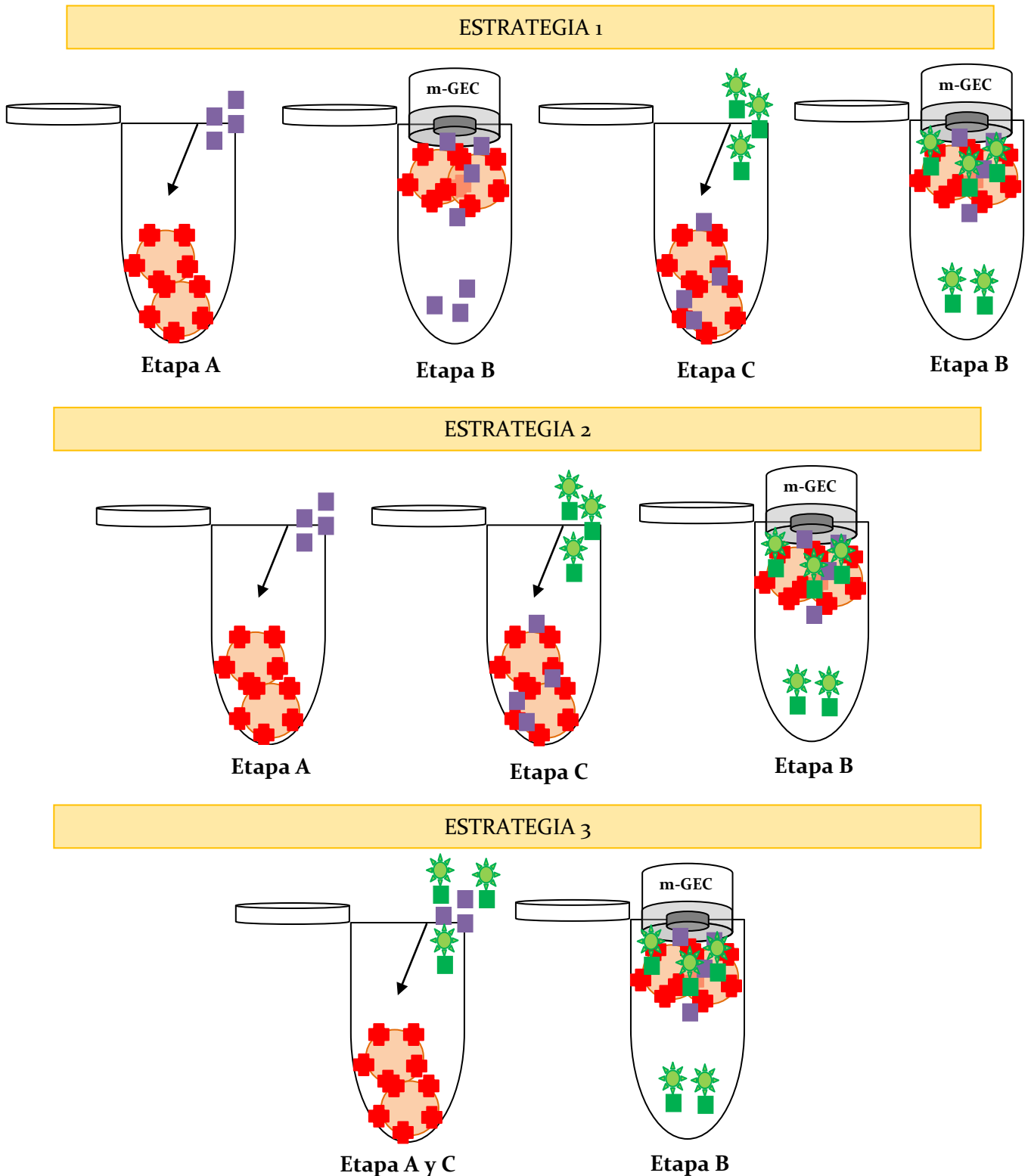


Figura 5.9. Representación esquemática de tres procedimientos competitivos denominados estrategias 1, 2 y 3 para la determinación de biotina. Etapa A: incubación de biotina con PM-estreptavidina, Etapa B: separación mediante m-GEC y lavado, y Etapa C: adición de biotina-HRP e incubación.

En todos los casos, las concentraciones finales de biotina y biotina-HRP fueron $3,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ y $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. La concentración de PM-estreptavidina se mantuvo a $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$

RESULTADOS y DISCUSION

como recomendaba el fabricante. En la estrategia 1, se incubó a la biotina con PM-estreptavidina seguido por la separación magnética y la etapa de lavado. Cada separación magnética y lavado fueron realizados para remover las moléculas absorbidas no específicamente. La estrategia 2 fue similar a la estrategia 1, pero sin separación magnética y etapa de lavado después de la incubación entre biotina y PM-estreptavidina. Finalmente, en la estrategia 3 todos los reactivos se adicionaron al mismo tiempo. Después de la etapa de la incubación, se realizaron la separación magnética y el lavado. Como separador magnético se utilizó al mismo transductor (m-GEC) debido a su conocido buen desempeño en la recuperación de diferentes analitos (Pividori y col., 2007; Zacco y col., 2007; Laube y col., 2011). Estos, además, poseen bajo precio, son fáciles de preparar, usar, renovar y modificar.

La detección electroquímica se basó en la reacción enzimática de HRP con OPD como cosustrato y H_2O_2 como sustrato, cuya respuesta se registró mediante VOC. Este sistema se seleccionó, como se detalló en la sección 5.1.4, debido a que OPD fue el cosustrato que presentó la mayor afinidad y eficiencia por la unión a la enzima HRP, en comparación con los otros cosustratos estudiados.

La respuesta electroquímica de la reacción enzimática se midió en cada estrategia mediante VOC y la densidad de corriente de reducción se relacionó inversamente con la concentración de biotina. Un voltamograma típico se muestra en la **Figura 5.10**.

RESULTADOS y DISCUSION

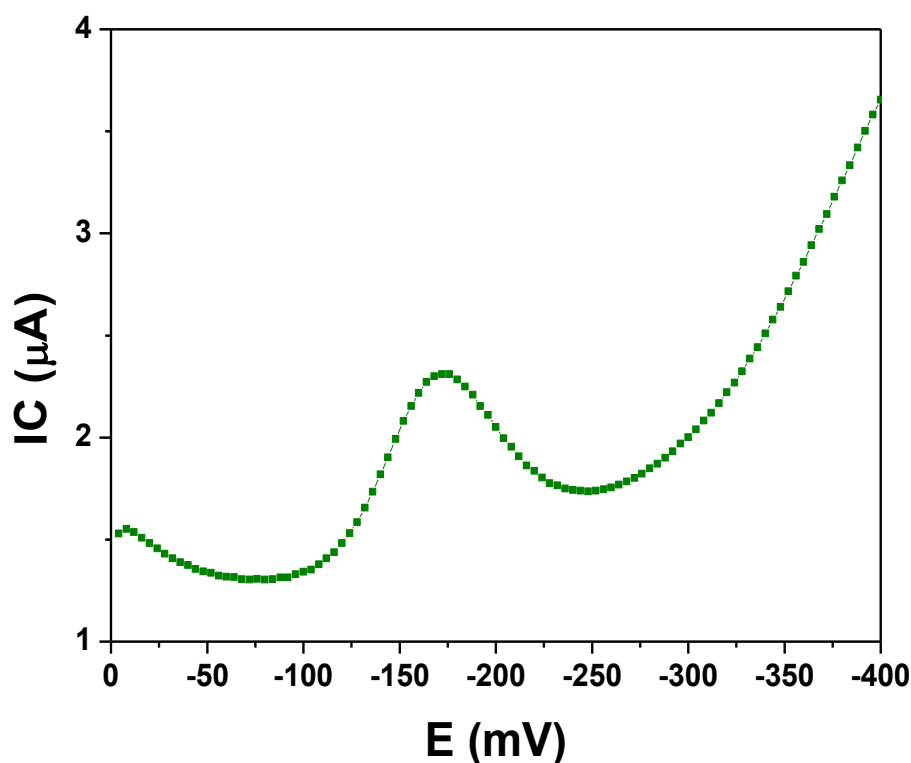


Figura 5.10. Voltamograma obtenido mediante la VOC para la estrategia 2, cuyas condiciones fueron $2,5 \times 10^{-3}$ y $1,25 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de OPD y H₂O₂, respectivamente, a un pH de 6,0 y 60 s de tiempo de reacción.

Como se muestra en la **Figura 5.11**, la estrategia 3 presentó la mayor señal electroquímica ($6 \mu\text{A cm}^{-2}$, $n = 5$), sugiriendo una competición pronunciada entre biotina y biotina-HRP. Las señales electroquímicas en las estrategias 1 y 2 fueron $1,1$ y $0,6 \mu\text{A cm}^{-2}$ ($n = 5$), respectivamente. Los resultados indican que la primera incubación de biotina con PM-estreptavidina, realizada en las estrategias 1 y 2, favorece la reacción de afinidad entre biotina y las PM, siendo luego los sitios libres de las partículas ocupados por la biotina-HRP. La estrategia 2 se seleccionó para los futuros ensayos, debido a que retiene la mayor cantidad de biotina sobre las PM, siendo más simple y rápida que la estrategia 1, debido a que evita una etapa de separación y lavado.

RESULTADOS y DISCUSION

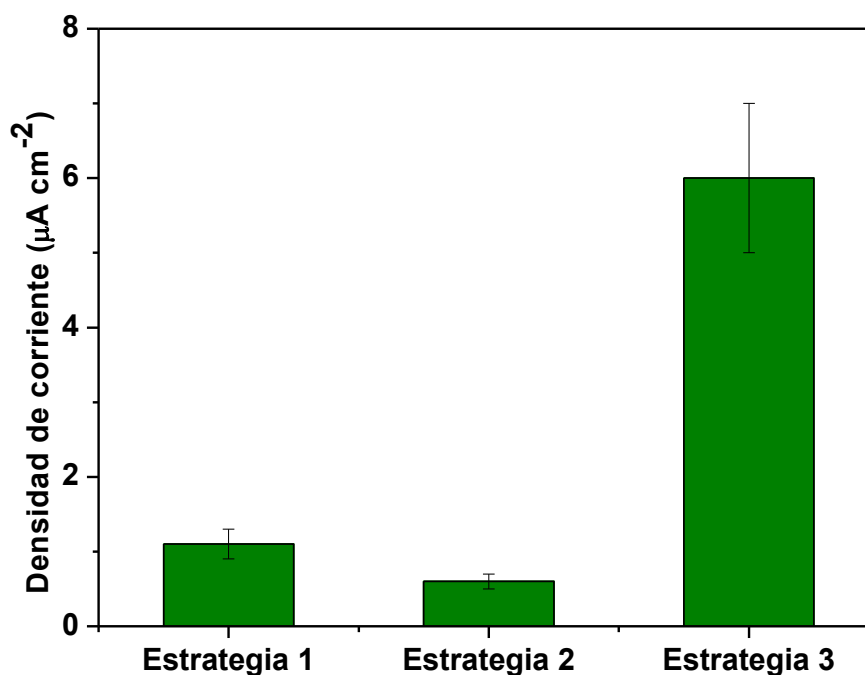


Figura 5.11. Respuesta electroquímica media con su desviación estándar ($n = 3$) para las diferentes estrategias en la reacción de afinidad.

Por otro lado, se estudió la concentración óptima de biotina-HRP en la estrategia 2. En este caso, la reacción de afinidad se evaluó variando la concentración de biotina-HRP (en el intervalo de $3,7 \times 10^{-9}$ a $4,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) a una concentración constante de PM-estreptavidina de $0,35$ mg mL⁻¹, de acuerdo a lo sugerido por el fabricante. Luego, se graficaron las densidades de corriente a diferentes concentraciones de biotina-HRP. Estos resultados son mostrados en la **Figura 5.12**, donde se puede ver que la señal electroquímica alcanza una “meseta” desde $3,0$ a $4,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de concentración de biotina-HRP, indicando una saturación de los sitios de unión de PM-estreptavidina con el conjugado enzimático. Por lo tanto, se eligió la concentración de biotina-HRP de $3,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para los futuros ensayos.

RESULTADOS y DISCUSION

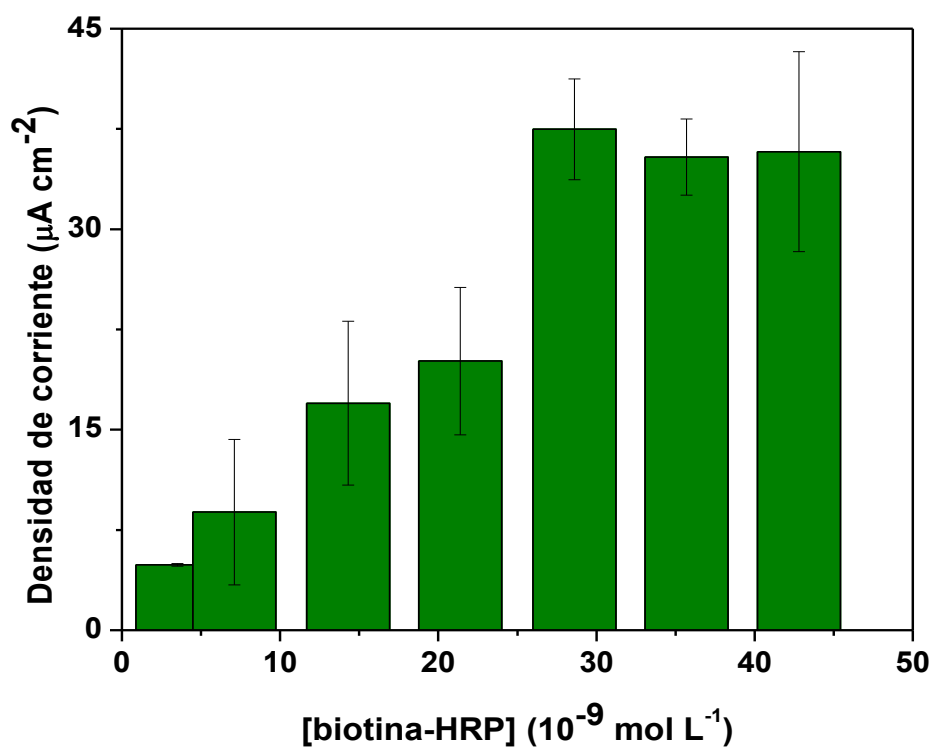


Figura 5.12. Respuesta electroquímica media con desviación estándar ($n = 3$) para cada concentración de biotina-HRP. Las condiciones experimentales fueron PM-estreptavidina de $0,35 \text{ mgmL}^{-1}$ y biotina-HRP desde $3,7 \times 10^{-9}$ a $4,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

5.2.2. Curva de calibración para la determinación de biotina

La **Figura 5.13** muestra la curva estándar de biotina de densidad de corriente en función de la concentración de biotina obtenida mediante la estrategia 2.

RESULTADOS y DISCUSION

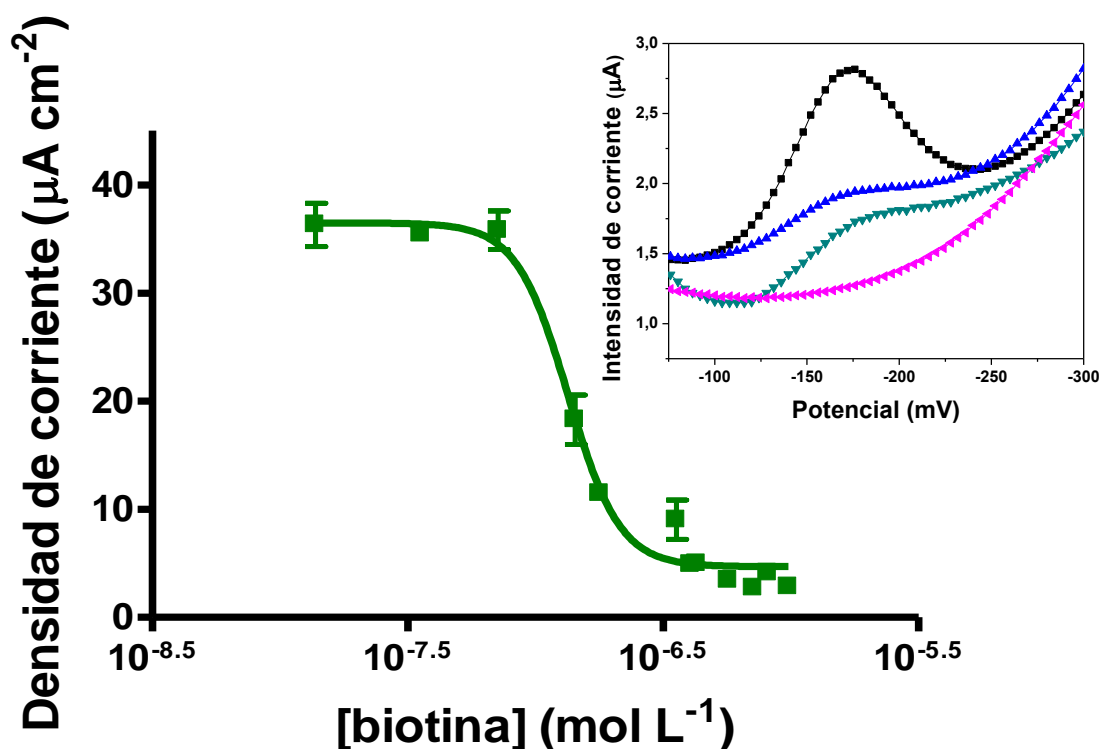


Figura 5.13. Curva de regresión de biotina: densidad de corriente en función de la concentración de biotina. Las condiciones experimentales fueron PM-estreptavidina de $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$, biotina-HRP de $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ y biotina desde 4×10^{-8} a $3,57 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. El gráfico inserto incluye cuatro voltamogramas típicos obtenidos mediante VOC.

Las figuras de mérito, a partir de la curva de calibración de biotina, permitieron caracterizar el rendimiento analítico del sensor (Maple y col., 2004), con excelentes resultados, tales como la CE_{50} de $1,34 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($CV\% = 2 \%$, $n = 3$) y el intervalo dinámico desde $0,94$ a $2,40 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. El ajuste de este método se evaluó mediante el análisis de once estándares de calibración de biotina, usando el algoritmo de regresión logístico de cuatro parámetros para ajustar las densidades de corriente en función de la concentración de biotina. La “bondad de ajuste” se confirmó con un R^2 (coeficiente de determinación) de $0,9920$. Los valores de LD y LC obtenidos como el 90 y el 80% de la señal máxima, fueron $8,4$ y $9,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de concentración de biotina, respectivamente. La **Tabla 5.4** muestra el $CV\%$ y el valor de $R\%$ (Recuperación porcentual) obtenido por el análisis de la concentración de biotina estándar, cercana al CE_{50} ($1,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) ($n = 4$).

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.4: Estudios de precisión realizados con el magneto biosensor electroquímico para una solución estándar de biotina de $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹

Biotina estándar 10^{-7} (mol L ⁻¹)	Biotina obtenida 10^{-7} (mol L ⁻¹)	CV% (n = 4)	^a R%
1,8	2,2	13	107
	1,6		
	2,0		
	1,9		

^aR%: Es la Recuperación porcentual promedio.

Al comparar el valor conocido de solución biotina estándar con la media obtenida experimentalmente a partir de la curva de calibración por la aplicación de una prueba de comparación de medias, se evidenció que las mismas no presentaban diferencias significativas ($P > 0,05$). Tanto los CV% como los R% contribuyeron a la evaluación de la repetibilidad y el efecto matriz del método, obteniendo buenos resultados, teniendo en cuenta los niveles de la concentración analizada. El LD obtenido mediante el magneto biosensor electroquímico se comparó, como se puede ver en la **Tabla 5.5**, con los valores obtenidos por diversos métodos electroquímicos usados en la determinación de biotina. Tres métodos basados en el ensayo avidina-biotina con detección VPD (Sugawara y col., 1995; Sugawara y col., 1996; Tanaka y col., 1997) tuvieron LD ligeramente menores que el obtenido en este trabajo, pero sólo uno de ellos aplicó el método desarrollado a la evaluación de muestras. Además, el límite que se informa en este trabajo fue ligeramente mayor que el límite informado por un método basado en la detección de biotina mediante anticuerpos anti-biotina sobre SPE y detección con VOC (Ho y col., 2010). Por otro lado, el límite fue más bajo que los límites informados por métodos instrumentales, como CLAR (Cromatografía líquida de alta resolución) (Bowers-Komro y col., 1986), CLAR con detección electroquímica (Kamata y col., 1986; Kizek y col., 2005) y CLAR-MS/MS (Cromatografía líquida de alta resolución- Espectroscopía masa/masa) (Höllner y col., 2006) y fue similar a los métodos que usan CLAR con derivatización (Desbene y col., 1983) y CLAR combinada con detección fluorescente (Yoshida y col., 1986; Hayakawa y Oizumi, 1987; Stein y col., 1992; Rehner y Stein, 1997).

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.5. Métodos electroquímicos para determinar biotina

Técnica	Descripción del método	LD (mol L ⁻¹)	Aplicaciones	Referencias
CLAR-VOC	Electrodo modificado con avidina	$7,6 \times 10^{-6}$	Droga farmacéutica	Rizek y col., 2005
Sensor MCC	Avidina inmovilizada en la superficie de cristal	7×10^{-8}	-	Deng y col., 2006
VPD	Competición entre biotina y biotina marcada con Daunomicina	3×10^{-8}	-	Sugawara y col., 1995
VPD	Competición entre biotina y biotina marcada con Daunomicina	2×10^{-9}	-	Tanaka y col., 1997
VPD	Competición entre biotina y biotina marcada con Azul de Nilo	10^{-9}	Tableta de Vitamina	Sugawara y col., 1996
Amperometría	Competición entre biotina y glucosa oxidasa biotinilada	3×10^{-7}	-	Wright y Rawson, 1995
Amperometría	Anticuerpo anti-biotina inmovilizado en electrodo y biotina-HRP	6×10^{-7}	-	Lu y col., 1997
VOC	Anticuerpo anti-biotina inmovilizado en electrodos impresos usando K ₄ Fe(CN) ₆ como mediador	$1,4 \times 10^{-8}$	-	Ho y col., 2010
VOC	Competición entre biotina y biotina-HRP sobre partículas magnéticas con estreptavidina	$8,4 \times 10^{-8}$	Suplemento dietario y formulación infantil	Este estudio, 2012

5.2.3. Biotina en muestras alimentarias: efecto matriz, estudios de exactitud y efectos de interferencias

Las muestras reales tales, como suplemento dietario comercial fortificado con biotina y formulación infantil, se analizaron mediante el magneto biosensor electroquímico. La cantidad de biotina cuantificada en las muestras fue 131 (CV% = 19%, n = 3) y 29 (CV% = 20%, n = 3) $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de muestra, respectivamente, con porcentajes de dosis declarados de 87 y 233% para el suplemento

RESULTADOS y DISCUSION

dietario fortificado con biotina y la formulación infantil, respectivamente. Estos valores representan 26 y 5 μg en 100 Kcal, respectivamente, satisfaciendo a la regulación de biotina en los alimentos (Código Alimentario Argentino, 2007). La cantidad de biotina en la formulación infantil con respecto a la declarada en el rótulo podría deberse a que el fabricante trata de prevenir futuras pérdidas de la vitamina en el proceso de fabricación y conservación. La evaluación del efecto matriz se analizó en una leche en polvo libre de biotina, en la cual se adicionaron tres niveles de concentraciones de biotina estándar (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Estudios de efecto matriz en una leche en polvo libre de biotina

Biotina añadida 10^{-7} (mol L ⁻¹)	Biotina obtenida 10^{-7} (mol L ⁻¹)		R%	CV% (n = 3)
	media	DE		
0,91	0,95	0,04	106	4
1,07	1,03	0,15	96	15
1,43	1,48	0,15	104	10

Primero, la ausencia de biotina se confirmó en la leche libre de biotina con una señal negativa (menor al LD = $8,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹), obtenida mediante el magneto biosensor electroquímico. Segundo, se adicionaron a esta leche tres cantidades diferentes de biotina, por triplicado, para lograr concentraciones de 27,8, 32,7 y 43,7 μg de biotina en 100 g de muestra. Luego de la extracción de cada muestra, se analizaron 50 μL del sobrenadante mediante el magneto biosensor electroquímico, informando la respuesta como mg de biotina en 100 g de muestra. Para la estimación de este efecto, se compararon los valores conocidos de concentraciones de biotina adicionados con los valores obtenidos experimentalmente, observando que las poblaciones no presentaban diferencias significativas ($P > 0,05$). La ausencia de efecto matriz se puede atribuir al uso de partículas magnéticas, debido a que éstas tienen la capacidad de unirse con gran selectividad a la biotina. Además, estas PM tuvieron un rol muy importante en la preconcentración y extracción de la biotina a partir de las muestras de alimentos. Los valores de recuperación para cada nivel variaron desde 95% a 110%, con un valor de CV% aceptable, acorde al manual de la AOAC (Asociación oficial de Químicos Analíticos por sus siglas en inglés) (Hokanson, 1994), es decir una variación menor al 15% (n = 3).

Para los estudios de exactitud en muestras alimentarias, se adicionaron 76, 152 y 228 μg de biotina en 100 g de suplemento dietario y 7,4, 14,8 y 21,8 μg de biotina en 100 g de formulación infantil. Después de la extracción de la muestra, se analizaron mediante el magneto biosensor

RESULTADOS y DISCUSION

electroquímico, 10 μL del sobrenadante del suplemento dietario y 50 μL de la formulación infantil. El contenido de biotina se informó como mg de biotina en 100 g de muestra. Las recuperaciones obtenidas estuvieron comprendidas en el intervalo desde 80 a 120%, con CV% menores al 20%, $n = 3$ (ver **Tabla 5.7**).

Tabla 5.7. Valores de recuperación para estudios de exactitud en muestras alimentarias basadas en el magneto biosensor electroquímico

Muestras	Valor teórico de biotina ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	Ensayos de cuantificación		Ensayos de recuperación			
		Biotina obtenida ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)		Biotina añadida ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	Biotina obtenida ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	R%	CV% ($n = 3$)
		Media	DE ($n = 3$)				
Suplemento dietario	150	131	25	76	220	117	14
				152	277	96	18
				228	370	105	19
Fórmula infantil	12	29	6	7	35	86	16
				15	47	120	20
				22	50	95	15

Estos son excelentes resultados, teniendo en cuenta el simple pretratamiento de la muestra y la complejidad de la matriz. Este hecho puede atribuirse al empleo de las partículas magnéticas ya que el efecto matriz se ve minimizado, debido a que se mejoran las etapas de lavado y de separación mediante el uso de imanes permanentes.

Las formulaciones infantiles son generalmente derivados de leche de vaca y son fabricadas como sustituyentes de la leche materna durante el primer mes de vida. La concentración de biotina en leche de vaca es aproximadamente $20 \mu\text{g L}^{-1}$, pero ésta puede degradarse en los pretratamientos tales como la pasteurización o esterilización (Ford, 1967; LSRO, 1998). A pesar de que la biotina es muy estable y puede sufrir procesos de esterilización sin que sea afectada, esta puede ser fácilmente oxidada (Rolls, 1982; De Leenheer y col., 2000). En un artículo se ha informado que la biotina D-sulfóxido en la leche de vaca podría ser el metabolito predominante en un medio anaeróbico (Del Campillo-Campbell, 1979). Además, los estudios de la estabilidad de biotina en muestras de leche artificiales para infantes han documentado que entre 0 a 30% de biotina puede transformarse en productos afines, dependiendo de la forma del producto (Ford y col., 1983; MacLean y col., 2010). Por

RESULTADOS y DISCUSION

otro lado, el metabolismo de biotina en muestras de leche humana ha sido estudiado detalladamente por algunos grupos de investigación (Mock y col., 1997; Zemleni y Mock, 1999).

Los fabricantes de las leches para los infantes recomendaron que, una vez reconstituidas en agua, las leches deberían ser consumidas en un período de 3 meses luego de abierto el recipiente de leche en polvo. Por lo tanto, se realizó un ensayo para estimar el efecto de las interferencias en la respuesta del magneto biosensor electroquímico, debido a los productos de degradación de biotina. El ensayo consistió en reconstituir una leche en polvo libre de biotina y adicionarle 12 y 150 µg de biotina estándar en 100 g de dicha leche. Conjuntamente, se prepararon dos soluciones estándares de biotina al mismo pH (6,0) y concentraciones. Tanto las soluciones como las muestras se prepararon en alícuotas y se conservaron a 4 °C, siendo cada alícuota extraída y analizada mediante el magneto biosensor en tres días diferentes. El R% se calculó como la relación entre los valores de respuesta para cada día y las respuestas del primer día. Las **Figuras 5.14a y b** muestran los R% para las muestras y soluciones a 12 y 150 µg de biotina en 100 g, respectivamente, en función del tiempo. En todos los casos, las recuperaciones decrecieron en el transcurso del tiempo. Sin embargo, el efecto fue más pronunciado para la muestra a 12 µg de biotina en 100 g y, más aún, para la biotina estándar en solución acuosa a la misma concentración, con diferencias significativas en las respuestas entre días acorde al ensayo ANOVA con $P < 0,05$. Después del primer día de conservación, para este nivel de concentración de biotina, las recuperaciones fueron $97 \pm 7\%$ y $69 \pm 8\%$ para la matriz de leche y la solución acuosa, respectivamente. En base a estos resultados, atribuimos la disminución de la respuesta del biosensor a la degradación de biotina. Debido a que la ausencia del efecto matriz se demostró anteriormente, la disminución menos marcada en la matriz de la leche podría ser atribuida al efecto protector del ácido ascórbico, posiblemente, presente en la leche en una concentración aproximada a 2 mg en 100 mL (Fox y McSweeney, 1998; Codex Alimentarius Commission, 2002).

RESULTADOS y DISCUSION

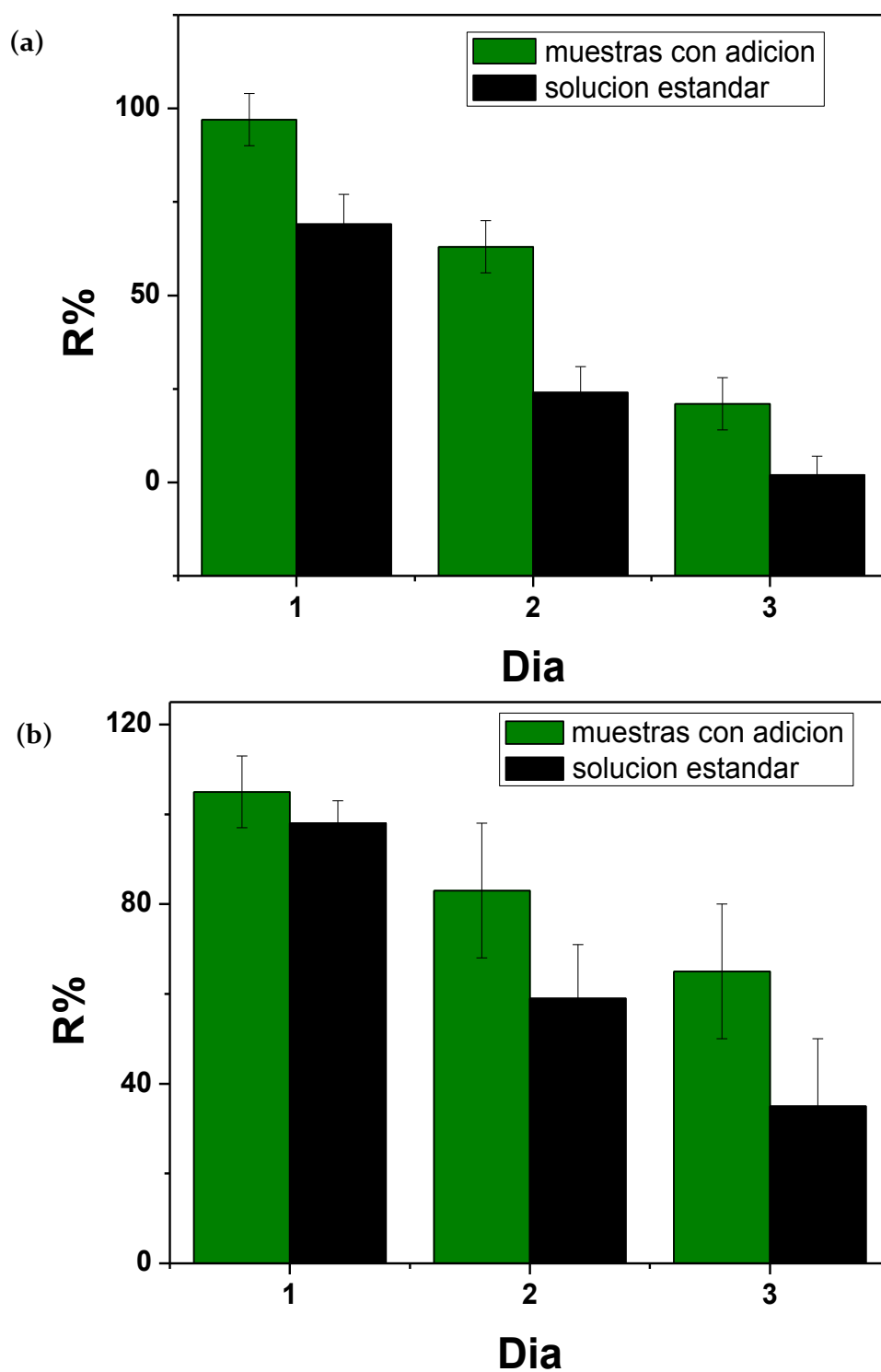


Figura 5.14. Recuperación % para muestras con adición de biotina y solución estándar (a) a 12 µg de biotina en 100 g, y (b) a 150 µg de biotina en 100 g, en función del tiempo. Cada columna representa la media de al menos cinco medidas con la desviación estándar.

RESULTADOS y DISCUSION

Muchos estudios científicos basados en la unión de avidina con biotina declaran que los ensayos de bioafinidad no pueden discriminar entre biotina y sus análogos (Mock y Mock, 1997; Caballero, 2009). Por lo que en este trabajo se utilizó estreptavidina, ya que tiene una mayor especificidad que avidina por la biotina y, por lo tanto, su reacción de afinidad tiene un gran poder discriminatorio (Green, 1975). A pesar de que el sistema desarrollado no puede detectar cada metabolito de biotina, los resultados en este trabajo indican que podría estimar la degradación de biotina. Sin embargo, estas evidencias preliminares deberían ser confirmadas con futuros ensayos, mediante la aplicación de separaciones cromatográficas acopladas a ensayos de afinidad, donde biotina y cada metabolito deberían ser determinado con su curva estándar correspondiente (Zempleni y Mock, 2000).

5.3. MAGNETO IMMUNOENSAYO FLUORESCENTE PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA

En esta sección se busca desarrollar una metodología para detectar marcadores serológicos de la enfermedad celíaca mediante detección fluorescente. La técnica seleccionada presenta mayor sensibilidad y potencialidad de transferencia a dispositivos miniaturizados como los Sistemas de Microanálisis Total, respecto a las técnicas ópticas que basan sus medidas en la absorbancia.

5.3.1. Inmovilización de TG2 a las partículas magnéticas

Las proteínas antigénicas se acoplaron covalentemente a las partículas magnéticas activadas con grupos tosilo mediante una reacción entre los residuos amino o sulfhidrilos de la proteína y los grupos tosilo sobre la superficie de las partículas (Siegel y Khosla, 2007; Stenberg y col., 2008), como esquemáticamente se puede observar en la **Figura 5.15**.

RESULTADOS y DISCUSION

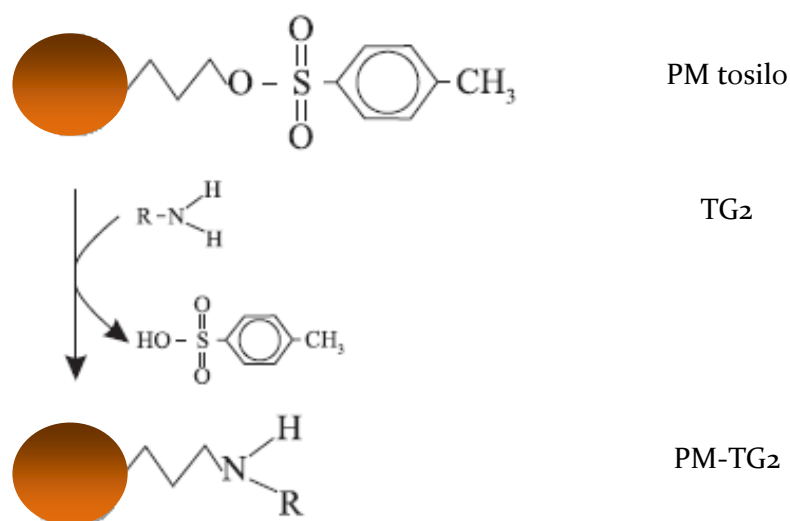


Figura 5.15. Inmovilización de TG₂ sobre las PM tosilo.

La unión de TG₂ a las partículas magnéticas activadas con grupos tosilo se realizó usando el protocolo de inmovilización sugerido por el fabricante (ver sección 4.3.1). Después de la inmovilización, se evaluó la eficiencia de la estrategia de acople PM-TG₂ mediante el método de Bradford. Este método se basa en la unión no-covalente de la forma aniónica del colorante azul de Coomassie con los residuos arginina de las proteínas. En ausencia de proteínas, el color de la reacción es rojo; mientras que en presencia de éstas se desarrolla un color azul, con un máximo de absorbancia a 590 nm (Bradford, 1976). Este ensayo rápido (10 min), que involucra la simple adición del colorante, se utilizó para determinar la concentración de proteína en el sobrenadante antes y después de la conjugación PM-TG₂. Con este propósito, se construyó una curva de calibración de BSA en un intervalo de concentración desde 0 a 2 mg mL⁻¹ en agua milliQ (ver **Figura 5.16**), cuya ecuación de regresión lineal ajustada fue $A = 0,967 C_{BSA} (mg ml^{-1}) + 0,012 (n = 24, R^2 = 0,9933)$.

RESULTADOS y DISCUSION

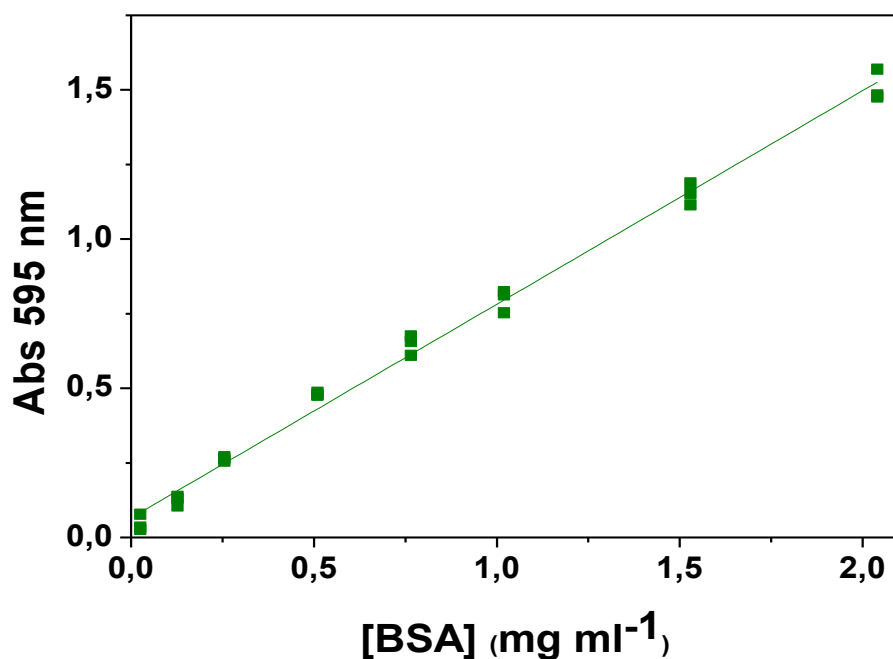


Figura 5.16. Curva de calibración de BSA en agua milliQ para el ensayo de Bradford.

Además, en cada ensayo dos soluciones de TG2 (0,15 y 0,55 mg mL⁻¹) se utilizaron como soluciones estándares. La Figura 5.17 muestra los barridos de espectroscopía en la región espectral ultravioleta (UV)-VIS del ensayo Bradford para las soluciones de BSA y TG2 a la misma concentración.

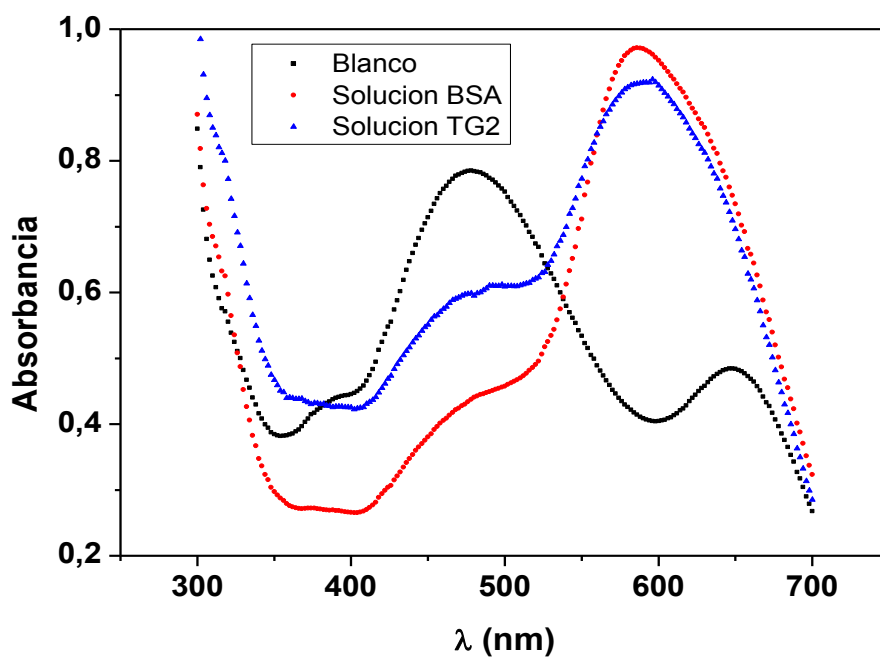


Figura 5.17. Espectro de absorción de soluciones evaluadas mediante el método Bradford: ensayo blanco de reactivo (negro), ensayo de BSA (rojo) y ensayo de TG2 (azul), ambos a 0,55 mg mL⁻¹.

RESULTADOS y DISCUSION

Los espectros de las soluciones de BSA y TG₂ en la reacción Bradford son muy diferentes al espectro del ensayo blanco de reactivo, pero muy similares entre sí. Esto hace suponer que los espectros de los productos “cromóforo-proteína” son muy similares, permitiendo calcular relaciones de absorbancia (a $\lambda = 595$ nm) para TG₂ relativa a BSA, útiles para el cálculo de concentración de TG₂ a partir de la curva de calibración de la BSA. Los promedios de la relaciones de absorbancias para las soluciones estándares de TG₂ de 0,15 y 0,55 mg mL⁻¹ fueron de $0,90 \pm 0,04$ (n=3) y $0,92 \pm 0,03$ (n=3), respectivamente. Esto significa que, para las mismas concentraciones de soluciones de BSA, la absorbancia de estas soluciones resultarían 1 al estandarizarlas y corresponderían a valores de absorbancias cercanos a 0,9 de proteína TG₂. Teniendo en cuenta estas relaciones se determinaron las concentraciones de TG₂, en cada ensayo, a partir de la curva de calibración de BSA. Las concentraciones de proteína (TG₂) en los sobrenadantes, antes y después de la inmovilización, se calcularon a partir de las absorbancias de TG₂, de la curva de BSA y teniendo en cuenta las relaciones de absorbancia para TG₂ relativa a BSA. El procedimiento de inmovilización de TG₂ se repitió tres veces, presentando la misma tendencia en todos los casos. Por ejemplo, para el primer procedimiento de inmovilización, 0,437 y 0,105 fueron las absorbancias medidas del sobrenadante antes y después de la etapa de inmovilización, respectivamente, siendo estos valores equivalentes a 0,439 y 0,097 mg mL⁻¹ en concentración de BSA a partir de la curva de regresión. Estos valores correspondieron a concentraciones de TG₂ de 0,398 y 0,088 mg mL⁻¹. Finalmente, con estos valores se calculó la eficiencia de inmovilización, siendo del 78%.

Además de la eficiencia de acople y, debido a la naturaleza biológica de las PM modificadas con TG₂, es muy importante verificar, por un lado, la estabilidad y, por el otro la especificidad de la reacción de afinidad entre los anticuerpos y la TG₂ inmovilizada para garantizar el rendimiento analítico del inmunoensayo. Con la finalidad de estudiar el efecto combinado de estos factores, se evaluaron las respuestas del magneto inmunoensayo fluorescente para la cuantificación de ATG₂ en función del tiempo. Por lo tanto, se estudió la estabilidad de las PM-TG₂ cada semana durante un mes, en cuyo tiempo se conservaron las PM-TG₂ a 4 °C, como recomendó el fabricante. Las condiciones experimentales usadas en este caso fueron: concentración de PM-TG₂ de 0,05 mg mL⁻¹, título de ATG₂ de 1:8000 y título de antiIgG cabra-HRP de 1:20000. La **Figura 5.18** muestra que, en el período de tiempo analizado, no hay un cambio significativo en la respuesta de IF, confirmando la estabilidad durante un mes de la TG₂ inmovilizada sobre la superficie de las PM.

RESULTADOS y DISCUSION

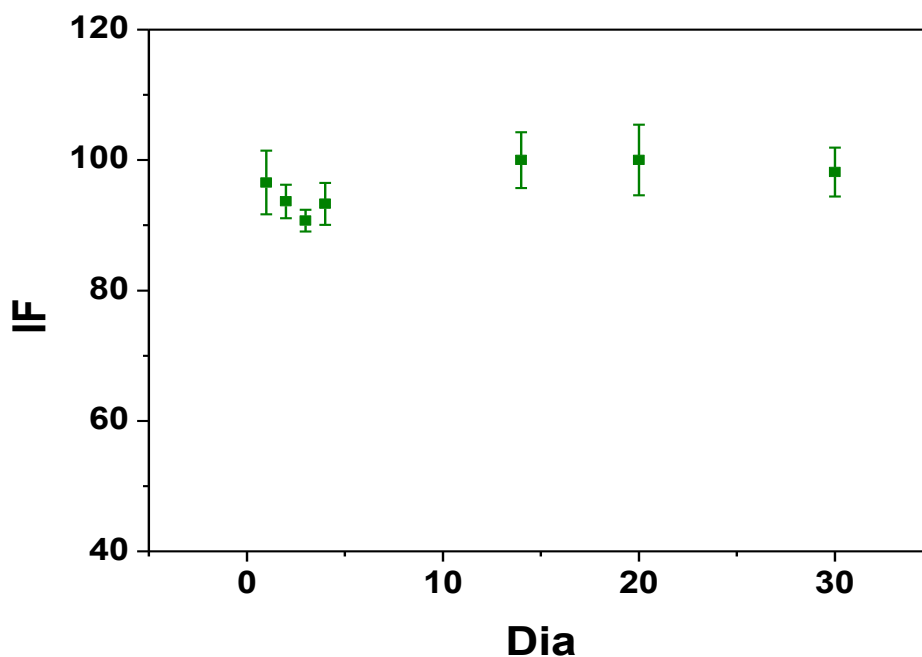


Figura 5.18. Estudio de estabilidad de PM-TG2 analizadas mediante el magneto inmunoensayo fluorescente. Las condiciones experimentales fueron: $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG2, título de ATG2 de 1:8000 y título de antiIgG-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

5.3.2. Optimización de la medida de fluorescencia

En algunas moléculas, la absorción de un fotón va seguida de la emisión de luz, a una mayor longitud de onda (es decir, menor energía), denominada fluorescencia. Al igual que la espectroscopía de absorción, existe una gran cantidad de factores ambientales que afectan el espectro de fluorescencia, por lo que en muchos casos, la intensidad de fluorescencia obtenida resulta más sensible al medio que la absorbancia. Además, la detección de fluorescencia es muy selectiva, permitiendo detectar a un compuesto fluorescente en una mezcla de otros compuestos no fluorescentes en el mismo intervalo analizado (de excitación y/o emisión) y, es altamente sensible a este compuesto en el orden de concentración de nM (Freifelder, 2003).

Los sistemas de revelación más comunes para la detección fluorescente están basados en la reacción enzimática de la HRP con H_2O_2 como sustrato y un cosustrato fluorescente, como ácido 3-(p-hidroxifenil) propiónico (Sakuragawa y col., 1998), OPD (Mekler y Bystryak, 1992) o TMB (Gong y col., 2002).

Con la finalidad de seleccionar el sistema de revelación más eficiente para HRP basado en su detección fluorescente, se optimizaron las condiciones experimentales para los sistemas con OPD y TMB como cosustratos. Por un lado, OPD es uno de los sustratos cromogénicos de HRP más efectivo

RESULTADOS y DISCUSION

en ELISA, siendo DAP (2,3-Diaminofenazina, por sus siglas en inglés) el producto de oxidación (**Figura 5.19**) (Gong y col., 2002). De esta manera, la respuesta fluorescente se relaciona directamente con la actividad enzimática.

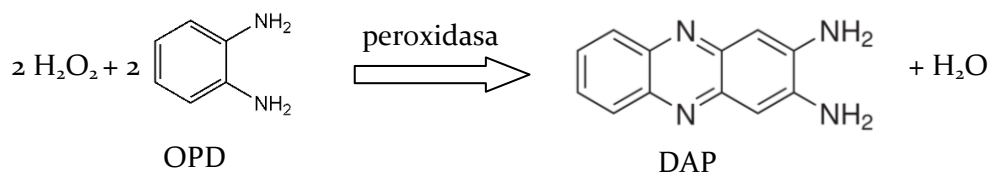


Figura 5.19. Reacción de oxidación de OPD

Por otro lado, TMB es un derivado metilado de bencidina, el cual posee un sistema de anillos insaturados que emiten una fuerte fluorescencia en la región UV, la cual puede estar relacionada con la interacción de resonancia a diferentes posiciones de la molécula y la formación de una estructura quinina, con una configuración planar en el estado excitado. El producto de oxidación de TMB catalizado por HRP es un compuesto no fluorescente (**Figura 5.20**) (Delibato y col., 2009), por lo cual, la respuesta fluorescente se relaciona indirectamente con la actividad enzimática.

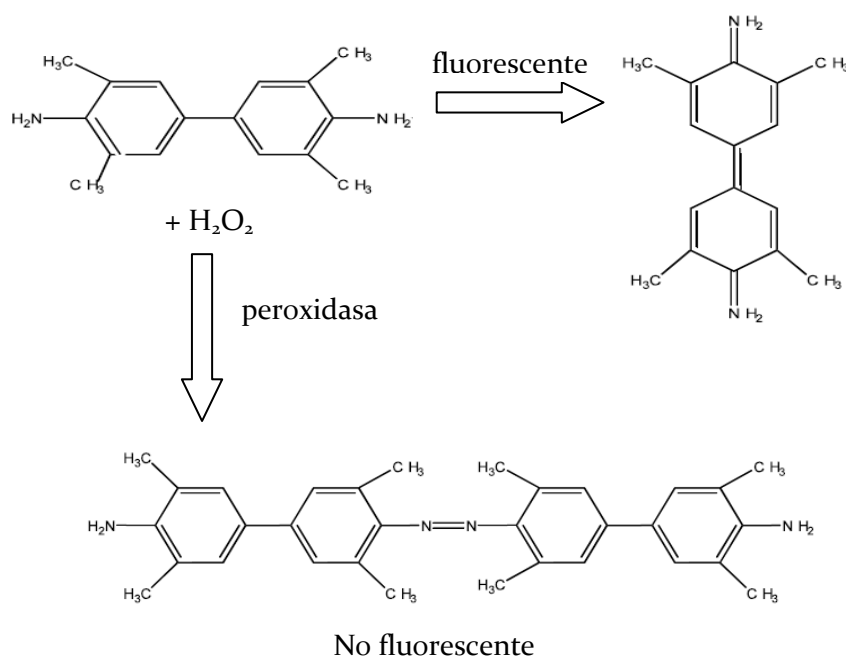


Figura 5.20. Reacción de oxidación de TMB

Los espectros de excitación y emisión para DAP y TMB permitieron seleccionar λ_{exc} y λ_{em} , para cada sistema (ver **Figura 5.21a** y **b**, respectivamente). Estos ensayos se realizaron en cubetas de cuarzo y en las condiciones óptimas encontradas en bibliografía. Primero, se realizó un barrido espectrofotométrico UV-VIS en el intervalo de 200 a 700 nm para los sistemas HRP-OPD-H₂O₂-

RESULTADOS y DISCUSION

tritón y HRP-TMB-H₂O₂. Las condiciones para el primer sistema fueron: OPD 4×10^{-4} mol L⁻¹, H₂O₂ 5×10^{-4} mol L⁻¹, HRP $2,5 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ y tritón 2% v/v en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0 y para el segundo sistema fueron: TMB $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, H₂O₂ $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ y HRP $1,9 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ con dimetilsulfóxido 1% a pH 4,2. Segundo, los espectros de excitación y emisión para los dos sistemas se obtuvieron con el espectrofluorímetro. Las condiciones para el sistema HRP-OPD-H₂O₂-tritón fueron OPD 5×10^{-4} mol L⁻¹, H₂O₂ 5×10^{-4} mol L⁻¹, HRP $9,5 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ y tritón 2% v/v en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0 y para el sistema HRP-TMB-H₂O₂ fueron TMB 1×10^{-6} mol L⁻¹, H₂O₂ 1×10^{-6} mol L⁻¹ y HRP $3,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ con dimetilsulfóxido 1% a pH 4,2.

RESULTADOS y DISCUSION

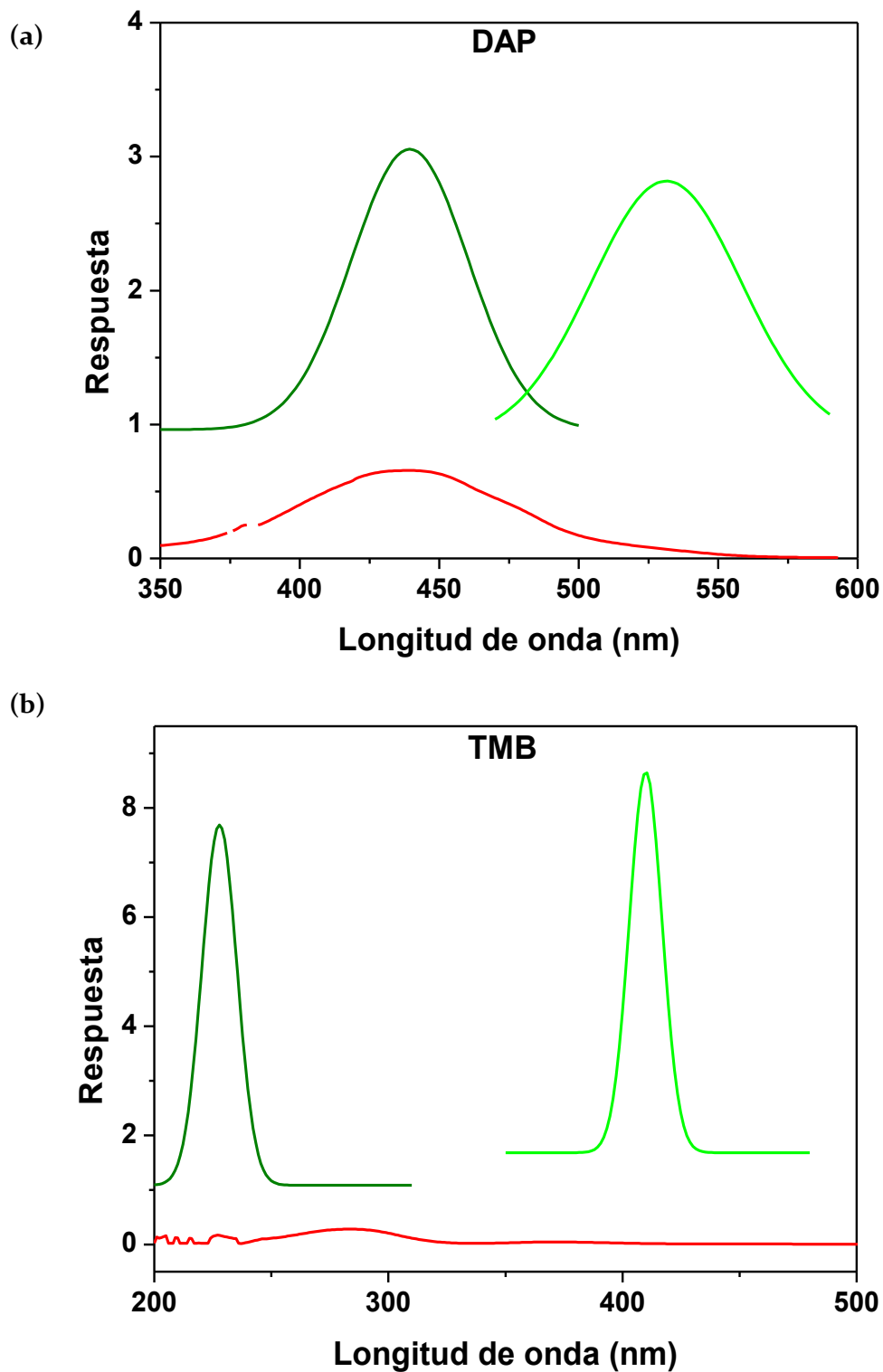


Figura 5.21. Espectros de excitación (color verde) y emisión (color oliva) obtenidos mediante el espectrofluorímetro, y espectro de absorción (color rojo) obtenido mediante el espectrofotómetro para (a) DAP y (b) TMB.

Posteriormente, se evaluaron diversos factores para ambos sistemas de revelación en las placas de 96 pocillos, cuyas condiciones óptimas son resumidas en la **Tabla 5.8**.

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.8. Ensayos de optimización de un factor para los sistemas con OPD y TMB como cosustratos.

Factores	Intervalo evaluado	Sistema HRP-OPD-H ₂ O ₂ -triton	Sistema HRP-TMB-H ₂ O ₂
λ_{em} (nm)	450 a 600		
λ_{exc} OPD (410 nm)	350 a 450	540	410
λ_{exc} TMB (410 nm)			
λ_{exc} (nm)	300 a 500		
λ_{em} OPD (540 nm)	200 a 350	440	230
λ_{em} TMB (410 nm)			
Tipo de micropocillos	Negras y blancas	Blancas	Blancas
Ancho ranura _{em} (nm)	5 y 10	10	10
Ancho ranura _{exc} (nm)	5 y 10	10	10
Volumen (μ L)	100 a 300	300	300
Adición de triton	Si o No	Si	No
[Triton X-100] %v/v	1 a 4	2	-

Las respuestas de la reacción enzimática se evaluaron en placas de 96 pocillos blancas y negras, siendo obtenidas las mayores señales en las placas blancas. A pesar de que las placas negras minimizan la luz espuria, las placas blancas son, generalmente, utilizadas en los inmunoensayos fluorescentes. El ancho de ranura de 10 nm, tanto en los monocromadores de excitación como en los de emisión, se seleccionaron debido a un valor de compromiso entre un alto nivel de señal y una buena resolución (Lakowicz, 2006). La mejor señal se logró con el volumen máximo de pocillo, es decir, 300 μ L. Por otro lado, se estudió la adición de Triton X-100 a cuatro niveles de concentraciones (desde 1 a 4% m/v) junto con los correspondientes ensayos blancos, ver **Figura 5.22a**. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre los ensayos 1, 2 y 3. Esta evidencia indica que los niveles de IF de las soluciones de Triton X-100, PM-TG₂, PM-TG₂ en presencia de los sustratos OPD y H₂O₂ son similares y bajos. Evidencia similar puede verse en los ensayos 4, 6, 8 y 10. Las intensidades de fluorescencia de cuatro soluciones Triton X-100 fueron también bajas y no hubo diferencias significativas entre los ensayos ($P > 0,05$). Acorde a los ensayos 5, 7, 9 y 11, el efecto de adición de Triton puede ser claramente distinguido. Cuando Triton X-100 es añadido al sistema HRP-OPD-H₂O₂ por debajo de la concentración de 2% m/v, la IF se incrementa considerablemente y, luego, a concentraciones mayores de alrededor de 3% m/v, la intensidad comienza a decrecer. Esta evidencia podría ser debida al efecto inhibitorio del Triton X-100 a altas concentraciones sobre la actividad enzimática. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó un valor de concentración de 2% m/v de Triton X-100 para los posteriores estudios. La **Figura 5.22b** muestra el efecto en la

RESULTADOS y DISCUSION

señal fluorescente al determinar HRP frente a la adición de Tritón X-100. Como se puede apreciar, la respuesta obtenida se incrementa aproximadamente tres veces cuando el Tritón X-100 es agregado.

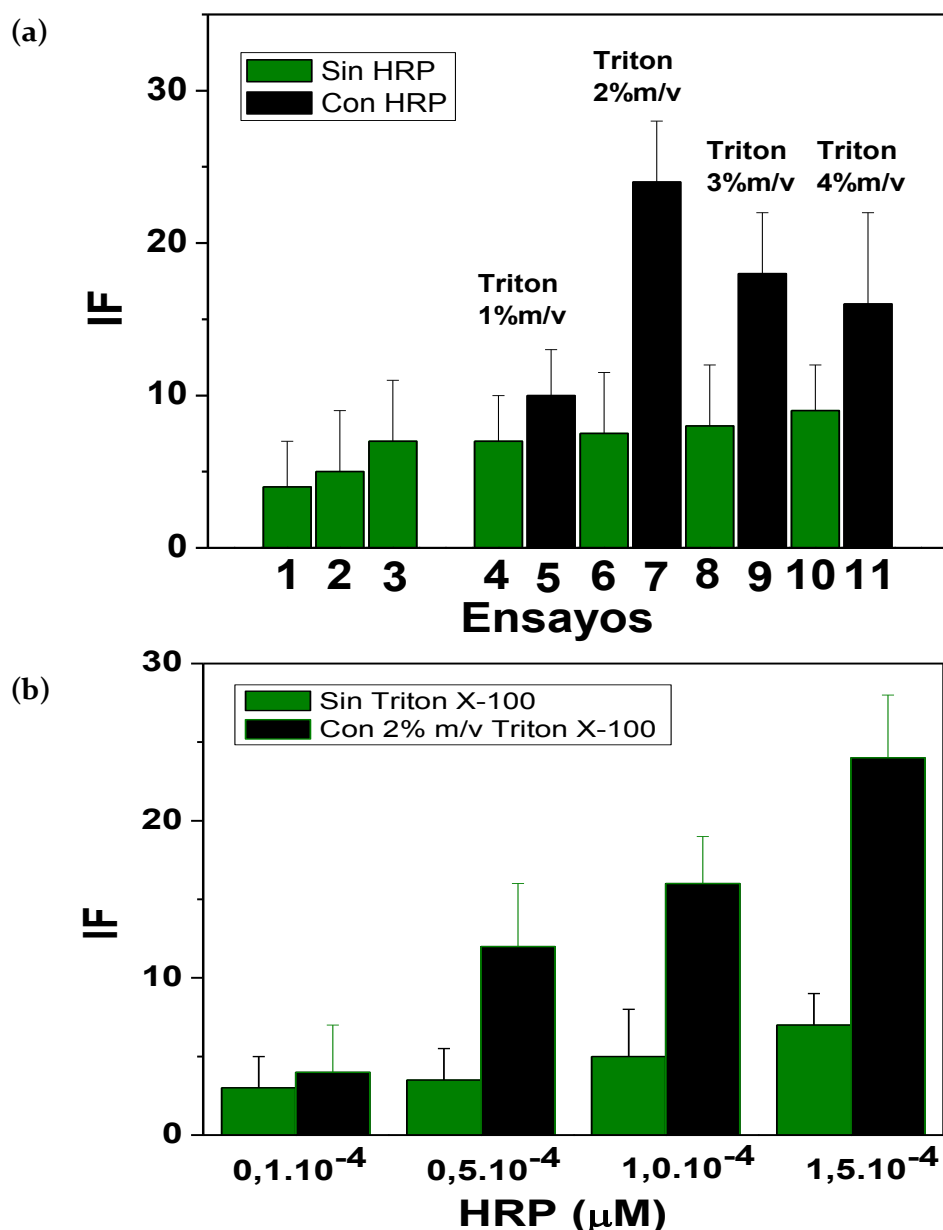


Figura 5.22. (a) Efecto de la adición de Tritón. Ensayo blanco de reactivos: (1) 2% m/v de Tritón X-100; (2) [PM-TG₂] = 0,05 mg mL⁻¹; (3) [PM-TG₂] = 0,05 mg mL⁻¹; [OPD] = 1×10^{-3} mol L⁻¹; [H₂O₂] = 1×10^{-3} mol L⁻¹. Ensayo sin HRP: (4) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 1% m/v; (6) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 2% w/v; (8) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 3% m/v y (10) ensayo reactivo N° 3 + [Tritón X-100] = 4% m/v. Ensayo con [HRP] = $1,5 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹: (5) ensayo N° 4 + HRP, (7) ensayo N° 6 + HRP, (9) ensayo N° 8 + HRP y (11) ensayo N° 10 + HRP. (b) Determinación de la actividad de HRP en ausencia y en presencia de Tritón al 2% m/v. Las barras de error muestran una desviación estándar para n=3. Solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0 y tiempo de reacción = 22 min.

Mientras que el sistema TMB-H₂O₂ no fue significativamente afectado por el Tritón X-100; cuando se adicionó el detergente al sistema OPD-H₂O₂, la IF de DAP se incrementó

RESULTADOS y DISCUSION

considerablemente como se ha sugerido en la bibliografía (Mekler y Bystryak, 1992). Esto se debe a que el Tritón X-100 puede proveer un buen medio para encapsular y restringir la rotación intramolecular de DAP hacia la fluorescencia. Además, la cadena polietilenglicol de la estructura del Tritón X-100, con funciones similares a los grupos como dietil eter (Appell y Bosma, 2011), puede ofrecer un microambiente y polaridad favorable para la fluorescencia del DAP. La **Figura 5.23** muestra la IF del sistema HRP-OPD-H₂O₂ en presencia y en ausencia de Tritón X-100.

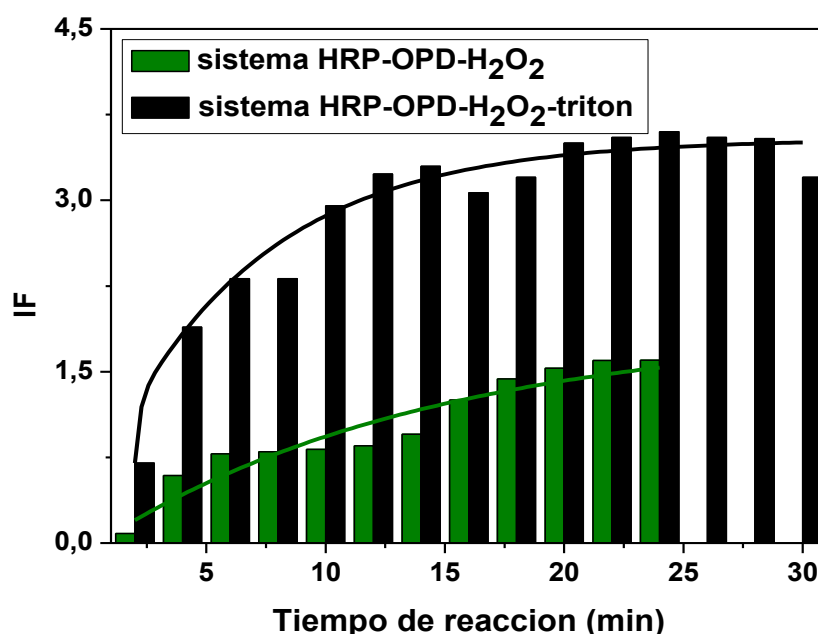


Figura 5.23. Intensidad de fluorescencia del sistema HRP-OPD-H₂O₂ en presencia y ausencia de Tritón X-100 en color negro y verde, respectivamente.

Además, a partir de la **Figura 5.23** se seleccionaron los tiempos de reacción (definidos como los tiempos de muestreo de la señal fluorescente) para el sistema HRP-OPD-H₂O₂, antes y después de la adición de Tritón X-100, los cuales fueron 20 y 2 minutos, respectivamente. Por lo tanto, el tiempo total de reacción fue de 22 minutos para este sistema.

En la **Figura 5.24** se observa el muestreo de la señal fluorescente realizado cada 2 minutos durante 10 minutos para el sistema HRP-TMB-H₂O₂, alcanzándose la estabilidad de la señal fluorescente a partir de los 5 minutos.

Ambos sistemas de detección necesitaron un tiempo de reacción menor que el requerido por el ensayo ELISA comercial (HRP-TMB-H₂O₂-H₂SO₄), considerado como método de referencia, cuyo tiempo es de 32 min.

RESULTADOS y DISCUSION

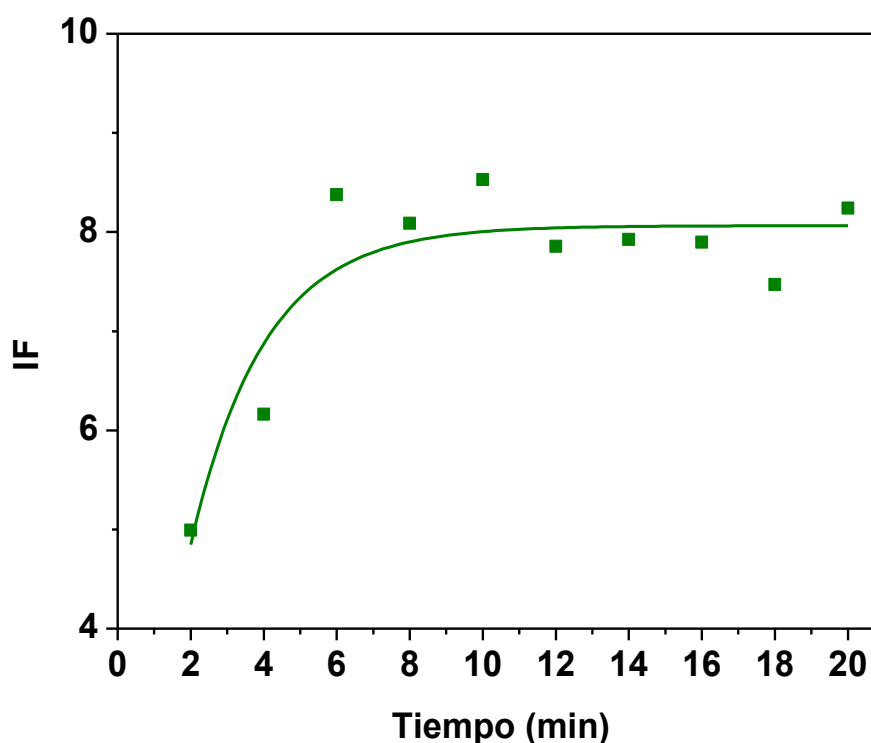


Figura 5.24. IF en función del tiempo para el sistema HRP-TMB-H₂O₂.

Luego, se seleccionó la combinación óptima de factores experimentales en los dos sistemas de detección, con la finalidad de optimizar la respuesta enzimática acoplada a la detección fluorescente. Los factores estudiados fueron la concentración enzimática, la concentración de cosustrato y la concentración de H₂O₂. Por lo tanto, se realizó un DCC de 34 experimentos, con seis puntos centrales para cada uno de los sistemas de detección. En este diseño, se aplicó ANOVA en cada sistema HRP-cosustrato-H₂O₂, de manera de obtener un modelo ajustado significativamente y una falta de ajuste no significativa (P menor y mayor a 0,05, respectivamente). Luego, se seleccionó la combinación de factores con el mejor “valor de respuesta deseable” (Myers y Montgomery, 1995). En la etapa de optimización, se buscó obtener la máxima respuesta fluorescente, directamente relacionada con la concentración enzimática (o actividad) por lo que las concentraciones de los sustratos debían estar presentes en exceso, es decir la reacción debía ser independiente de las concentraciones de los sustratos (cinética de reacción de orden cero). La **Tabla 5.9** muestra los resultados óptimos en la MSR para los sistemas con OPD y TMB como cosustratos.

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.9. MSR para los sistemas HRP-OPD-H₂O₂ y HRP-TMB-H₂O₂

Sistema	Factores (mol L ⁻¹)	Intervalo evaluado	Valor óptimo	Respuesta predicha	Respuesta obtenida
HRP-OPD-H ₂ O ₂	[HRP]	1,9 a 191 x 10 ⁻¹²	1,5 x 10 ⁻¹⁰	18 DG = 0,83	18 ± 1 (n = 6)
	[OPD]	5 a 200 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻³		
	[H ₂ O ₂]	5 a 200 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻³		
HRP-TMB-H ₂ O ₂	[HRP]	1,9 a 1910 x 10 ⁻¹²	1,5 x 10 ⁻⁹	50 DG = 0,66	43 ± 8 (n = 6)
	[TMB]	1 a 100 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁵		
	[H ₂ O ₂]	1 a 100 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁵		

Las respuestas predichas y experimentales en todos los casos no mostraron diferencias significativas, cuando fueron comparadas mediante el ensayo de comparación de medias ($P > 0,05$) (Miller y Miller, 1993; Massart y col, 2003). En este contexto, la función de deseabilidad global puede ser considerada como la eficiencia del sistema para complacer los requisitos del operador, en cuanto a los valores que se desea que tengan tanto los factores como la respuesta. El valor de la función de deseabilidad global fue mayor para el sistema con OPD como cosustrato. El menor rendimiento analítico del sistema HRP-TMB-H₂O₂ se puede atribuir a que la actividad enzimática está indirectamente relacionada con la medida de fluorescencia y, consecuentemente, la determinación de la señal analítica presenta un mayor error experimental.

5.3.3. Optimización del magneto inmunoensayo fluorescente

Como se ha explicado anteriormente en la sección 2.4.2, los ATG2 son buenos marcadores serológicos de la enfermedad celíaca. Convencionalmente, el método más utilizado para su detección se basa en un ensayo ELISA óptico (Teesalu y col., 2009; Basso y col., 2011). A pesar de que es bien conocido que la espectroscopía fluorescente es más sensible que la espectroscopía UV-VIS, no se ha desarrollado aún un inmunoensayo con detección fluorescente para ATG2 (Lakowicz, 2006). Últimamente, han sido publicados numerosos trabajos relacionados con inmunoensayos basados en PM para diferentes analitos; pero no todos los métodos usan placas de microtitulación, no tienen las mismas características en cuanto a formato, clase de PM, técnica de detección, clase de enzima utilizada como rótulo en la detección y procedimiento de inmovilización. El uso de las PM acopladas a placas de 96 pocillos mejora la sensibilidad del sistema inmunoensayo fluorescente y reduce el tiempo de la fase de pre-enriquecimiento (Delibato y col., 2009). Además, el efecto matriz se minimiza en muestras complejas, debido a que se mejoran las etapas de lavado y separación (Zacco y col., 2006; Zacco y col., 2007).

RESULTADOS y DISCUSION

Para la etapa de detección fluorescente del inmunoensayo se utilizó un sistema de fibra óptica para transmitir la luz desde el monocromador de excitación a la superficie de la muestra y, luego, transmitir la luz emitida hacia el monocromador de emisión. Por lo tanto, el lector de superficie excitó a las muestras desde la parte superior y leyó la luz emitida que retornó en la misma dirección. Estas características de la lectura permitieron utilizar placas de microtitulación de 96 pocillos y detección fluorescente en presencia de las PM, sin la necesidad de una etapa de separación. A diferencia de otros métodos que utilizan a las PM, no se observó interferencias en las condiciones experimentales ensayadas. Por lo tanto, esta efectividad simplifica el procedimiento de análisis y evita pasos innecesarios y pérdidas potenciales de materiales, en comparación con algunos métodos previamente documentados (Agrawal y col., 2007; Zhu y col, 2010).

Con la finalidad de optimizar el magneto inmunoensayo fluorescente para ATG₂, se estudiaron el sistema de revelación, la concentración de PM-TG₂ y el título de antiIgG cabra-HRP. Primero, se utilizaron OPD y TMB como cosustratos de HRP en las condiciones óptimas indicadas en la sección 5.3.2, con la finalidad de seleccionar el sistema más sensible. Para ello, se compararon los rendimientos analíticos mediante curvas de calibración construidas a 0,5 mg mL⁻¹ de PM-TG₂, títulos de ATG₂ desde 1:70000 a 1:300 y título de antiIgG cabra-HRP de 1:20000. El sistema elegido fue OPD-H₂O₂-Tritón, ya que la curva obtenida presentó un CE₅₀ de 1:18300 y una IF mayor que el sistema revelado con TMB, cuyo CE₅₀ de 1:8500, como se muestra en las **Figuras 5.25a y b**.

RESULTADOS y DISCUSION

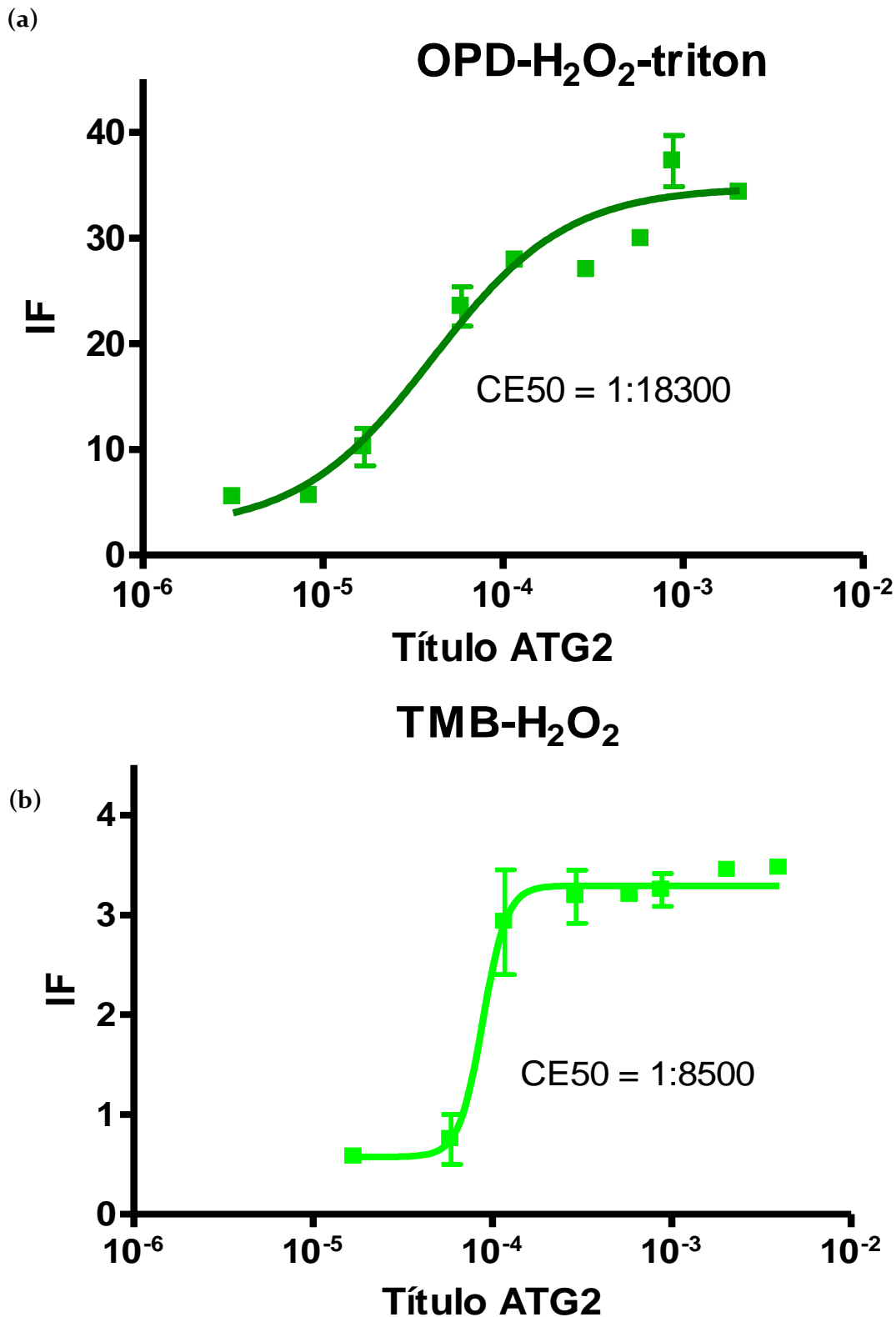


Figura 5.25. Curvas de calibración obtenidas mediante dos sistemas de revelación con detección fluorescente: OPD-H₂O₂-Triton y TMB-H₂O₂. Condiciones de la reacción: 0,5 mg mL⁻¹ de PM-TG₂, título de ATG₂ desde 1:70000 a 1:300 y título de antiIgG cabra-HRP de 1:20000. Condiciones de los sistemas de detección: (a) OPD 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, H₂O₂ 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ y 2 % v/v de Tritón en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0, y (b) TMB 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ y H₂O₂ 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ en solución tampón de citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,2.

RESULTADOS y DISCUSION

Segundo, se ensayaron concentraciones de PM-TG2 en el intervalo desde 0,025 a 0,75 mg mL⁻¹ contra diferentes diluciones de ATG2 y anticuerpo antiIgG cabra-HRP diluido 1:20000. Las curvas estándares de ATG2 para cuatro concentraciones de PM-TG2 se muestran en la **Figura 5.26**.

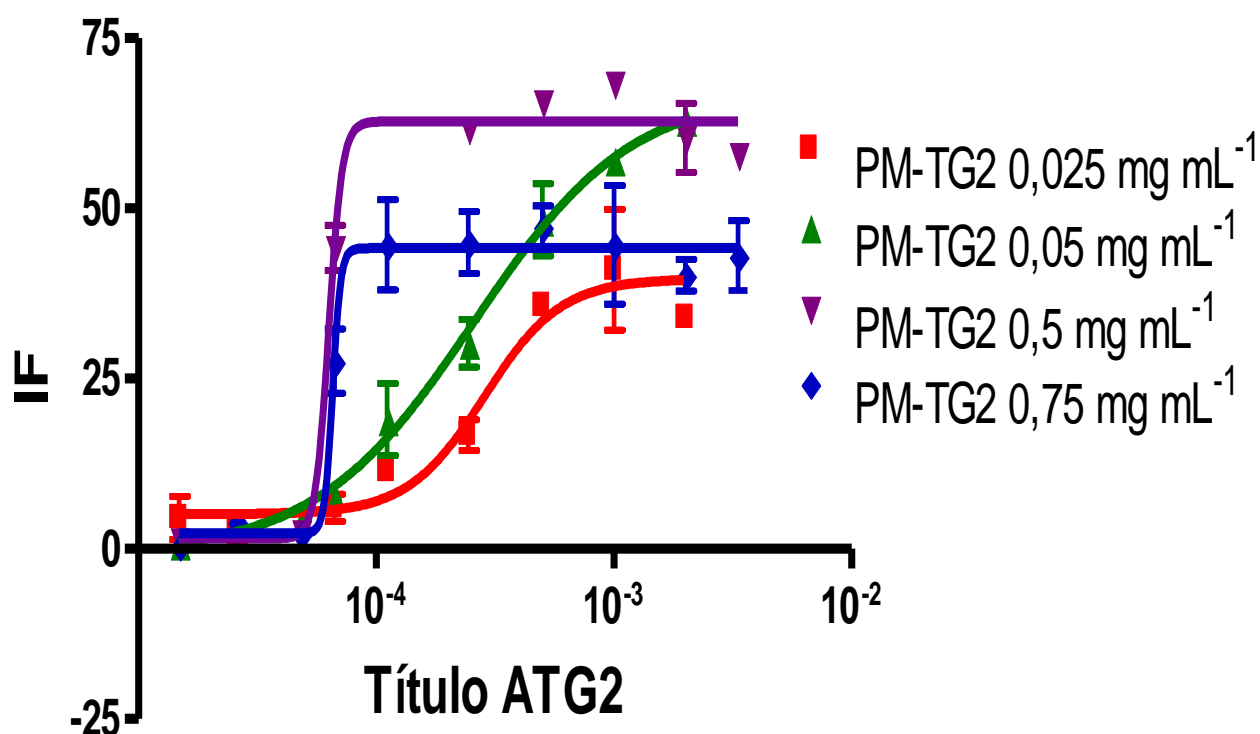


Figura 5.26. Optimización de la concentración de PM-TG2. En el ensayo indirecto, el título antiIgG cabra-HRP fue 1:20000. Las barras de error muestran una desviación estándar para n=3.

La curva para la concentración de PM-TG2 de 0,025 mg mL⁻¹ muestra la menor sensibilidad (expresada como CE₅₀). Por otro lado, las lecturas de fluorescencia fueron muy imprecisas para las concentraciones de PM-TG2 de 0,5 y 0,75 mg mL⁻¹. Además la curva para 0,75 mg mL⁻¹ de PM-TG2 presentó una forma pronunciada y mostró menor lectura de fluorescencia que la curva a concentración de 0,5 mg mL⁻¹, a pesar de que, visualmente, el color en ambos ensayos fueron similares, indicando una posible desactivación o “quenching” de la fluorescencia causada por exceso de inmunoreactivos. Por otro lado, la curva con 0,05 mg mL⁻¹, de PM-TG2 presentó el más amplio intervalo dinámico (1:11000 a 1:1700 de título de ATG2) con los menores LD y CE₅₀ (1:18900 y 1:4150 de título de ATG2, respectivamente). Esta curva, además, tuvo el mejor valor de ajuste para la pendiente Hill (1,31), la cual fue cercana al valor de 1,0, que es el que presenta una curva estándar ideal, lo que sugiere una buena discriminación entre las concentraciones de ATG2 evaluadas (Motulsky y Christopoulos, 2004). Por lo tanto, se eligió la concentración de 0,05 mg mL⁻¹ de PM-TG2 para los posteriores ensayos.

RESULTADOS y DISCUSION

Tercero, otro parámetro a optimizar fue el título de antiIgG cabra-HRP, ya que éste debía encontrarse en un exceso para asegurar la completa reacción con la máxima cantidad de ATG2 que pueda ser capturada por las PM-TG2. Para ello, se construyeron curvas de calibración mediante la incubación de diferentes diluciones de anticuerpo antiIgG cabra-HRP, con diferentes diluciones de ATG2 a una concentración constante de PM-TG2 de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Además, al aplicar ANOVA no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los ensayos blancos (correspondientes a diferentes niveles de anticuerpo secundario en ausencia de ATG2). La **Figura 5.27** muestra las curvas de calibración construidas bajo estas condiciones experimentales.

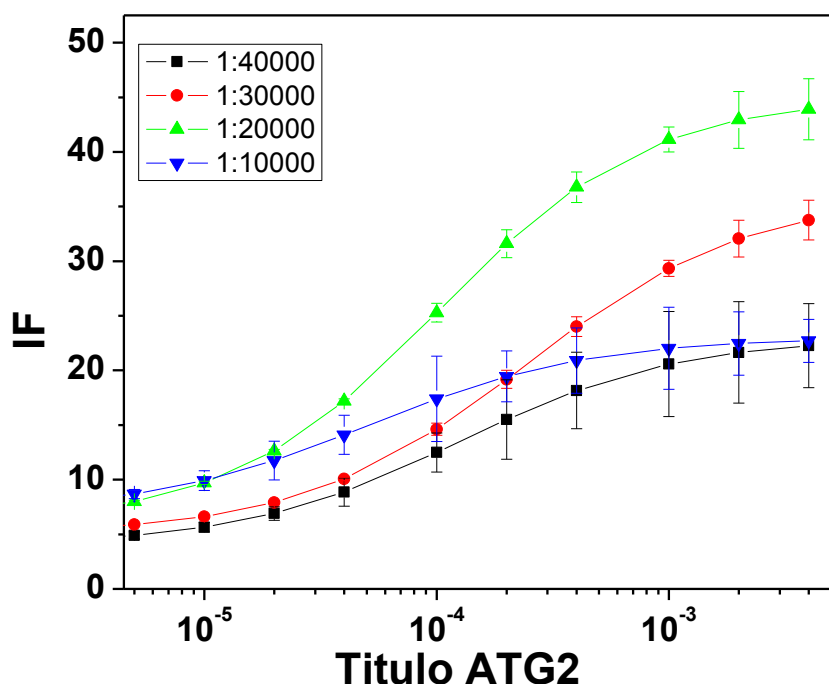


Figura 5.27. Curvas estándares de ATG2 contra diferentes títulos de anticuerpo antiIgG cabra-HRP: 1:40000 en negro; 1:30000 en rojo; 1:20000 en verde y 1:10000 en azul. Condiciones experimentales: [PM-TG2] $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$; [OPD] de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [H_2O_2] de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [Tritón X-100] de 2 % m/v; solución tampón de citrato-fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,0. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

La curva de calibración para el título de antiIgG cabra-HRP de 1:20000 presentó el mejor rendimiento analítico. Esta curva muestra el menor LD ($1:56300$ de ATG2), el más amplio intervalo dinámico (desde $1:55000$ a $1:2500$ de título de ATG2) y el mejor valor de pendiente Hill ($0,95$) (Motulsky y Christopoulos, 2004). La curva obtenida para el título de 1:10000 tuvo una forma aplanada, con el intervalo dinámico más estrecho. Las lecturas de fluorescencia bajo estas condiciones fueron menores a las esperadas. Varios fenómenos pueden generar este hecho, por ejemplo, un título alto de anticuerpo secundario y una etapa de lavado ineficiente puede causar una retención no específica del conjugado, por lo que la enzima generaría un producto fluorescente en

 RESULTADOS y DISCUSION

exceso que ocasionaría un “quenching” de la fluorescencia (Lakowicz, 2010). Sin embargo, en futuras investigaciones debería realizarse un estudio más exhaustivo para explicar este efecto.

5.3.4. Ensayos de validación

5.3.4.1. Calibración estándar y cifras de mérito

Se evaluó la linealidad de este método mediante el análisis de diez estándares de calibración, usando un algoritmo de regresión logística de cuatro parámetros para ajustar la respuesta (IF) en función del título de ATG2 total, debido a que la solución de anticuerpo estándar disponible comercialmente es un antisuero completo y no informa la concentración particular para cada inmunoglobulina. En la normalización se consideró a 0 (cero) como la menor IF y a 100 (cien) como la mayor IF. A partir de cinco curvas estándares, se evidenció “el mejor ajuste de la curva” mediante el R^2 promedio de 0,9684 y la pendiente Hill de 0,84. La curva estándar de título de ATG2 obtenida se muestra en la **Figura 5.28**.

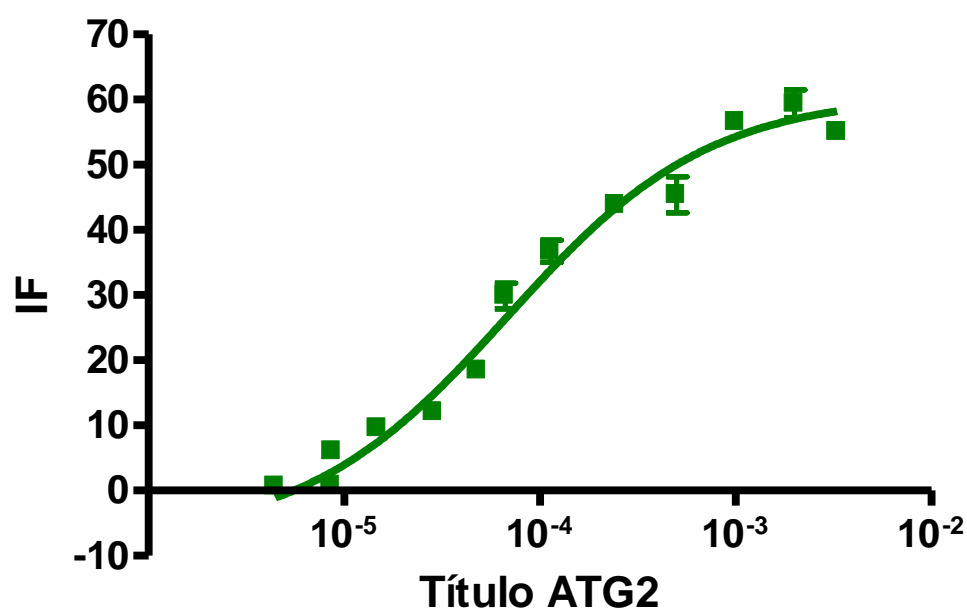


Figura 5.28. Curva estándar del título de ATG2 obtenida mediante el magneto inmunoensayo fluorescente en las condiciones óptimas. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n=3$.

Los LD y LC promedio fueron 1:74500 y 1:42700 de ATG2, respectivamente. El intervalo dinámico promedio desde 1:42700 a 1:2700 fue muy amplio, lo cual resulta ventajoso para la posterior aplicación de este método en la detección de ATG2 en sueros de pacientes potencialmente celíacos.

 RESULTADOS y DISCUSION

5.3.4.2. Precisión inter- e intra-ensayo

Los resultados inter- e intra-ensayo son presentados en la **Tabla 5.10**. Las R% estuvieron comprendidas desde 98% a 108% y desde 95% a 110% para los ensayos inter- e intra-ensayo, respectivamente. Las precisiones inter- e intra-ensayo expresadas como CV% variaron desde 16,8% a 20,0% y desde 9,8% a 19,4%, respectivamente. Estos valores son considerados aceptables acorde a las recomendaciones sobre los requerimientos de precisión en la fase de desarrollo de un método para su validación (DeSilva y col, 2003).

Tabla 5.10. Precisión intra- e inter-ensayo para los títulos de ATG₂

Estadísticos	Título de ATG ₂			
	1:40000	1:15000	1:4000	
Inter-ensayo	Media	1:40800	1:15900	1:3920
	CV%	16,8	20,0	17,3
	R%	102	106	98
Intra-ensayo	Media	1:41600	1:16500	1:3800
	CV%	9,8	17,4	19,4
	R%	104	110	95

5.3.4.3. Precisión intermedia

Se realizó la precisión intermedia en dos días, usando dos instrumentos de medida diferentes y dos lotes de PM-TG₂. Se prepararon las muestras a analizar y las soluciones estándares independientemente en cada día de ensayo. Los resultados de precisión intermedia se muestran en la **Tabla 5.11**. Como se trató de varias muestras independientes no paramétricas, se realizó un ensayo Kruskal-Wallis para comparar las recuperaciones en las seis diferentes condiciones, concluyendo que no existe diferencia significativa entre los grupos ($P > 0,05$). Se considera a estos resultados aceptables, ya que la media promedio fue de 100% y el CV% de 11% (DeSilva y col, 2003).

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.11. Resultados de los estudios de precisión intermedia

Día de ensayo	Instrumento ^a	Lote de TG2 ^b	R% (n = 3)
1	A	C	(106 ± 4)%
1	A	D	(94 ± 10)%
1	B	D	(107 ± 8)%
2	A	C	(115 ± 6)%
2	B	C	(84 ± 7)%
2	A	D	(94 ± 5)%
Media, CV%			100, 11

^aInstrumentos diferentes A y B, ^bLote de TG2: 6,28 mU mg PM⁻¹ por ensayo (C); 3,14 mU mg PM⁻¹ por ensayo (D)

5.3.4.4. Ensayos de interferencia por efecto matriz

Se compararon dos curvas de calibración para ATG2 preparadas en sueros y plasmas negativos, con una curva preparada en solución tampón de fosfato, con la finalidad de evaluar la posible interferencia de la matriz. Se obtuvieron CE₅₀ similares entre las curvas, como se puede ver en la Figura 5.29.

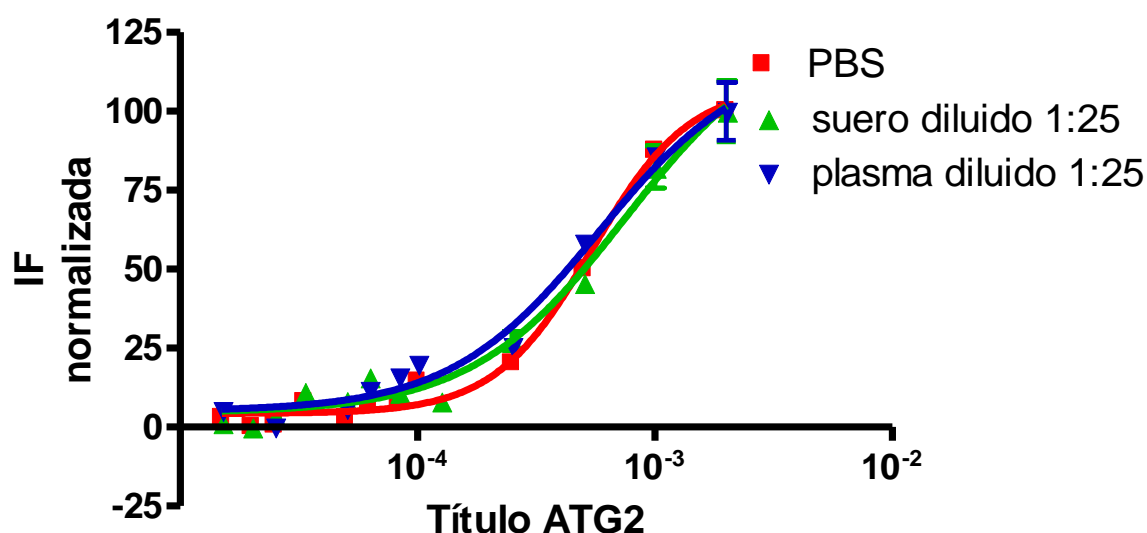


Figura 5.29. Curvas de calibración para diferentes matrices obtenidas mediante el magneto inmunoensayo fluorescente. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3.

Para la estimación del efecto de interferencia, se realizó la comparación de los CE₅₀ mediante ANOVA, el cual indicó que no existe diferencia significativa entre estos parámetros ($P > 0,05$).

RESULTADOS y DISCUSION

Considerando que las muestras biológicas analizadas fueron levemente diluidas, por lo que el contenido proteico en el ensayo era elevado; la ausencia de efecto matriz puede estar directamente relacionado con el uso de las partículas magnéticas. Es decir, que estas tuvieron un rol importante en la preconcentración y separación de los anticuerpos, a partir de muestras complejas de suero y plasma.

Se adicionaron tres títulos de ATG₂ (1:1000, 1:2000 y 1:4000) en sueros negativos diluidos 1:25 para evaluar su recuperación, obteniendo valores en el intervalo desde 82,2% a 114,3%. Por otro lado, para el mismo ensayo en plasma negativo diluido 1:25, se adicionaron otros tres títulos de ATG₂ (1:2000, 1:4000 y 1:8000), siendo las recuperaciones obtenidas desde 78,1% a 119,6%. Los CV% fueron menores al 20% en todos los casos (**Tabla 5.12**). Estos resultados son aceptables y confirman la ausencia del efecto de interferencia para las matrices estudiadas.

Tabla 5.12. Ensayos de recuperación de título de ATG₂ en matrices de suero y plasma.

	Estadísticos	Título de ATG ₂		
		1:4000	1:2000	1:1000
Suero	Media	1:3280	1:1804	1:1143
	CV%	9	4	20
	R%	82,2	90,2	114,3
	Estadísticos	Título de ATG ₂		
		1:8000	1:4000	1:2000
Plasma	Media	1:9568	1:3120	1:2082
	CV%	8	12	10
	R%	119,6	78,1	104,1

5.3.5. Ensayos serológicos

Como ya se mencionó anteriormente, se desarrolló y validó el magneto inmunoensayo fluorescente usando los ATG₂ disponibles comercialmente, es decir, el antisuero completo desarrollado en cabra. Consecuentemente, para demostrar la aplicabilidad del ensayo propuesto para la detección de ATG₂ humana en muestras de pacientes potencialmente celíacos, se debió cambiar el anticuerpo antiIgG cabra-HRP por un anticuerpo antiIgA humana-HRP.

Para estimar las uniones no específicas durante el inmunoensayo, se evaluaron lotes de PM con diferentes analitos inmovilizados (A) PM-TG₂ y (B) PM-BSA según el protocolo detallado en la sección 4.3.1. A cada lote de PM modificada se lo hizo reaccionar con una solución tampón de citrato-fosfato de 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0 (ensayo 1); un suero negativo de una persona sana (ensayo 2) y un suero negativo de una persona sana al cual se le adicionó un control positivo fuerte del ensayo ELISA, para lograr aproximadamente 20 U (Unidades arbitrarias de anticuerpo) de ATG₂-IgA

RESULTADOS y DISCUSION

(ensayo 3). Posteriormente, se adicionó antiIgA humana-HRP y el sistema de revelación en las condiciones anteriormente seleccionadas. La **Figura 5.30** muestra los resultados obtenidos.

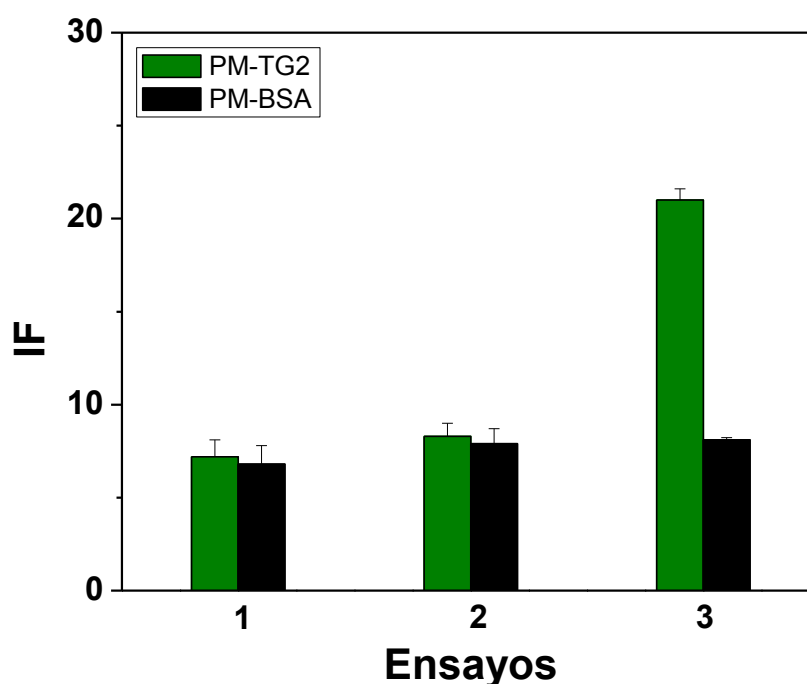


Figura 5.30. Evaluación de la presencia de uniones no específicas. Las condiciones experimentales fueron: [PM-BSA] = 0,05 mg mL⁻¹ y [PM-TG2] = 0,05 mg mL⁻¹; 1:20000 de antiIgA humana-HRP; [OPD] = 1 x 10⁻³ mol L⁻¹; [H₂O₂] = 1 x 10⁻³ mol L⁻¹; [Tritón X-100] = 2% m/v; solución tampón citrato-fosfato de 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0.

Las barras de error muestran la desviación estándar para n=3.

Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre los resultados del ensayo 1, lo cual indica que los niveles de absorción no-específica de anticuerpo secundario son similares para TG2 y BSA inmovilizadas sobre las PM. Evidencias similares se ven en los resultados del ensayo 2, por lo tanto, los niveles de absorción del anticuerpo secundario no específica en presencia de una matriz de suero es también bajo para los dos lotes de PM inmovilizadas. Por otro lado, acorde a los resultados del ensayo 3, puede ser claramente distinguido el suero al que se le realizó la adición de ATG2. Además, el valor de recuperación de esta muestra control con 20 U de ATG2-IgA fue 105,5% (n = 6), con un CV% menor al 7%. Basado en estos hallazgos, se considera que la TG2 de cobayo inmovilizada sobre las PM actuaría eficientemente como antígeno de captura para la detección específica de los anticuerpos ATG2. Finalmente, teniendo en cuenta que estos resultados fueron preliminares, en el futuro se debería determinar la especificidad de la metodología, reemplazando la TG2 de cobayo por una TG2 recombinante humana, debido a que estas presentan una homología del 81 % como se describiera anteriormente en la sección 2.4.2. Además, se debería analizar un mayor número de sueros de pacientes no-celíacos que padezcan alguna enfermedad autoinmune o problemas gastrointestinales.

 RESULTADOS y DISCUSION

Posteriormente, se analizaron las muestras de pacientes tanto con el magneto inmunoensayo fluorescente como con el ensayo ELISA comercial. Para comparar los resultados obtenidos mediante los dos métodos, se elaboraron dos curvas de calibración en el intervalo 7,3 a 30 U de ATG₂, una en función de la IF y la otra en función de la absorbancia. Para ello, el control positivo del ensayo ELISA óptico, que tiene un nivel de actividad de ATG₂ de 150 U, se utilizó como solución estándar para asignar a cada muestra un valor de unidades de ATG₂. La ecuación de regresión lineal obtenida con el magneto inmunoensayo fluorescente fue $IF = 1,299 C_{ATG_2}(U) - 6,212$, con un LD de 7 U usando el criterio de $3,3 \times DE_{\text{blanco}}$ (desviación estándar del blanco) ($n = 15$, $R^2 = 0,9905$) y un CV% de 6,8% ($n = 6$) para una muestra control de 10 U de ATG₂-IgA. Por otro lado, para el ensayo ELISA, la regresión lineal fue $A = 0,00674 C_{ATG_2}(U) + 0,1206$ con un LD de 15 U usando el criterio de $3,3 \times DE_{\text{blanco}}$ ($n = 12$, $R^2 = 0,9971$) y un CV% de 5,9% ($n = 6$) para una muestra control de 20 U. Los valores de sensibilidad analítica fueron 1,57 y 0,36 U⁻¹ para el magneto inmunoensayo fluorescente y el ELISA óptico, respectivamente. Esto demuestra que el método propuesto es aproximadamente cuatro veces más sensible que el ensayo ELISA estándar. Los valores de recuperación para las muestras controles (10 y 20 U) fueron 97,7 y 105,4% ($n = 6$), respectivamente, dando valores de CV% menores al 7% en los dos casos; estos valores son considerados aceptables según los criterios establecidos (DeSilva y col, 2003).

A continuación, 29 y 19 sueros de pacientes celíacos y no-celíacos, respectivamente, fueron analizados mediante el magneto inmunoensayo fluorescente y el ensayo ELISA. Mientras que para el ensayo ELISA comercial, se utilizó una dilución de suero de 1:100 (según lo indicado en el protocolo de análisis); las respuestas fluorescentes de las muestras se evaluaron en el intervalo de diluciones desde 1:100 a 1:10 para determinar el intervalo dinámico lineal del magneto inmunoensayo fluorescente. Un factor de dilución de 1:50, correspondiente al CE₅₀ de la curva (ver **Figura 5.31**), se eligió como dilución más apropiada para el análisis del resto de las muestras.

RESULTADOS y DISCUSION

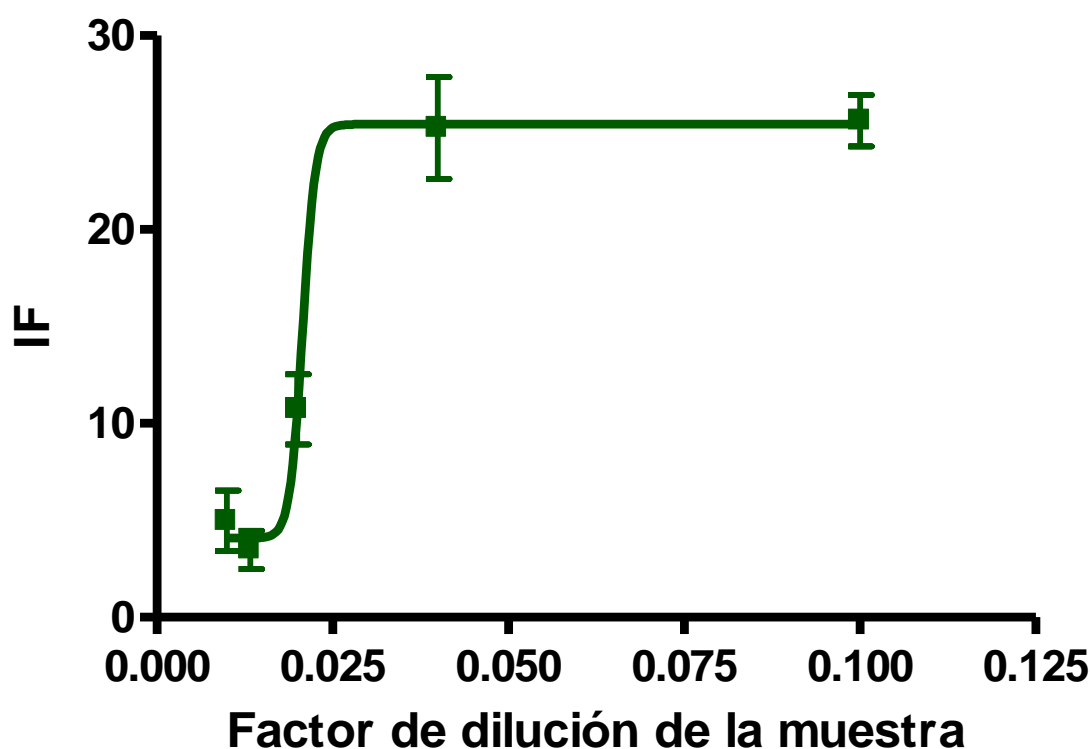


Figura 5.31. Selección del factor de dilución de la muestra. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n=3$.

El diagnóstico de la enfermedad celíaca puede ser determinado mediante un ensayo cualitativo, donde las muestras son dicotomizadas en positivas o negativas, en función al valor de corte en una escala continua obtenida mediante las curvas ROC.

Antes de evaluar los datos con las curvas ROC, es necesario asegurar la existencia de diferencia entre los grupos (Faustini y col., 2007). Por lo tanto, se aplicó el ensayo U de Mann-Whitney para dos muestras independientes no paramétricas, donde se obtuvo que las medias de los grupos presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) (Siegel y Castellan, 1998).

Posteriormente, con los resultados en U de ATG2 de las 48 muestras de suero se construyó la curva ROC que se muestra en la **Figura 5.32**, cuyos valores de SE y ES fueron 96,6% [$IC_{95\%} = 82,2 - 99,9\%$] y 94,7% [$IC_{95\%} = 74,0 - 99,9\%$], respectivamente. Estos dos valores corresponden a un valor de corte de 8,1 U de ATG2. Este valor es más estricto que otros criterios documentados en bibliografía, como el obtenido para el promedio de la señal del blanco (\overline{X}_{blanco}) más dos DE_{blanco} , considerando blanco a las muestras negativas (9,8 U) (Richardson y col., 1983) y, el obtenido aplicando el ensayo t de una cola con un nivel de confianza del 99% (11 U) (Pividori y col., 2009).

RESULTADOS y DISCUSION

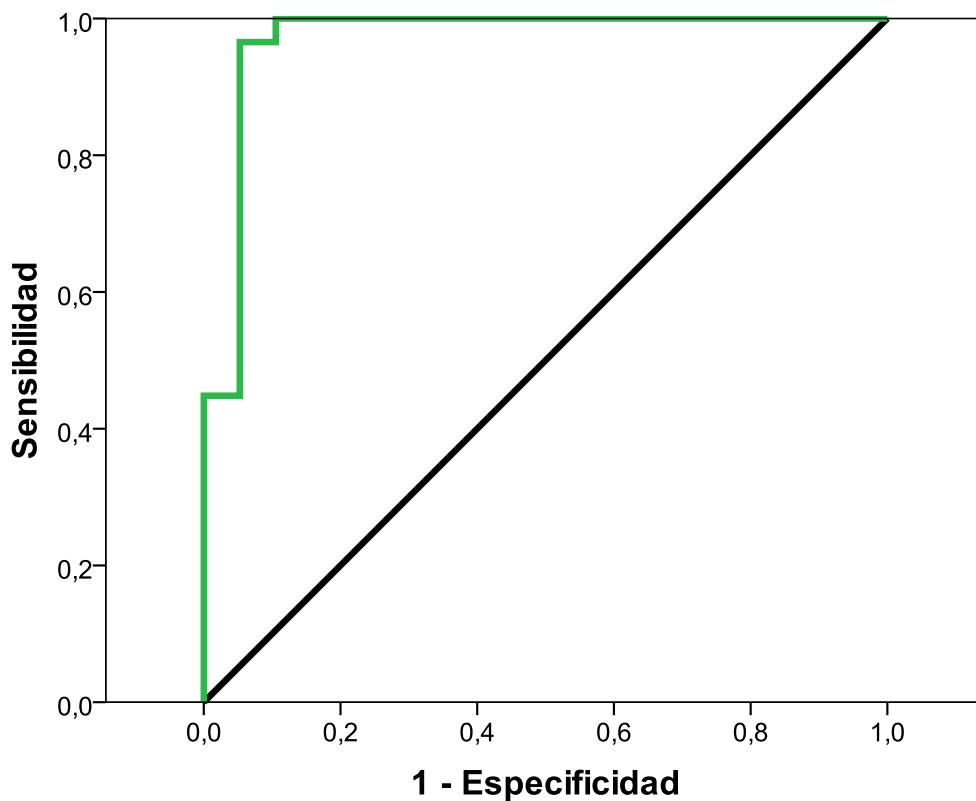


Figura 5.32. Curva ROC para seleccionar el valor de corte de ATG2. En diagonal: línea indiferente.

Por otro lado, la eficiencia global del método, indicada con el ABC fue de 0,97 [$IC_{95\%} = 0,874 - 0,999$] y ha permitido clasificar al método como “altamente exacto” (Greiner y col., 2000). Las pruebas de razón de similitud calculadas para 8,1 U de ATG2-IgA como valor de corte fueron +LR = 18,34 y -LR = 0,036, los cuales se clasifican como “muy útiles” según las normativas (Chien y Khan, 2001). El J calculado fue de 0,88 indicando una eficacia del biomarcador relativamente grande (Schisterman y col., 2005).

La correspondencia de los resultados predichos mediante el ELISA óptico y los obtenidos mediante el magneto inmunoensayo fluorescente, acorde al valor de corte del análisis ROC se resumen en la **Tabla 5.13**.

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.13. Tabla de contingencia para la detección de enfermedad celíaca mediante el ELISA y el magneto inmunoensayo fluorescente (valor de corte de ATG2 = 8,1 U)

		ELISA		Total
		Positivo	Negativo	
Magneto inmunoensayo fluorescente	Positivo (ATG2 > 8,1 U)	28	2	31
	Negativo (ATG2 ≤ 8,1 U)	1	17	17
	Total	29	19	48

$\chi^2 = 36,2$ con $P < 0,05$ - Kappa de Cohen = 0,868.

La SE y la ES, calculadas a partir de la tabla de contingencia, fueron 96,6% y 89,5%, respectivamente, siendo estos valores similares a los obtenidos a partir de la curva ROC. Los valores de VP_{pos} y VP_{neg} fueron mayores al 90%, indicando que menos del 10% de los sueros clasificados como positivos y negativos resultaron falsos positivos y negativos, respectivamente. Además, la eficiencia calculada como $[(vp + vn)/n]$ fue 93,7%, indicando una buena correlación entre las metodologías; con un valor de concordancia de 0,868 obtenido mediante el coeficiente Kappa de Cohen. Este coeficiente indica una correlación “excelente” según las directrices publicadas (Khan y Chien, 2001).

5.4. MAGNETO INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-TG2 EN ENFERMOS CELIACOS

En esta sección se desea desarrollar una metodología para detectar anticuerpo anti-TG2, presente en enfermos celíacos, basados en la detección electroquímica, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente con el magneto inmunoensayo fluorescente. La ventaja de la detección electroquímica radica en el menor costo de la instrumentación y en la abundante evidencia que documenta la factibilidad de miniaturizar los dispositivos.

5.4.1. Caracterización de los electrodos de trabajo

Con la finalidad de desarrollar una metodología analítica confiable que reúna las características impulsadas por la tendencia actual de la electrónica, es decir, dispositivos pequeños, portátiles y fáciles de manipular, se diseñó un magneto inmunosensor electroquímico, que contribuya al diagnóstico de la enfermedad celíaca. En las etapas de optimización y evaluación del rendimiento analítico del prototipo en desarrollo se utilizó una celda electroquímica clásica, cuyos electrodos de trabajo fueron los c-GEC, de manera de poder realizar determinaciones múltiples y seleccionar las condiciones de trabajo que generen la mayor respuesta analítica. En la etapa posterior, donde se

RESULTADOS y DISCUSION

evaluaron muestras provenientes de pacientes potencialmente celíacos, las condiciones optimizadas fueron transferidas a los SPE. Cabe destacar que, en ambos transductores se mantiene la misma naturaleza química, ya que el electrodo de trabajo en ambos casos fue construido a base de material carbonoso. La implementación de los SPE permite reducir el tamaño del prototipo, utilizar pequeño volumen de reactivos y muestras y lograr un desarrollo con posibilidad de ser acoplado a un dispositivo de lectura de la señal electroquímica portátil, de pequeñas dimensiones, que permita realizar el diagnóstico de la enfermedad celíaca en un corto período de tiempo y en cualquier centro de salud.

Para ello, inicialmente, se realizaron una serie de caracterizaciones de los c-GEC y SPE, que posteriormente, serán utilizados como transductores electroquímicos del magneto inmunosensor en desarrollo.

La resistencia superficial de los electrodos de trabajo se determinó, entre el centro y el borde de la superficie electródica, debido a que este parámetro es una estimación indirecta de la capacidad conductiva de los electrodos. Generalmente, un electrodo con baja resistencia eléctrica desarrolla corrientes residuales bajas y, consecuentemente, una alta relación señal-ruido, lo cual es favorable para la obtención de buenos límites de detección (Céspedes y col., 1996). Experimentalmente, se obtuvieron resistencias de 5655Ω (CV% = 14,9%, n = 10) y 126Ω (CV% = 8,6%, n = 6) para los electrodos c-GEC y SPE, respectivamente. Los electrodos c-GEC, con una relación grafito:conductor de 20:80 mostraron una mayor resistencia o menor capacidad conductiva respecto a los SPE. Nosotros consideramos que esta menor resistencia de los SPE se debe a que éstos se construyeron con una mayor proporción de material conductor o tipo de grafito utilizado (micro o nanoestructurado) que los electrodos c-GEC. Además, la pasta o tinta conductora en los electrodos comerciales (SPE) preparados industrialmente puede estar, probablemente, más homogénea y conductiva (por el tipo de grafito) que los electrodos preparados mediante mezcla manual. La medida de la resistencia superficial de los electrodos de trabajo se utilizó, además, para evaluar tanto la reproducibilidad como la regeneración de los electrodos después de la aplicación. La variabilidad (expresada como CV%) de la resistencia inter-electrodo se estudió debido a que los electrodos c-GEC fueron regenerados mediante etapas de pulido (ver la sección 4.4.3). La variabilidad global de diez electrodos fue 15,5% después de que los mismos sean sometidos a cuatro etapas de pulido con una resistencia promedio de 5445Ω , mientras la variabilidad para cada electrodo no excedió 10%. Además del estudio del efecto del pulido sobre la respuesta electroquímica de los c-GEC, se evaluó la señal electroquímica mediante VOC de una solución 2 mmol L^{-1} de ferricianuro de potasio luego de cuatro etapas de pulido. Para ello, a dos lotes de electrodos c-GEC se les midió tanto la resistencia superficial como la IC y el E en el pico de reducción de una solución de ferricianuro de potasio después de cuatro etapas de pulido. Para el lote I de electrodos, las **Figuras 5.33a y b** muestran los

RESULTADOS y DISCUSION

promedios de los potenciales y las IC en el pico de reducción, respectivamente, junto con los promedios de la resistencia superficial para cada electrodo luego de los cuatro pulidos.

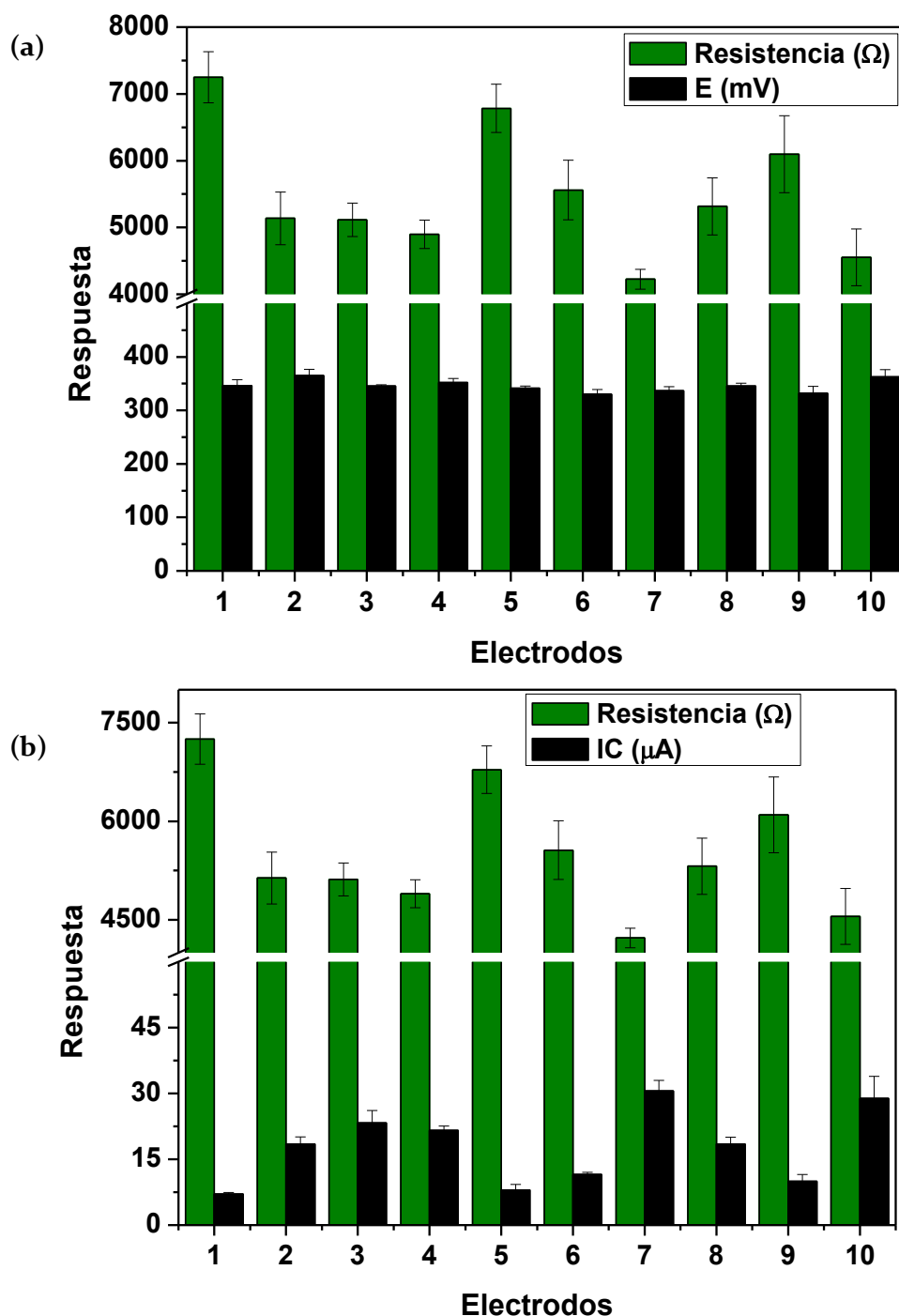


Figura 5.33. (a) Resistencia superficial del electrodo c-GEC y E en el pico de reducción de la solución de ferricianuro de potasio de 2 mmol L^{-1} y $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, y (b) Resistencia superficial del electrodo c-GEC e IC en el pico de reducción de la solución anterior. Se obtuvo el pico de la intensidad de corriente mediante VOC en un intervalo de E desde 600 a 0 mV contra Ag/AgCl en una solución 3 mol L^{-1} NaCl como electrodo de referencia.

RESULTADOS y DISCUSION

Mientras el potencial en el pico de reducción permanece constante en todos los electrodos, con un valor de 346 mV (CV% = 3,9%), los picos de IC de reducción se relacionaron inversamente con los valores de resistencia. A pesar de que los promedios de intensidad de corriente inter-electrodo fueron muy variables en el intervalo de 7,1 a 30,6 mA, el CV% fue menor al 10% (n = 4) para los ensayos intra-electrodos. El otro lote mostró la misma tendencia.

Con la finalidad de disminuir la variabilidad (expresada como CV%) de los electrodos se clasificaron, para las posteriores aplicaciones, en tres grupos de acuerdo a los valores de intensidad de corriente: el grupo I conformado por los electrodos 1, 5, 6 y 9, con un valor de IC promedio de 10 μ A (CV% = 15,3%), el grupo II formado por los electrodos 2, 3, 4 y 8, con un valor de IC promedio de 20 μ A (CV% = 10,9%) y el grupo III, constituido por los electrodos 7 y 10, con un valor de IC promedio de 30 μ A (CV% = 4,0%). Los electrodos c-GEC del grupo II junto con otros seis electrodos del lote II se seleccionaron como transductores en este estudio. Estos diez electrodos presentaron un promedio de la IC de 19 μ A (CV% = 11,6%). Los electrodos deben tener respuesta electroquímica reproducible, con baja variabilidad para garantizar la reproducibilidad como transductor del magneto inmunosensor. En cuanto a la estabilidad de la superficie del electrodo, los electrodos c-GEC del grupo I se estudiaron mediante el mismo procedimiento cada 15 días durante 3 meses. Como resultados, los electrodos c-GEC pueden ser usado al menos por este período, debido a que ningún cambio significativo se observa sobre su superficie y sus respuestas presentaron una variabilidad similar a la variabilidad global acorde al ANOVA ($P > 0,05$).

También se estudiaron los comportamientos electroquímicos de los electrodos c-GEC y SPE. Para ello, los voltamogramas cíclicos de una solución de ferricianuro de potasio se realizaron usando los dos transductores. En la **Figura 5.34** se pueden ver los voltamogramas correspondientes a ambos transductores.

RESULTADOS y DISCUSION

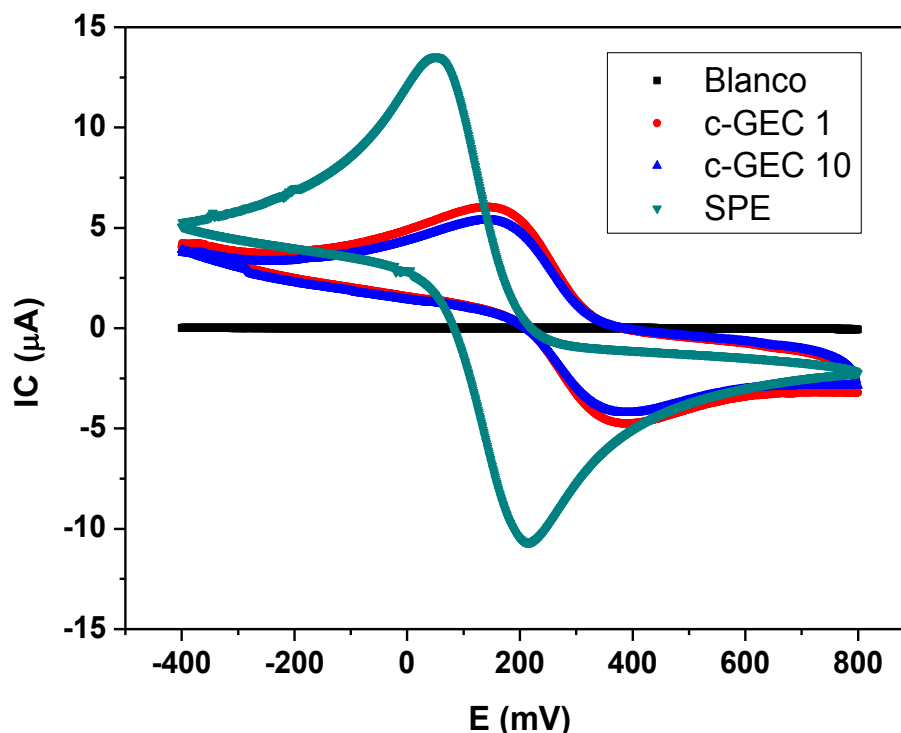


Figura 5.34. Voltamogramas cíclicos obtenidos mediante diferentes electrodos en una solución de ferricianuro de potasio de 2 mM y 0,10 mol L⁻¹ NaCl. Intervalo de E: -0,4 a 0,8 V en función del electrodo de Ag/AgCl en solución de NaCl de 3 mol L⁻¹ como electrodo de referencia y Ag como electrodo de pseudo-referencia, para c-GEC y SPE respectivamente. Velocidad de barrido: 0,1 V s⁻¹. Electrodo SPE (en verde); electrodo c-GEC desnudo (en rojo); el mismo electrodo c-GEC después de su empleo como transductor del magneto inmunosensor para la detección de ATG₂, y una etapa de pulido subsiguiente (en azul); electrodo c-GEC desnudo en solución de NaCl 0,10 mol L⁻¹ (en negro). Para el inmunoensayo, la solución de PM-TG₂ fue 1,5 mg mL⁻¹, ATG₂ diluido 1:9200 y el anticuerpo antiIgG cabra-HRP diluido 1:20000.

SPE presentó máximos de corriente de reducción y oxidación más altos que los electrodos c-GEC del lote I. Por otro lado, la separación entre los potenciales de los picos de oxidación y reducción fue 0,155 V para SPE y 0,216 V para los electrodos c-GEC. Estos valores fueron aproximadamente constante entre lotes y mayores que 0,059 V/n (correspondiente al valor teórico que, generalmente, se obtiene con transductores metálicos). Esto se correlaciona con una menor transferencia electródica debido al material a base de carbono con el cual fueron fabricados ambos transductores.

Con respecto a la regeneración de los electrodos c-GEC, se estudió el comportamiento electroquímico de un electrodo c-GEC del lote I después de cada inmunoensayo. Para ello, el electrodo se utilizó como transductor en los magnetos inmunosensores para la detección de ATG₂, puliendo previo a cada medida. Finalmente, éste se usó para realizar una voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio en un total de diez ciclos. En la **Figura 5.34** se muestran los voltamogramas correspondientes a la solución de ferricianuro con el electrodo c-GEC desnudo (en

RESULTADOS y DISCUSION

rojo) y con el mismo c-GEC utilizado como transductor del magneto inmunosensor para la detección de ATG₂, previamente sometido a una etapa de pulido (en azul). Los promedios de los picos de corriente de reducción y oxidación presentaron un CV% menor al 16%. Esto indica que las PM capturadas durante el inmunoensayo no alteran la superficie del electrodo y, por lo tanto, se confirma que la regeneración de la superficie del electrodo es efectiva después de la etapa de pulido.

La inducción magnética de los electrodos y conectores es otro parámetro importante que contribuye al rendimiento analítico del inmunosensor. Por lo tanto, con el fin de medir este parámetro, una sonda axial de un teslámetro se colocó en el centro de la superficie del electrodo o en el centro de la superficie del magneto de neodimio de los conectores. Estas inducciones magnéticas se midieron antes y después del armado de los conectores c-GEC y SPE. Los porcentajes de inducción residual de $22,3 \pm 1,3$ ($n = 10$) y 56,1%, respectivamente, se obtuvieron para cada diseño. La inducción residual depende de la distancia de la sonda del teslámetro al magneto y de la naturaleza del medio de separación. Por lo tanto, los resultados obtenidos son valores coherentes a lo esperado, ya que la inducción residual es menor cuando se incrementa la distancia desde la superficie del electrodo al magneto. En los electrodos c-GEC, la distancia desde la superficie del electrodo al magneto es de 2 mm, esta distancia está constituida por un espeso compósito de grafito-resina epoxi; mientras en los SPE, la distancia de separación es menor a 1,0 mm y está constituida por un sustrato cerámico y una fina capa conductiva de tinta. Consecuentemente, estas evidencias indican que los SPE tendrían mayor poder para retener las partículas magnéticas y favorecerían la sensibilidad del ensayo.

Las áreas efectivas de los c-GEC y los SPE fueron de 0,342 y 0,144 cm² para $n = 10$, respectivamente, obtenidas para una solución 2 mM de ferricianuro de potasio mediante cronoamperometría a través de la ecuación de Cottrell (Bard y Faulkner, 2001), usando un valor de $7,26 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ como coeficiente de difusión del ferricianuro de potasio (Petrovic, 2000). Este parámetro es directamente proporcional a la intensidad de corriente y está estrechamente relacionado al área geométrica y a la naturaleza y morfología del material electrodo. En este caso la mayor área efectiva de los SPE puede ser atribuida sólo al material del electrodo, ya que las áreas geométricas fueron débilmente diferentes (0,196 cm² y 0,126 cm² para los electrodos c-GEC y SPE, respectivamente). Debido a que la variabilidad de las áreas efectivas dentro de un mismo lote de electrodos era pequeña (CV% < 5%), las posteriores respuestas electroquímicas no se tomaron como densidad de corriente sino en unidad de intensidad de corriente.

RESULTADOS y DISCUSION

5.4.2. Optimización del magneto inmunosensor electroquímico

El uso de partículas magnéticas como soporte sólido es una herramienta relativamente nueva, ampliamente documentada en bibliografía (Alefantis y col., 2004; Centi y col., 2005; Yu y col., 2006). Por lo tanto, en este trabajo se desarrolló y optimizó un magneto inmunosensor electroquímico para la detección de ATG₂. El tiempo de incubación, la concentración del detergente, la fuerza iónica y el pH se mantuvieron en las condiciones indicadas en bibliografía (Laube y col., 2011).

Primero, se aplicó el sistema de detección HRP-OPD-H₂O₂ seleccionado en la sección 5.1.4, en las condiciones óptimas detalladas en la sección 5.1.2.

Segundo, se evaluó la concentración PM-TG₂ en el intervalo desde 0,25 a 1,00 mg mL⁻¹, en presencia de ATG₂ desde un título de 1:2400 a 1:800 y 1:20000 de anticuerpo antiIgG cabra-HRP. Se obtuvo un incremento en la corriente con la cantidad de PM hasta 0,75 mg mL⁻¹ de PM-TG₂ (ver **Figura 5.35**), en donde se logró la mayor discriminación entre los diferentes títulos de ATG₂. Concentraciones mayores de PM-TG₂ generaron una leve disminución en la corriente, probablemente debido a una mayor resistencia a la transferencia electródica.

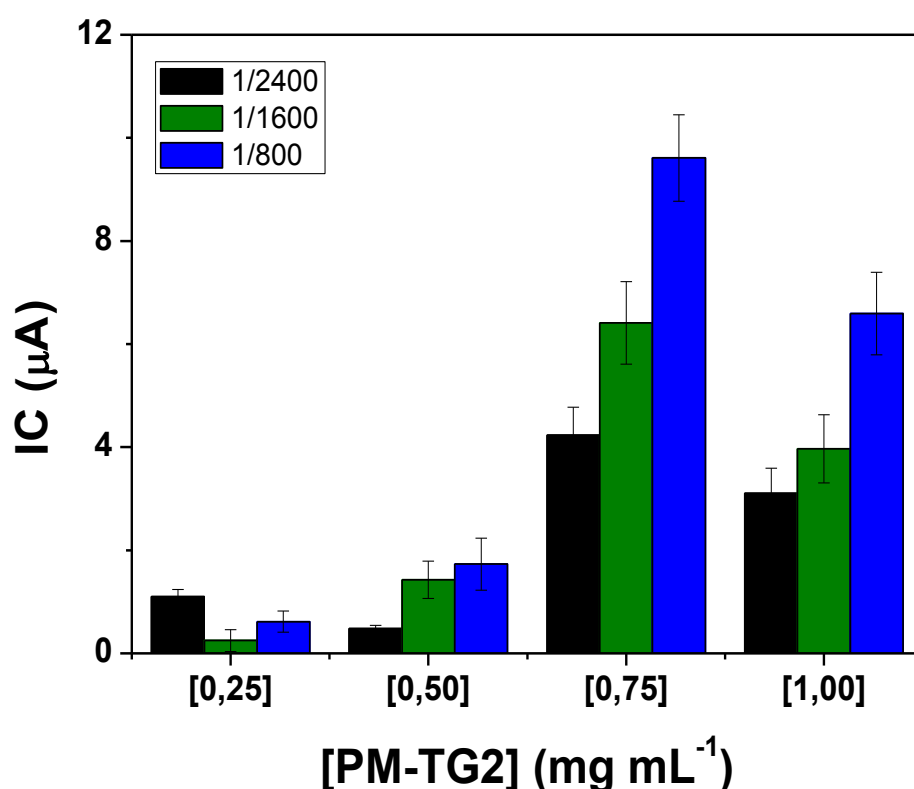


Figura 5.35. Optimización de la concentración de PM-TG₂ a 1:20000 de anticuerpo antiIgG cabra-HRP.

Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

RESULTADOS y DISCUSION

Tercero, se optimizó el título de antiIgG cabra-HRP, para lo cual se ensayaron $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG₂ y 1:1600 de ATG₂ con títulos de antiIgG cabra-HRP variables desde 1:30000 a 1:10000. La corriente alcanzó un valor constante a partir de 1:20000 de título de antiIgG cabra-HRP, como se puede ver en la **Figura 5.36**, indicando que ese nivel es lo suficientemente alto para saturar todos los ATG₂ presentes en la solución.

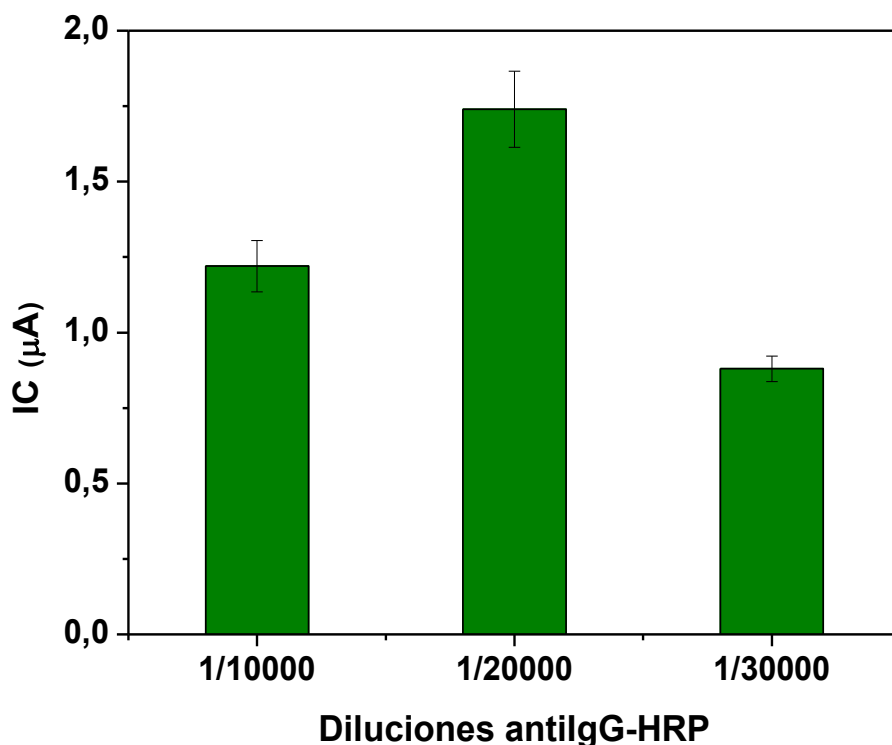


Figura 5.36. Optimización de la dilución de antiIgG cabra-HRP a $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG₂ y 1:1600 de ATG₂. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Cuarto, el tiempo de reacción en la lectura electroquímica se seleccionó para el inmunosensor, en donde la concentración de PM-TG₂ se mantuvo en $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, la dilución de ATG₂ en 1:1670 y la dilución de antiIgG cabra-HRP en 1:20000. La **Figura 5.37** muestra la cinética de la respuesta del inmunoensayo en un tiempo de 600 s, muestreado cada 30 s. El tiempo seleccionado fue 150 s, correspondiendo al tiempo a partir del cual la respuesta se estabiliza.

RESULTADOS y DISCUSION

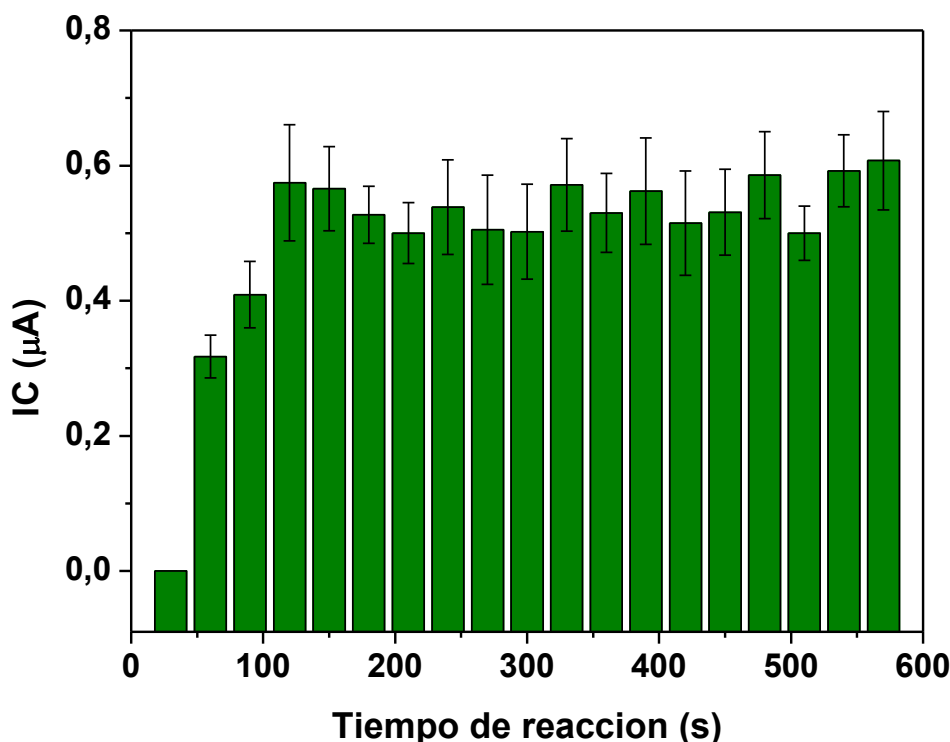


Figura 5.37. Selección del tiempo de reacción. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Quinto, se estudió la estabilidad de las PM-TG₂ mediante el magneto inmunoensayo fluorescente como se detalló en la sección 5.3.1, para lo cual las PM-TG₂ se conservaron a 4 °C como lo había recomendado el fabricante. La estabilidad de la respuesta se evaluó semanalmente durante un mes, en cuyo período no se observó ningún cambio significativo. Después de este período, la respuesta del inmunoensayo disminuyó 17% aproximadamente del valor original. Por otro lado, los anticuerpos y sustratos se prepararon antes de cada ensayo, ya que una disminución significativa de la respuesta se observó al transcurso de 12 h.

Finalmente, se evaluó el efecto del O₂ frente a la respuesta electroquímica, en las condiciones optimizadas previamente, es decir, 0,75 mg mL⁻¹ de PM-TG₂, 1:1600 de ATG₂, 1:20000 de antiIgG cabra-HRP y 2-1 mM de los sustratos OPD-H₂O₂ en solución tampón de fosfato a pH 6,0. Para ello, se realizaron dos tipos de ensayos, uno en condiciones normales de O₂ y el otro eliminando el O₂, mediante el burbujeo de N₂ en el medio de reacción. Las corrientes obtenidas fueron [0,6 ± 0,1] y [0,68 ± 0,03] µA para el medio con y sin O₂, respectivamente. Al comparar los ensayos mediante la prueba de comparación de medias no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$); por lo tanto, las determinaciones posteriores se realizaron en condiciones normales de O₂.

 RESULTADOS y DISCUSION

5.4.3. Ensayos de validación

La curva estándar en la **Figura 5.38** representa la media de cinco curvas, obtenidas separadamente, cada una con triplicado de concentración de cada nivel de estándar. Los valores de intensidad de corriente de reducción se graficaron en función de los títulos de ATG₂.

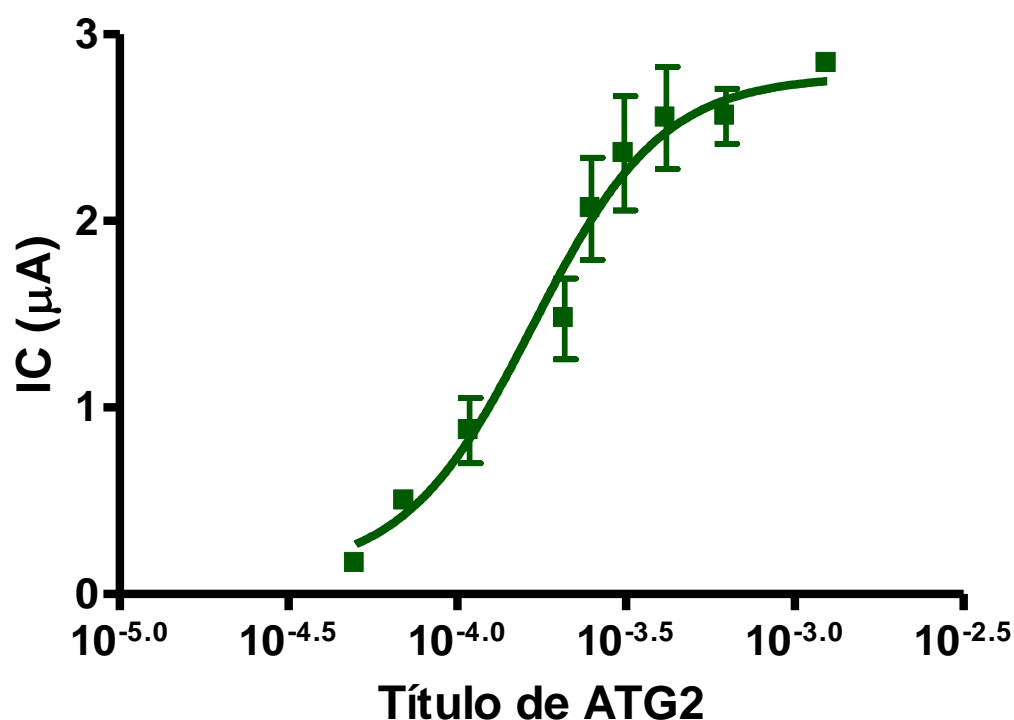


Figura 5.38. Curva estándar del título de ATG₂ obtenida mediante el magneto inmunosensor electroquímico en las condiciones óptimas. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3).

Como resultado de la curva se obtuvo “un buen ajuste”, evidenciado por un R^2 promedio de 0,8076 y una pendiente Hill de 2,3. Los LD y LC promedios fueron 1:14200 y 1:10300 de ATG₂, respectivamente. El intervalo dinámico promedio desde 1:10300 a 1:3000 fue muy amplio, con un CE₅₀ promedio de 1:5700, lo cual resultó beneficioso para la posterior aplicación de este método en la detección de ATG₂ en pacientes posiblemente celíacos.

Los resultados de precisión inter- e intra-ensayo se presentan en la **Tabla 5.14**. Las R% oscilaron desde 103% a 114% y desde 87% a 105%, con CV% comprendidos entre 10 % a 13 % y entre 14 % a 16 % para la precisión intra- e inter-ensayo, respectivamente. Los valores de precisión se consideraron aceptables para esta clase de ensayo biológico (DeSilva y col, 2003).

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.14. Precisión intra- e inter-ensayo para los títulos de ATG₂

Estadísticos	Título de ATG ₂			
	1:9200	1:4800	1:3200	
Intra-ensayo	Media	1:8770	1:4200	1:3120
	CV%	12	10	13
	R%	105	114	103
Inter-ensayo	Media	1:10541	1:4130	1:3040
	CV%	16	14	15
	R%	87	102	105

Se construyeron curvas de calibración en tres matrices diferentes: PBS, suero y plasma negativos diluidos 1:25 para evaluar el efecto de la interferencia de la matriz (Figura 5.39), obteniendo CE₅₀ similares, es decir, 1:3500, 1:3200 y 1:3000, respectivamente. Para la estimación de este efecto, la comparación de los valores de CE₅₀ se realizó con un ensayo ANOVA, el cual indicó que no existió diferencia significativa entre ellos ($P > 0,05$). Nuevamente, la ausencia del efecto matriz puede estar relacionada con el uso de las partículas magnéticas, que permiten recuperar eficientemente a los ATG₂ a partir de matrices complejas con alto contenido proteico.

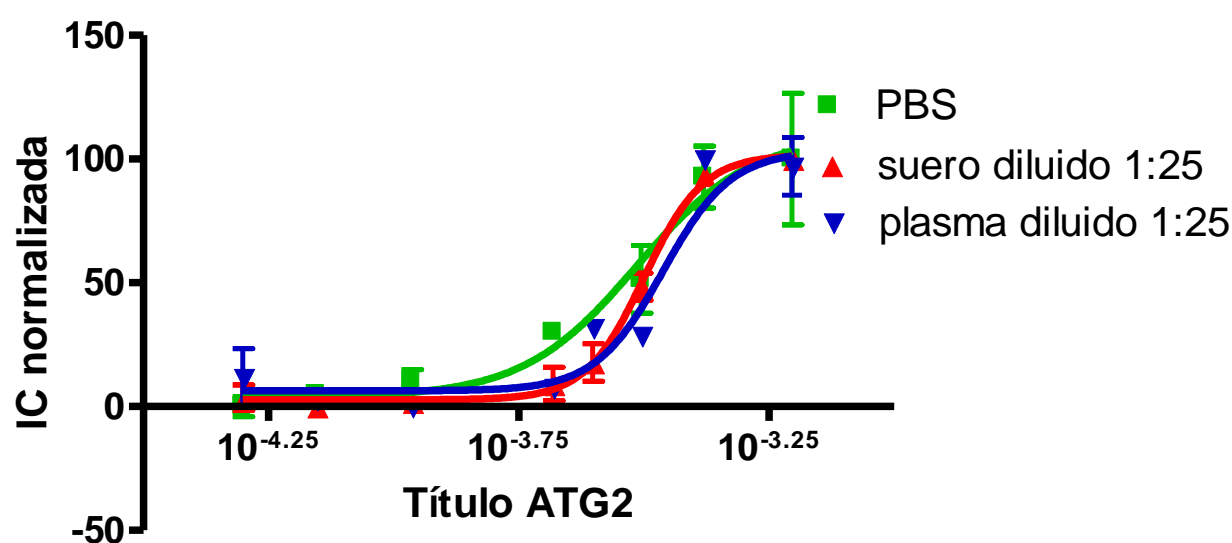


Figura 5.39. Curvas de calibración para diferentes matrices obtenidas mediante el magneto inmunosensor electroquímico. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n=3$.

Con la finalidad de demostrar la aplicabilidad del ensayo propuesto para la detección de ATG₂ humana en muestras reales, se realizaron ensayos de recuperación mediante la adición de tres títulos de ATG₂ en suero y plasma negativos, diluidos 1:25. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre 107% a 123% y desde 94% a 121% para las curvas en suero y plasma como matriz, respectivamente. Los

RESULTADOS y DISCUSION

CV% fueron menores al 10% en todos los casos (**Tabla 5.15**). Estos valores se consideraron aceptables, teniendo en cuenta la complejidad de las matrices biológicas y la variabilidad ocasionada por la excesiva manipulación de los electrodos.

Tabla 5.15. Ensayos de recuperación de títulos de ATG₂ en matrices de suero y plasma.

	Estadísticos	Título de ATG ₂		
		1:5110	1:3540	1:2000
Suero	Media	1:4475	1:3025	1:1630
	CV%	2	6	2
	R%	107	117	123
Plasma	Media	1:4220	1:2970	1:2100
	CV%	8	6	7
	R%	121	119	94

Con la finalidad de miniaturizar el prototipo en desarrollo, se transfirieron las condiciones optimizadas para el magneto inmunosensor electroquímico con c-GEC como transductor a electrodos impresos monouso, de la misma naturaleza química (SPE). Para ello, las respuestas electroquímicas de tres títulos de ATG₂ (1:2000; 1:4115 y 1:8771) se evaluaron mediante el magneto inmunosensor electroquímico optimizado anteriormente, utilizando tanto los electrodos c-GEC como los SPE. A partir de la **Figura 5.40** se pueden ver los tres voltamogramas de onda cuadrada, obtenidos para un título de ATG₂ de 1:2000.

RESULTADOS y DISCUSION

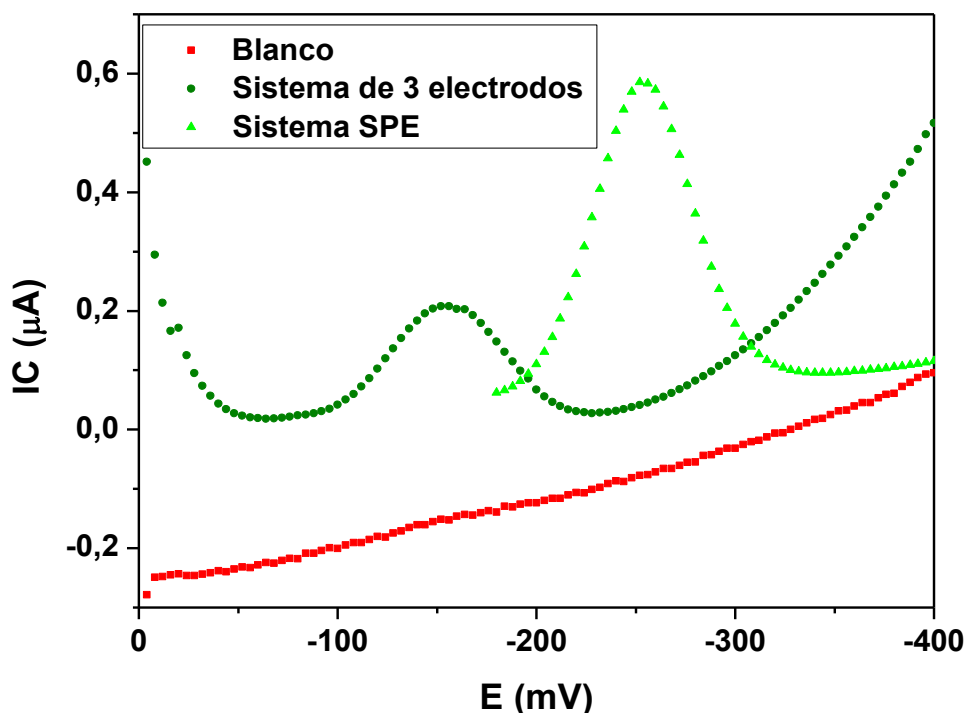


Figura 5.40. Voltamogramas obtenidos mediante VOC para los inmunoensayos con el sistema de tres electrodos (color oliva) y el sistema SPE (color verde). Condiciones de reacción: $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM-TG₂, 1:2000 de título de ATG₂, 1:20000 de antiIgA humana-HRP y $2,5$ y $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de concentraciones de OPD y H_2O_2 en solución tampón a pH 6,0 como medio de reacción. Además se muestra el voltamograma blanco, en ausencia de ATG₂ (rojo).

A pesar de que ambos transductores muestran voltamogramas bien definidos, el correspondiente a SPE presentó el pico de mayor corriente. También se puede apreciar una diferencia entre los potenciales de los picos de reducción para ambos transductores (-250 mV y -185 mV para SPE y c-GEC, respectivamente). Esta diferencia podría ser atribuida al material electródico que los compone y a que los SPE están constituidos de Ag, como electrodo de pseudo-referencia mientras que los c-GEC de Ag/AgCl en solución 3 mol L^{-1} de NaCl como electrodo de referencia. Para las concentraciones de anticuerpos analizados, todas las respuestas de SPE fueron cinco veces mayores que las obtenidas con los electrodos c-GEC (ver **Tabla 5.16**), lo cual indica que esta metodología fue más sensible. Además, el uso de SPE monouso fue una gran ventaja, debido al bajo costo de producción y fácil preparación en grandes cantidades (Lu y col., 2006). Teniendo en cuenta estas evidencias, se utilizaron los SPE como transductores en las posteriores determinaciones.

RESULTADOS y DISCUSION

Tabla 5.16. Respuestas electroquímicas obtenidas mediante los transductores c-GEC y SPE

Respuesta electroquímica (μA) (n = 3)	Título de ATG ₂		
	1:2000	1:4115	1:8771
Transductor c-GEC	2,6 (CV% = 15%)	2,1 (CV% = 18%)	0,9 (CV% = 20%)
Transductor SPE	13,6 (CV% = 14%)	11,3 (CV% = 20%)	5,8 (CV% = 18%)

Previo al análisis de las muestras con el inmunosensor optimizado, se procedió a evaluar el efecto del O₂ frente a la respuesta electroquímica utilizando los SPE como transductor. Para lo cual se realizaron dos tipos de ensayos, uno en condiciones normales de O₂, y el otro eliminando el O₂ mediante el burbujeo de N₂ en el medio de reacción. Las condiciones ensayadas fueron 0,75 mg mL⁻¹ de PM-TG₂, 1:9000 de ATG₂, 1:20000 de antiIgG cabra-HRP y 2-1 mM de los sustratos OPD-H₂O₂ en solución tampón de fosfato a pH 6,0. Las corrientes obtenidas fueron [3,1 ± 0,4] y [3,1 ± 0,5] μA para el medio con y sin O₂, respectivamente. Al comparar estas dos poblaciones mediante un ensayo de comparación de medias no se observaron diferencias significativas (P > 0,05); por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron en condiciones normales de O₂.

5.4.4. Ensayos serológicos

El magneto inmunosensor electroquímico se desarrolló y validó utilizando un ATG₂ de antisuero completo desarrollado en cabra, debido a que no se encuentra disponible comercialmente el ATG₂-IgA. Con la finalidad de demostrar la aplicabilidad del ensayo propuesto a la detección de anticuerpos humanos, se debe simplemente intercambiar el anticuerpo secundario antiIgG cabra-HRP por un antiIgA humana-HRP. El control positivo del ensayo ELISA óptico comercial, que tiene un nivel de actividad de 150 U de ATG₂ se utilizó como solución estándar del magneto inmunosensor electroquímico. En primer lugar, se evaluó el anticuerpo antiIgA humana-HRP en el intervalo desde 1:10000 a 1:30000, a una concentración constante de estándar ATG₂ (50 U), seleccionando el título de 1:20000 como dilución óptima para saturar los sitios de ATG₂ en el magneto inmunosensor electroquímico. En segundo lugar, se construyó una curva de calibración de la solución estándar en el intervalo de concentración desde 10 a 75 U en función de la intensidad de corriente de reducción. La ecuación de regresión lineal fue ajustada de la siguiente manera $IC = 0,0164 C_{ATG_2} (U) - 0,10$ con un LD de 20 U usando el criterio de $3,3 \times DE_{\text{blanco}}$ (n = 12, R² = 0,9945). La sensibilidad analítica fue 0,82 U⁻¹, lo cual demuestra que el inmunosensor desarrollado es menos sensible que el magneto inmunoensayo fluorescente, descrito en la sección 5.3; pero 2,2 veces más sensible que el ensayo ELISA estándar. En tercer lugar, se evaluó la respuesta

 RESULTADOS y DISCUSION

electroquímica de una muestra de suero a diferentes diluciones para determinar el intervalo lineal dinámico de ATG₂-IgA en el magneto inmunosensor electroquímico, seleccionando el factor de 1:25, debido a que esta dilución corresponde al voltamograma con la máxima señal electroquímica, como se puede ver en la **Figura 5.41**. Una dilución menor a 1:25 (1:10) mostró respuesta electroquímica nula, sugiriendo algún efecto de interferencia sobre la corriente debido a los componentes de la matriz del suero.

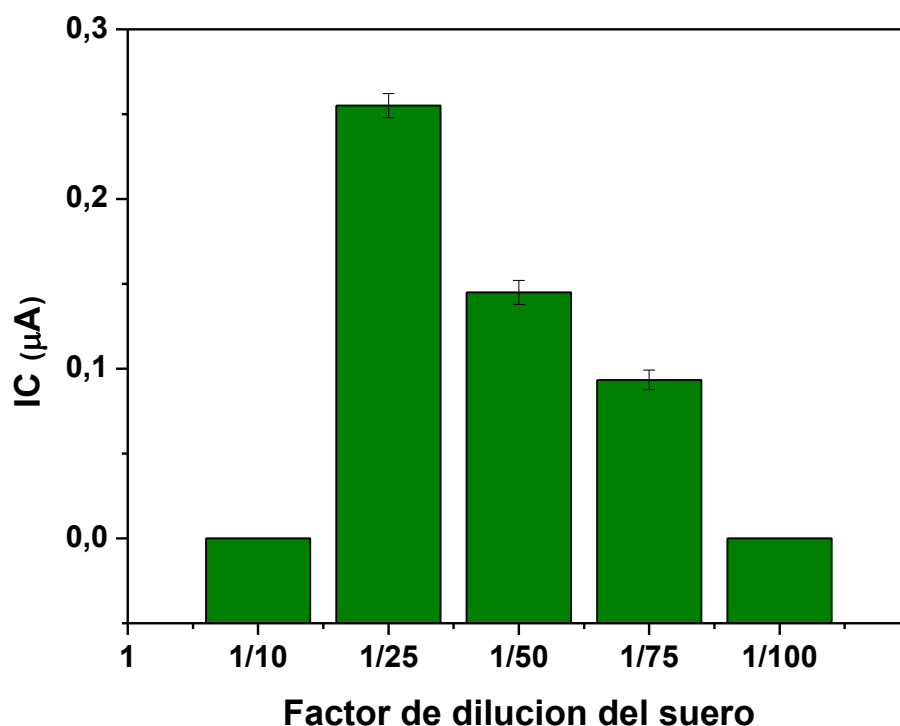


Figura 5.41. Detección voltamétrica de los diferentes factores de dilución de suero usando el magneto inmunosensor electroquímico para ATG₂-IgA. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

Por otro lado, se adicionaron diferentes ensayos controles para estimar la especificidad del inmunosensor. Para realizar este estudio se emplearon PM, en las cuales se inmovilizaron dos proteínas diferentes: (A) PM-TG₂ y (B) PM-BSA. Ambas proteínas fueron inmovilizadas como se detalló en la sección 4.3.1 y se utilizaron en el magneto inmunosensor electroquímico para evaluar: una solución de solución tampón de fosfato a pH 6,0 (ensayo 1); un suero negativo correspondiente al suero de una persona sana (ensayo 2); un suero positivo de un enfermo celíaco (ensayo 3) y un suero negativo de un paciente no celíaco, con síntomas gastrointestinales (ensayo 4). La **Figura 5.42** muestra los resultados obtenidos para los cuatro ensayos, utilizando a las PM con TG₂ y con BSA.

RESULTADOS y DISCUSION

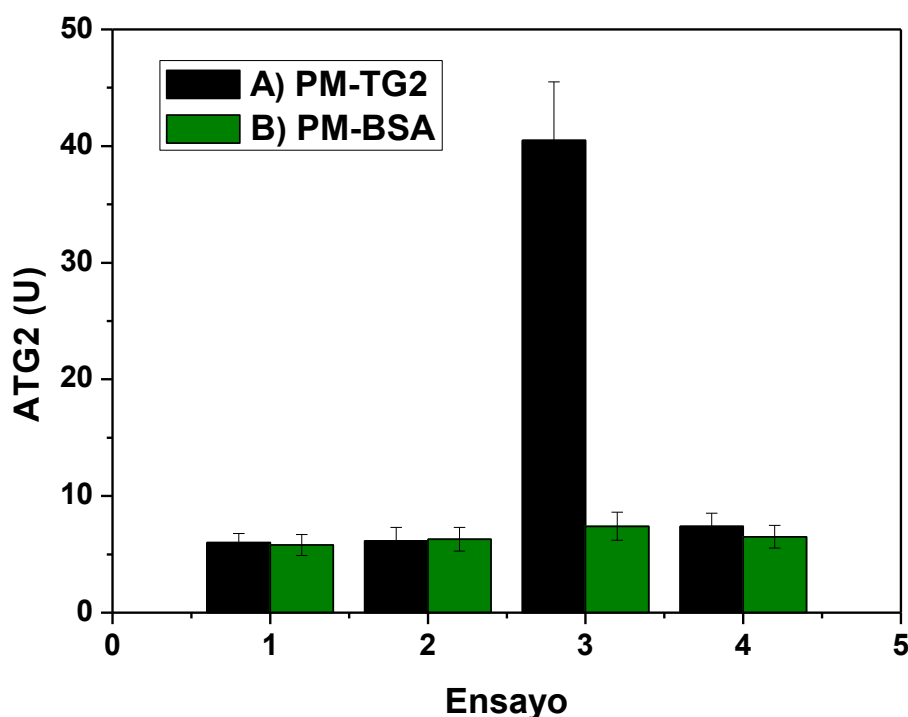


Figura 5.42. Concentraciones de ATG2 en los cuatro ensayos para estimar la especificidad del inmunosensor con TG2 (barra negra) y BSA (barra verde) inmovilizadas en PM. Condiciones de la reacción: antiIgA humana-HRP de 1:20000; OPD y H_2O_2 de $2,5$ y $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente a pH 6,0 como medio de reacción. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Como se puede apreciar, no hay diferencias significativas en el ensayo 1, lo cual indica que el nivel de absorción inespecífica del anticuerpo secundario es similar cuando se encuentra TG2 o BSA inmovilizadas sobre las PM. Similares resultados se obtuvieron para el ensayo 2, por lo tanto el nivel de absorción inespecífica del anticuerpo secundario, en presencia de una matriz sérica es también baja para las PM con los dos tipos de antígenos inmovilizados. Acorde a los resultados del ensayo 3, el suero positivo puede ser claramente distinguido. Finalmente, teniendo en cuenta que éste constituye un ensayo preliminar, la comparación de los resultados obtenidos a partir del ensayo 3 y 4 mostraron que el inmunosensor pudo discriminar entre pacientes celíacos y no-celíacos. En ensayos futuros, para establecer la especificidad del inmunosensor con una mayor confianza, se debería evaluar un mayor número de sueros a partir de enfermos no-celíacos con enfermedades gastrointestinales asociadas. Sin embargo, basados en estos hallazgos, es claro que las PM con TG2 inmovilizada en su superficie actuarían de forma eficiente como antígeno de captura para la detección de anticuerpos específicos presentes en muestras séricas.

 RESULTADOS y DISCUSION

Finalmente, se analizaron sueros de pacientes potencialmente celíacos, tanto con el magneto inmunosensor electroquímico optimizado como con un ensayo ELISA comercial. Con la finalidad de discriminar a los pacientes como celíacos o no-celíacos, los resultados de 29 y 19 sueros de pacientes celíacos y no celíacos, respectivamente (evaluadas mediante el magneto inmunosensor electroquímico y cuantificadas a partir de la curva de calibración) se analizaron mediante las curvas ROC de forma análoga a como se realizara en la sección 5.3.5. Previamente, se verificó que existieran diferencias entre los dos grupos de pacientes (celíacos y no celíacos) (Faustini y col., 2007). Para ello se realizó el ensayo de U de Mann-Whitney, evidenciando la existencia de diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$) (Siegel y Castellan, 1998). La **Figura 5.43** muestra la curva ROC obtenida, en la cual el rendimiento de la curva en el tramo superior izquierdo alcanza una SE igual a 100% [$IC_{95\%} = 88 - 100\%$] y una ES igual a 84% [$IC_{95\%} = 60 - 97\%$]. Estos dos valores corresponden al valor de corte de 16,95 U ATG2, usado para discriminar entre muestras de sueros positivos y negativos a la enfermedad celíaca.

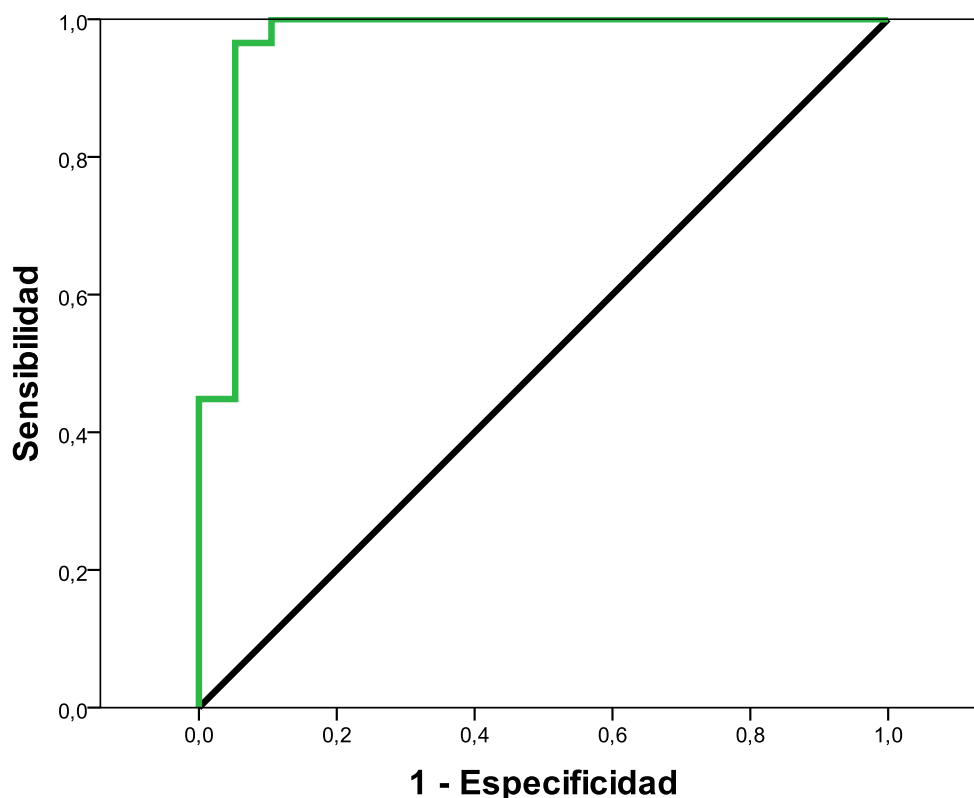


Figura 5.43. Curva ROC para seleccionar el valor de corte de ATG2. En Diagonal: línea indiferente.

El valor del ABC obtenido fue 0,88 [$IC_{95\%} = 0,76 - 0,96$], el cual ha permitido clasificar al método como “moderadamente preciso” (Greiner y col., 2000). La razón de verisimilitud positiva y negativa calculada para 16,95 U ATG2 fueron +LR = 6,33 y -LR = 0,00. Estos valores son clasificados como

RESULTADOS y DISCUSION

“moderadamente útil” y “muy útil”, respectivamente. J obtenido con este método fue de 0,84 indicando que la eficacia es muy buena (Schisterman y col., 2005).

La **Tabla 5.17** muestra una comparación entre los resultados obtenidos con el magneto inmunosensor electroquímico y con el ensayo ELISA.

Tabla 5.17. Tabla de contingencia para la detección de la enfermedad celíaca mediante el ELISA y el magneto inmunosensor electroquímico (valor de corte de ATG2 = 16,95 U)

	ELISA		Total	
	Positivo	Negativo		
Magneto inmunosensor electroquímico	Positivo (ATG2 > 16,95 U)	29	3	32
	Negativo (ATG2 ≤ 16,95 U)	0	16	16
	Total	29	19	48

$\chi^2 = 36,6$ con $P < 0,05$ – Kappa de Cohen = 0,866.

La SE y la ES, calculadas a partir de la tabla de contingencia, fueron 100,0% y 84,2%, respectivamente, siendo estos valores muy similares a los obtenidos a partir de la curva ROC. Además, la eficiencia calculada fue de 93,7 %. Esto muestra una buena correlación con el ensayo ELISA comercial y puede ser clasificado como “excelente” mediante las guías publicadas (Burgueño y col, 1995). Además, se calcularon los VP_{pos} y VP_{neg} como 90,6% y 100,0%, respectivamente. Esto indica una buena eficacia del método para clasificar a los pacientes como celíacos o no-celíacos, ya que se alcanzan valores bajos de falsos positivos y negativos (< 10%).

El rendimiento analítico del magneto inmunosensor electroquímico propuesto se comparó con el obtenido mediante otros métodos usados en el diagnóstico de la enfermedad celíaca (ver **Tabla 5.18**). La sensibilidad y especificidad son parámetros importantes que definen el poder diagnóstico de un ensayo clínico. Este ensayo presentó la mayor sensibilidad junto con el inmunoensayo óptico (Fernández y col., 2005) comparado con las demás metodologías; a pesar de que la especificidad fue menor que los informados en otros tres inmunoensayos ópticos (Dahlbom y col., 2008; Teesalu y col., 2009; Basso y col., 2011) los cuales utilizaron las curvas ROC para determinar el valor de corte. Ninguno de los métodos electroquímicos declaró la sensibilidad y especificidad, excepto el método propuesto por Pividori y col. (2009). A pesar de que los métodos evaluaron sueros humanos, el número de muestras fue muy pequeño, por lo cual, para establecer los valores de corte de sus metodologías no pudieron hacerlo mediante las curvas ROC.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.18. Comparación de métodos de inmunoensayos desarrollados para ATG2 con el magneto inmunosensor electroquímico

Soporte	Técnica Analítica	Isotipo anticuerpo	Valor de corte	Expresión del valor corte	SE (%)	ES (%)	Número sueros analizados	Referencias
microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	^a ₃ U mL ⁻¹	$\overline{X}_{blanco} + 3 DE_{blanco}$	100	98	122	Fernandez y col., 2005
SPE con capa polielectrolito	Inmunosensor Impedimétrico	IgA	-	-	-	-	6	Balkenhohl y Lisdat, 2007
		IgG						
microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	^b ₄ U mL ⁻¹	Curva ROC	84,3	88,6	150	Dahlbon y col., 2008
		IgG	₅ U mL ⁻¹		86,1	88,6		
TG2 inmovilizada en electrodo GEC	Inmunosensor amperométrico	IgA	0,78 μA	Ensayo t	70	100	20	Pividori y col., 2009
microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	12 U	Curva ROC	89	100	270	Teesalu y col., 2009
		IgG	16 U		49	100		
		IgM	18 U		39	99		
Electrodo oro modificado con tioles	Inmunosensor electroquímico	IgA	^c ₁₅ U	kit ELISA	-	-	16	Dulay y col., 2011
		IgG	20 U					
microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	^d ₁₀₀ U	Curva ROC	75,7	100	711	Basso y col., 2011
^e SPCE-MWCNTs-NPAus	Inmunosensor voltamétrico	IgA	7,3 μA	$\overline{X}_{blanco} + 3 DE_{blanco}$	-	-	8	Neves y col., 2012
		IgG	12 μA					
SPE	Inmunosensor magneto electroquímico	IgA	16,95 U	Curva ROC	100	84	48	Nuestro estudio, 2013

^aELISA (Celikey, Suecia); ^bELISA (Celikey-Phadia, Alemania); ^cELISA (Eurospital, Italia); ^dELISA (INOVA, E.E.U.U.); ^eSPCE-MWCNTs-NPAus = electrodos monouso de carbón modificados con multicapas de nanotubos de carbón y nanopartículas de oro.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.5. MAGNETOS INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TG₂ Y ANTI-PDG EN ENFERMOS CELIACOS

En esta sección se busca mejorar el rendimiento analítico de los magnetos inmunosensores electroquímicos en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, aumentando la sensibilidad de la metodología utilizando PM de pequeñas dimensiones y la especificidad al detectar dos clases de marcadores serológicos presentes en dicha enfermedad. Para ello, se desarrollaron inmunoensayos para detectar anticuerpos anti-TG₂ y anti-PDG, siendo algunos parámetros no detallados profundamente, debido a que este desarrollo se encuentra en trámite de patentamiento.

5.5.1. Inmovilización de PDG a las PM

El antígeno PDG se inmovilizó sobre las PM tosilo (PM₁) como así también sobre las PM específicas para unir péptidos (PM₂). El diámetro de las PM utilizadas en esta sección fueron de 1 µm, a diferencia de las tosilo de 2,8 µm utilizadas precedentemente en las secciones 5.3 y 5.4. Esta disminución de tamaño se realizó teniendo en cuenta la amplia evidencia bibliográfica, en donde se logran mejorar considerablemente la sensibilidad y reducir los tiempos de los ensayos al reducir el tamaño de la partículas magnéticas (Esseghaier y col., 2013; Yoo y col., 2013).

Con la finalidad de asegurar la máxima respuesta electroquímica y garantizar una buena sensibilidad en la detección de la enfermedad celíaca, se evaluó la cantidad de PDG a inmovilizar sobre las PM₂. Para ello, se varió la concentración de PDG a cuatro niveles (A, B, C y D), manteniendo constante la cantidad PM₂ en 2 mg. La **Figura 5.44** muestra las respuestas electroquímicas obtenidas mediante el magneto inmunosensor para las diferentes concentraciones de PDG, frente a un suero positivo y uno negativo clasificados clínicamente por el hospital.

RESULTADOS y DISCUSION

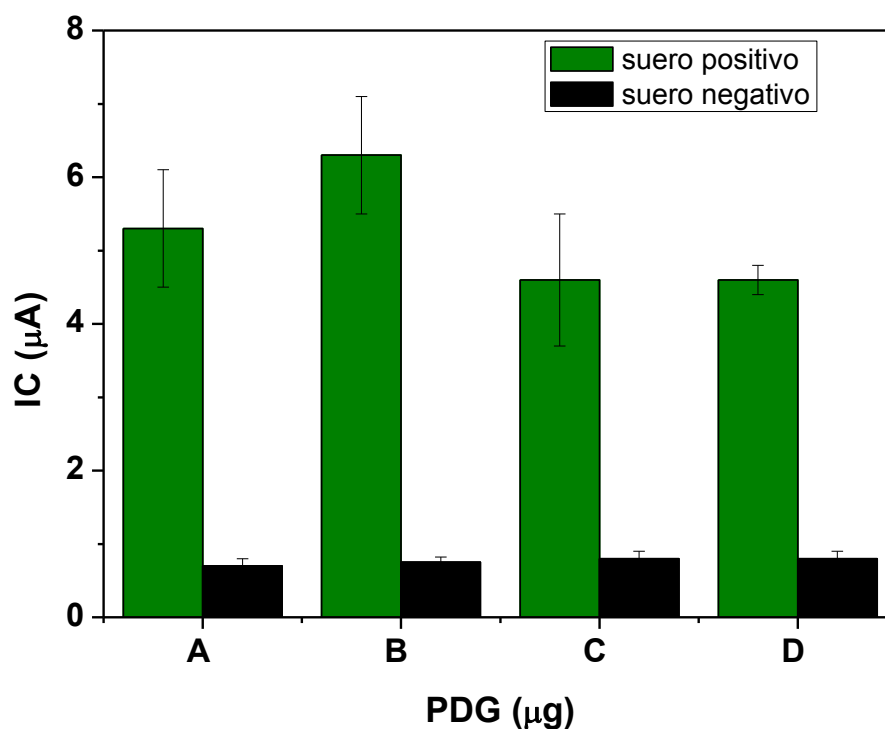


Figura 5.44. Selección de la concentración de PDG a inmovilizar sobre PM₂. Condiciones experimentales: 0,1 mg mL⁻¹ de PM₂-PDG, sueros positivos y negativos diluidos 1:25 confirmados clínicamente, y anticuerpo antiIgA humana-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

Como se observa, las respuestas electroquímicas de los sueros negativos fueron similares, mientras que las respuestas de los sueros positivos mostraron un máximo en la concentración de PDG, representada con el nivel B. A mayor concentración de PDG (según los niveles C y D) se obtiene una disminución de la señal analítica, lo cual sugiere una excesiva cantidad de antígeno por PM₂, ocasionando probablemente un enmascaramiento, por sobreinmovilización o inmovilización inapropiada, de los sitios de reconocimiento de los anticuerpos y, por lo tanto, causando un descenso de la respuesta electroquímica. Debido a todo esto, la concentración de PDG indicada con B por cada 2 mg PM₂ fue la concentración seleccionada para las posteriores determinaciones.

Con el objetivo de analizar la eficiencia de acople de PDG a las PM₂, la cantidad total de aminoácidos, luego de una hidrólisis ácida, se determinó con el ensayo de Ninhidrina. Como se desea cuantificar un péptido de pequeño tamaño (~ 3 KDa), en el sobrenadante antes y después de la etapa de inmovilización PM₂-PDG, se seleccionó el ensayo de Ninhidrina ya que posee una mayor sensibilidad y mejor límite de detección (~10 veces mayor) con respecto al método de Bradford (Mikkelsen y Cortón, 2004). Primero, 700 µL de solución de PDG antes y después de la etapa de inmovilización sobre las PM₂, se sometieron a una hidrólisis ácida con 500 µL de 6 mol L⁻¹ HCl a 100 °C por 24 h para liberar amonio. Segundo, glicina se utilizó como solución estándar para construir la

RESULTADOS y DISCUSION

curva de calibración. Para ello, se preparó una solución concentrada de glicina $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ en ácido acético glacial $0,05\%$ v/v y, a partir de esta solución, se generaron concentraciones diluidas en el intervalo desde 0 a $50 \mu\text{M}$. Tercero, el reactivo comercial de Ninhidrina (N7285-Sigma) se adicionó tanto a las muestras como a las soluciones estándares y, posteriormente, todos los tubos se incubaron durante 10 minutos a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego, cuando los tubos se enfriaron a temperatura ambiente, se les adicionó etanol 96% . La lectura de absorbancia del producto generado se realizó a 570 nm y se construyó una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración de glicina, cuya ecuación ajustada a partir de la regresión lineal fue $A = 0,00263 C_{\text{glicina}} (\mu\text{M}) + 0,153$ ($n = 15$, $R^2 = 0,9943$), ver **Figura 5.45**.

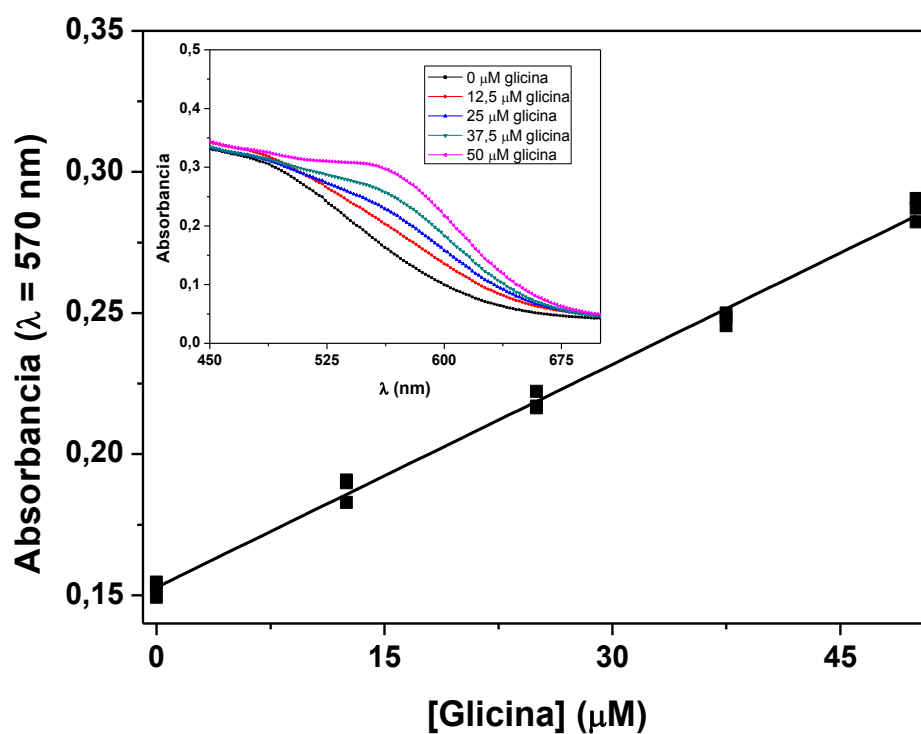


Figura 5.45. Curva de calibración de glicina. El gráfico inserto incluye los espectros para los cinco estándares de glicina analizados.

Se procesaron treinta lotes de PDG inmovilizado sobre las PM_2 y cada uno se evaluó con el reactivo de Ninhidrina. Todos los lotes mostraron la misma tendencia, es decir, las absorbancias promedio a $\lambda = 570 \text{ nm}$ para PDG, antes y después de la inmovilización, fueron $0,262 \pm 0,004$ ($n=3$) y $0,152 \pm 0,007$ ($n=90$), respectivamente. Estos valores permitieron determinar la concentración de PDG a partir de la curva de calibración de glicina. Las eficiencias de la inmovilización estuvieron comprendidas entre el 88 al 112% (eficiencia promedio = 100%, $\text{CV}\% = 5,8\%$, $n = 30$).

RESULTADOS y DISCUSION

Con la finalidad de bloquear las PM₂, se probaron BSA y un bloqueante de naturaleza peptídica (BLOQ) seleccionado específicamente para las partículas como posibles bloqueantes, para evaluar si, en estas condiciones, se lograba reducir la respuesta inespecífica y mejorar la relación señal/adsorción inespecífica del inmunoensayo. Para ello, dos sueros positivos y dos sueros negativos a la enfermedad celíaca, clasificados clínicamente, fueron analizados con tres inmunoensayos electroquímicos, uno utilizando las PM₂-PDG sin bloquear y los otros dos con las PM₂-PDG bloqueados durante 10 minutos con una solución de BLOQ o de BSA al 0,1% m/v. Las respuestas electroquímicas obtenidas con cada inmunosensor se muestran en la **Figura 5.46**.

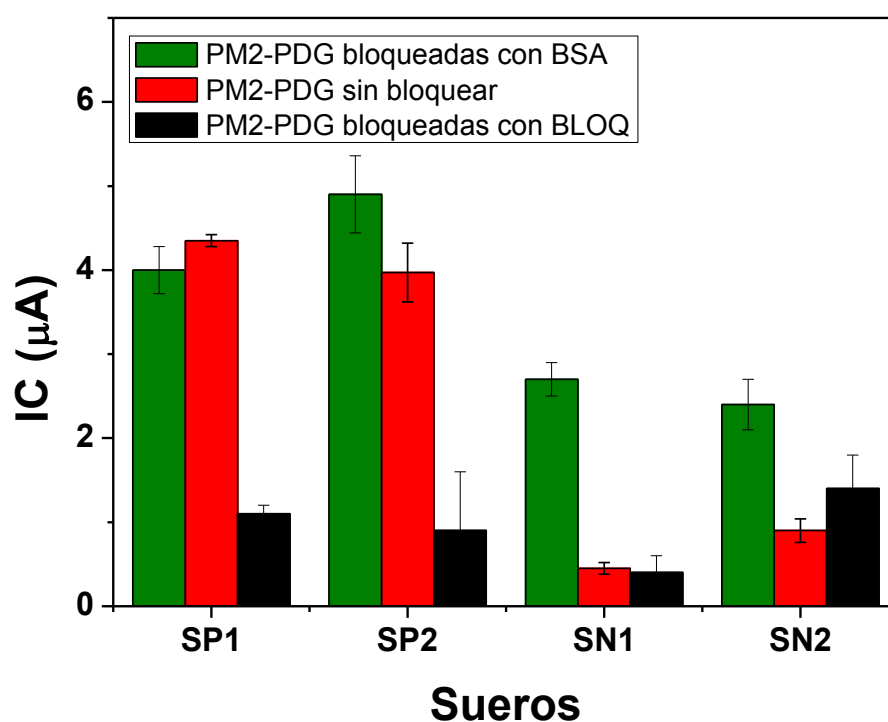


Figura 5.46. Efecto de los diferentes bloqueos a las PM₂-PDG sobre el rendimiento del magneto inmunosensor electroquímico para APDG. Condiciones experimentales: 0,1 mg mL⁻¹ de PM₂-PDG, sueros positivos (SP 1 y 2) y negativos (SN 1 y 2) diluidos 1:25 y anticuerpo antiIgA humana-HRP de 1:20000. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

Como se puede observar, el ensayo realizado con las PM₂-PDG sin bloquear presentó menor respuesta inespecífica que los dos ensayos con etapas de bloqueo con BLOQ y BSA. Por lo tanto, considerando los resultados experimentales, no se realizó etapa de bloqueo en las posteriores inmobilizaciones del PDG a las PM₂.

La estabilidad de PM₂-PDG en el rendimiento analítico del magneto inmunosensor electroquímico se estudió durante un mes, en cuyo tiempo las PM₂-PDG se conservaron a 4 °C. Las condiciones experimentales usadas en todos los casos fueron: 0,1 mg mL⁻¹ de PM₂-PDG, suero

RESULTADOS y DISCUSION

positivo y negativo a la enfermedad celíaca clasificados clínicamente, diluidos 1:25 y 1:20000 de anticuerpo antiIgA humana-HRP. Como se muestra en la **Figura 5.47**, no se observa un cambio significativo en el período de tiempo analizado, confirmando la estabilidad de las PM₂-PDG durante al menos 1 mes, con un CV% global menor al 15%.

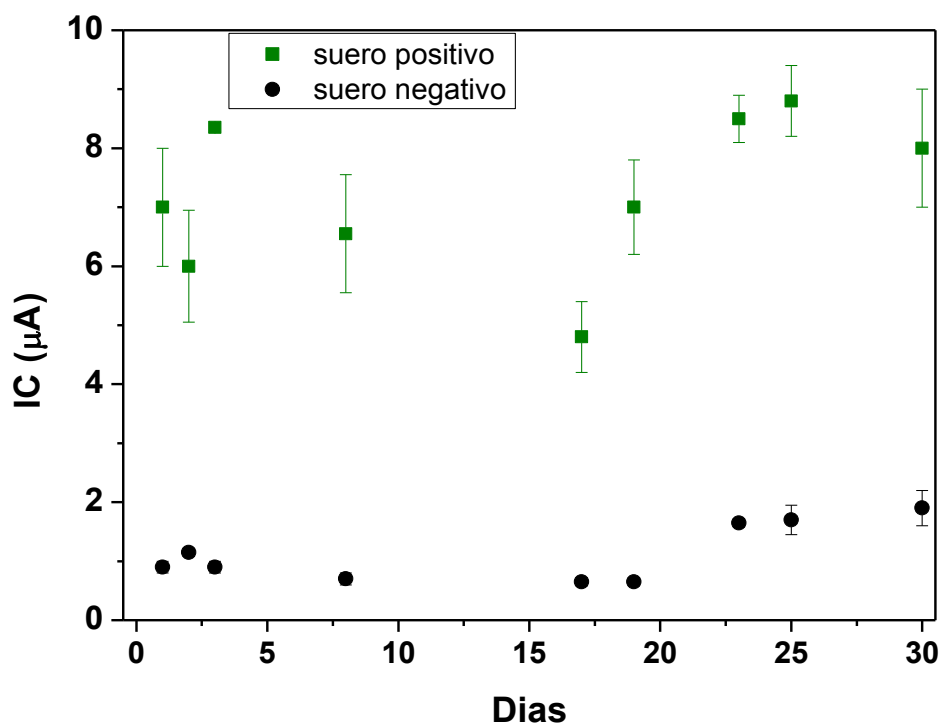


Figura 5.47. Estudio de estabilidad de las PM₂-PDG realizado con el magneto inmunosensor electroquímico para un suero negativo y otro positivo, confirmados con biopsia. Las barras de error muestran la DE para n = 3.

5.5.2. Optimización de los magnetos inmunosensores electroquímicos

El sistema de revelación para HRP utilizado para detectar la señal electroquímica fue hidroquinona:H₂O₂, mediante amperometría en las condiciones optimizadas en la sección 5.1.2. Con la finalidad de desarrollar un dispositivo que pueda servir de prototipo para futuros desarrollos comerciales, se considera que las lecturas amperométricas son más fáciles de implementar en la construcción de instrumentos de pequeño tamaño y producción en masa, que las voltamétricas. Según la optimización realizada en la sección 5.1, los cosustratos de HRP que brindaron las mejores respuestas electroquímicas al ser analizados mediante amperometría, fueron hidroquinona, OPD, p-aminofenol y pirocatecol (ver **Figura 5.5**). Hidroquinona fue seleccionada para los futuros ensayos, debido a que es el compuesto más ampliamente utilizado como cosustrato de HRP.

RESULTADOS y DISCUSION

Hasta el momento no se tiene conocimiento sobre metodologías electroquímicas que detecten a los APDG como diagnóstico de la enfermedad celíaca. En esta sección, se optimizaron las condiciones de los inmunosensores para la determinación de APDG y ATG2. Para los magnetos inmunosensores electroquímicos destinados a la detección de APDG IgA e IgG se evaluaron los siguientes parámetros: el tipo de partículas magnéticas, la concentración de PM-PDG y los títulos de anticuerpos antiIgG humana-HRP y antiIgA humana-HRP.

Primero, se seleccionó el tipo de PM sobre las cuales inmovilizar al PDG. El ensayo se realizó a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ PM-PDG, controles positivos y negativos (provenientes de un ensayo ELISA comercial) o sueros positivos y negativos, diluidos 1:25 y un título de anticuerpo antiIgA humana-HRP de 1:20000. La **Figura 5.48** muestra la respuesta electroquímica obtenida para cada muestra, usando los dos tipos de PM. Por un lado, el inmunosensor con las PM2 como soporte de inmovilización del PDG presentó, para las diversas muestras las mayores señales electroquímicas y permitió una mejor diferenciación entre muestras positivas y negativas, con respecto al inmunosensor con las PM1. Por otro lado, el protocolo de inmovilización PM2-PDG fue más simple y rápido que para las PM1-PDG.

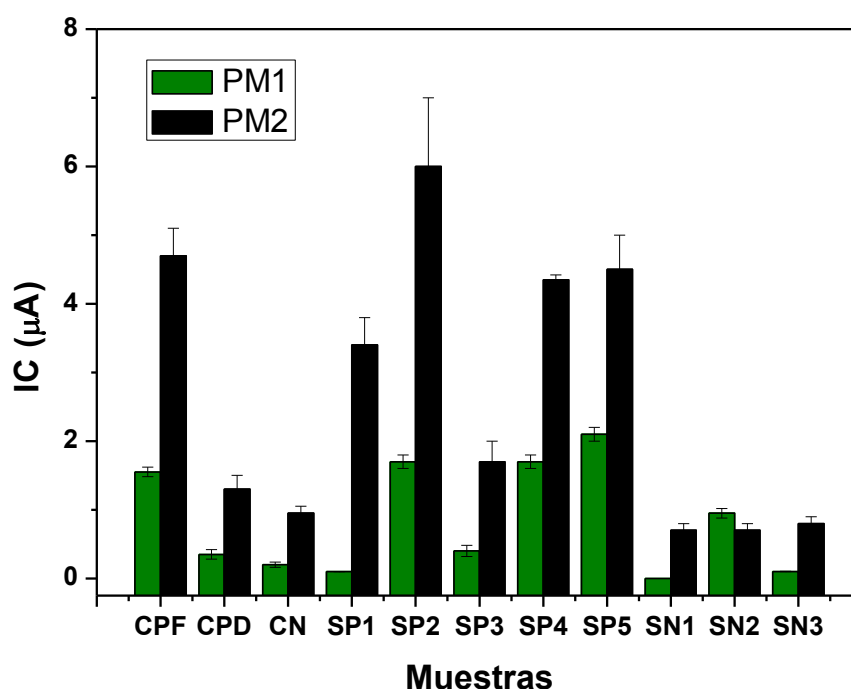


Figura 5.48. Selección del tipo de PM donde inmovilizar a los PDG. Controles positivo fuerte (CPF), positivo débil (CPD) y negativo (CN), sueros positivos (SP 1-5) y negativos (SN 1-3). Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Segundo, las PM2-PDG se ensayaron en el intervalo desde $0,05$ a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, en presencia de controles positivos y negativos, diluidos 1:25 y anticuerpo antiIgA-HRP de 1:20000. En la **Figura 5.49** se observa un incremento en la corriente con el aumento de la cantidad de partículas, hasta el

RESULTADOS y DISCUSION

máximo de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de PM₂-PDG. Las respuestas electroquímicas para las concentraciones de PM₂-PDG mayores que $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ fueron similares respecto a la respuesta para $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Por lo tanto, esta concentración se seleccionó como la condición óptima a aplicar en los posteriores ensayos.

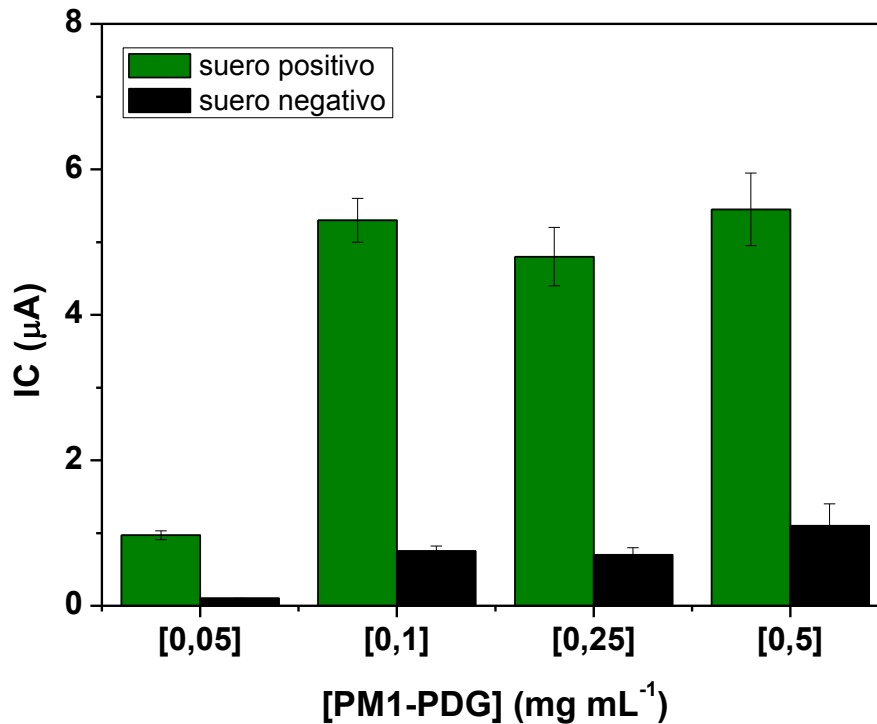


Figura 5.49. Selección de la cantidad de PM₂-PDG por inmunoensayo. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Tercero, muestras de sueros de pacientes celíacos se evaluaron mediante el magneto inmutosensor electroquímico. La respuesta amperométrica de los sueros se evaluaron a diferentes diluciones para definir el intervalo dinámico lineal para APDG-IgA. Se seleccionó el factor de 1:25 se seleccionó debido a que esta dilución corresponde a la intensidad de corriente máxima, como se puede observar en la **Figura 5.50**.

RESULTADOS y DISCUSION

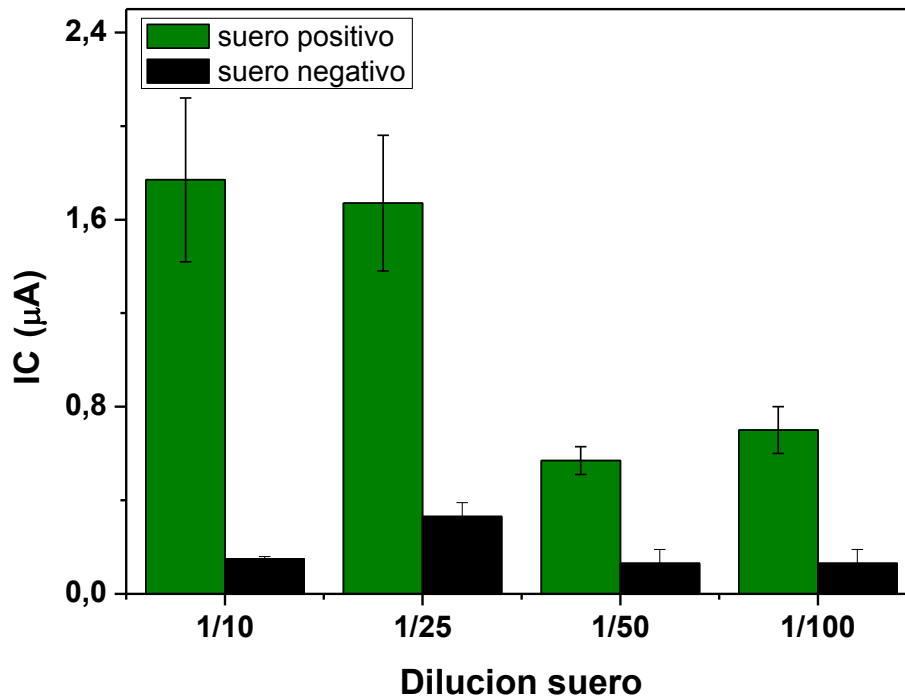


Figura 5.50. Selección de la dilución de suero. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Cuarto, se optimizaron los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP, para lo cual los anticuerpos antiIgG humana-HRP y antiIgA humana-HRP se variaron desde 1:1500 a 1:9000 y desde 1:10000 a 1:30000, respectivamente, frente a los valores óptimos de PM₂-PDG y los controles positivos y negativos. Acorde a los resultados y como, además, se pueden apreciar en las **Figuras 5.51a y b**, las diluciones de 1:9000 y 1:20000 de antiIgG humana-HRP y antiIgA humana-HRP, respectivamente, fueron seleccionadas, ya que bajo estas condiciones se alcanzaron las corrientes máximas y se logró saturar todos los APDG presentes en las muestras.

RESULTADOS y DISCUSION

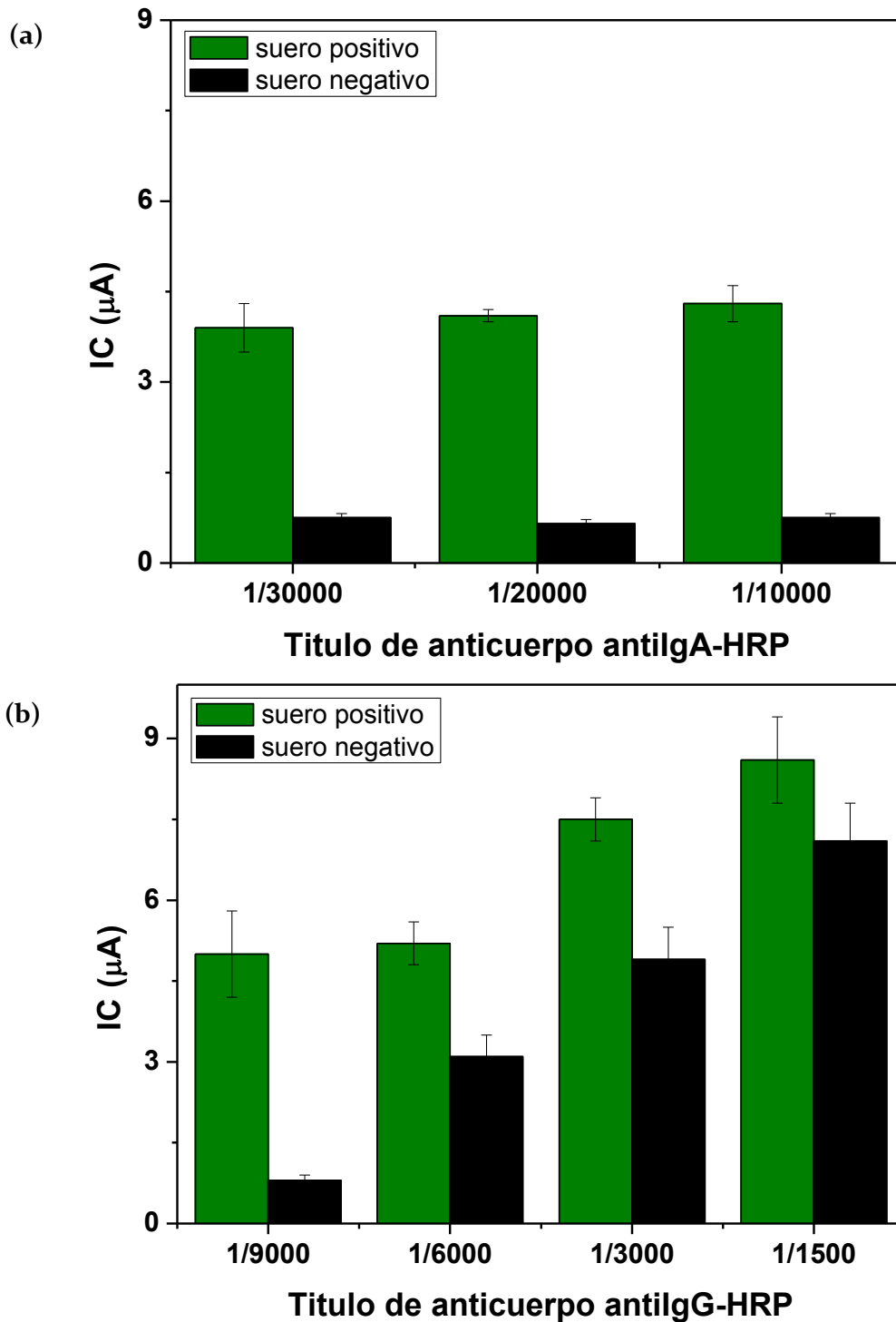


Figura 5.51. Selección del título de anticuerpo antiIg humana-HRP para la detección de APDG del isotipo (a) IgG y (b) IgA. Las barras de error muestran la desviación estándar para $n = 3$.

Por un lado, los Ac antiIgG humana-HRP presentan un aumento de la respuesta electroquímica en los sueros negativos, a medida que disminuye la dilución del anticuerpo. Esto puede deberse a que, al aumenta la concentración de éste, aumenta la cantidad de proteínas presentes en el medio y, por lo tanto, se favorece la unión inespecífica de las mismas sobre las PM₂-PDG. Por otro lado, la

RESULTADOS y DISCUSION

respuesta obtenida al utilizar el sistema de revelación de Ac antiIgA humana-HRP fue constante en el intervalo evaluado, seleccionando el valor central de 1:20000 para garantizar la saturación de todos los APDG.

Para el desarrollo del magneto inmunosensor electroquímico de ATG₂, se optimizó la concentración de PM₁-TG₂, evaluando las mismas en el intervalo desde 0,05 a 0,75 mg mL⁻¹, en presencia de los controles positivo y negativo, diluidos 1:25 y 1:20000 de anticuerpo antiIgA humana-HRP. A pesar de que se obtuvo un incremento en la intensidad de corriente a 0,25 mg mL⁻¹ de PM₁-TG₂, como se puede ver en la **Figura 5.52**, se eligió 0,5 mg mL⁻¹ como concentración óptima para garantizar que la cantidad de TG₂ en el ensayo reacciona con todos los ATG₂ en la muestra. El resto de los parámetros del inmunoensayo se mantuvieron en las condiciones óptimas obtenidas en la sección 5.4.2.

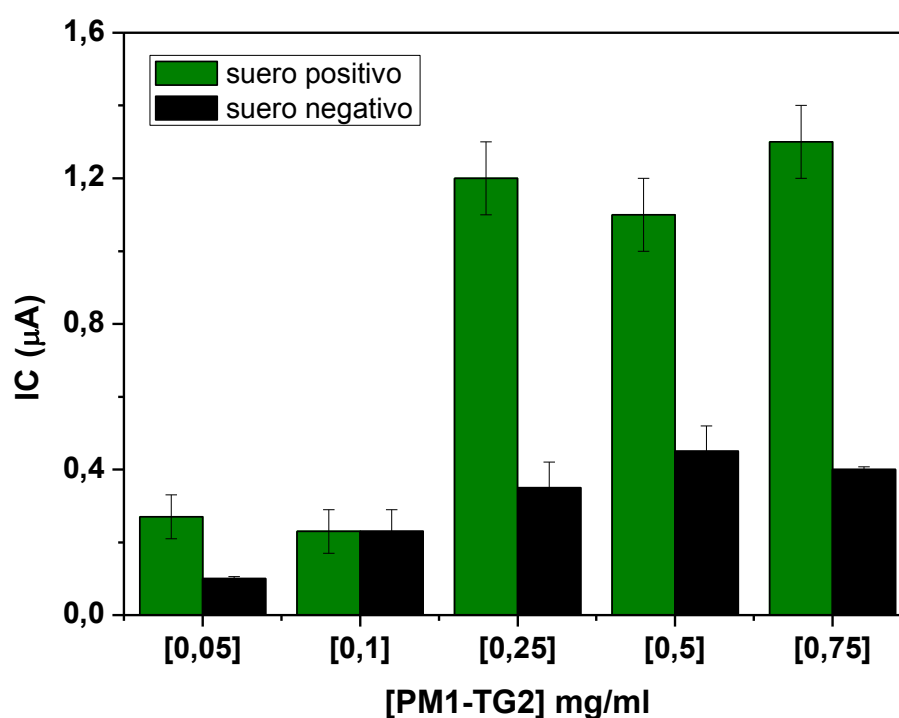


Figura 5.52. Selección de la concentración de PM₁-TG₂. Las barras de error muestran la desviación estándar para n = 3.

5.5.3. Curvas de calibración de los magnetos inmunosensores electroquímicos

Se construyeron tres curvas de calibración, destinadas a la cuantificación de anticuerpos presentes en los enfermos celíacos, basados en APDG-IgA, APDG-IgG y ATG₂-IgA. Para ello, tres controles positivos de 150 U de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG₂-IgA provistos por ensayos ELISA comerciales (marca INOVA) se usaron como soluciones estándares y se construyeron tres curvas de

RESULTADOS y DISCUSION

calibración en el intervalo de concentración desde 0 a 150 U en función de la IC de reducción. Las ecuaciones de regresiones lineales se ajustaron a: $IC = 0,0305 C_{APDG-IgA} (U) + 0,49$ ($n = 15$, $R^2 = 0,9902$), $IC = 0,041 C_{APDG-IgG} (U) + 1,96$ ($n = 15$, $R^2 = 0,98$) y $IC = 0,011 C_{ATG2-IgA} (U) - 0,06$ ($n = 15$, $R^2 = 0,9877$). La **Tabla 5.19** muestra los parámetros analíticos obtenidos para cada inmunosensor electroquímico, con su respectiva solución estándar. Las sensibilidades analíticas presentaron valores similares en todos los inmunosensores (desde 0,2 a 0,8 U⁻¹). Las desviaciones estándares de las pendientes (CV%) fueron menores que 4% en todos los casos. Los inmunosensores para APDG-IgG y ATG2 tuvieron los más bajos LD, mientras que el inmunosensor para APDG-IgA presentó el intervalo lineal más amplio.

Tabla 5.19. Parámetros analíticos para los tres magnetos inmunosensores electroquímicos.

Inmunosensor	Sensibilidad analítica (U ⁻¹)	^a CV% (n = 3)	Intervalo lineal (U)	^b LC (U)	^c LD (U)
APDG-IgA	0,2 ₃	2,8	31,7 - 125	31,7	11,3
APDG-IgG	0,4 ₅	3,6	15,9 - 50	15,9	5,6
ATG2	0,8 ₅	0,3	19,2 - 37,5	19,2	7,1

^aCV% = $DE_b/b \times 100$; ^bLC = $10 DE_b$; ^cLD = $3,3 DE_b$.

Los resultados de precisión intra- e inter-ensayo para tres niveles de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2-IgA (controles positivo fuerte, positivo débil y negativo de cada anticuerpo proveniente de los ensayos ELISA comerciales) obtenidas con los tres magnetos inmunosensores electroquímicos son presentados en la **Tabla 5.20**. El CV% osciló desde 5% a 15% y desde 10% a 20% para los estudios de precisión intra- e inter-ensayo, respectivamente, los cuales fueron considerados aceptables para esta clase de ensayos biológicos (DeSilva y col, 2003).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.20. Precisión intra- e inter-ensayo para las soluciones calibradores de APDG-IgA, APDG-IgG, ATG₂ y APDG/ATG₂

Ensayo	Estadística	^a Intra-ensayo			^b Inter-ensayo		
		Positivo fuerte	Positivo débil	Negativo	Positivo fuerte	Positivo débil	Negativo
Inmunosensor APDG-IgA	APDG-IgA (U)	120	35	-	120	35	-
	CV%	5	8	9	10	15	14
Inmunosensor APDG-IgG	APDG-IgG (U)	45	20	-	45	20	-
	CV%	12	10	8	13	18	13
Inmunosensor ATG ₂	ATG ₂ (U)	35	18	-	35	18	-
	CV%	11	9	13	12	10	16
Inmunosensor APDG/ATG ₂	APDG/ATG ₂ (U)	120	30	-	120	30	-
	CV%	15	10	12	20	12	15

^aLa precisión intra-ensayo se evaluó mediante múltiple análisis (n = 5) en un ensayo.

^bLa precisión inter-ensayo se analizó mediante el análisis en tres corridas analíticas diferentes (n = 9).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.5.4. Ensayos serológicos

Se evaluaron 42 y 28 sueros de pacientes clínicamente clasificados como celíacos y no-celíacos, respectivamente, mediante los magnetos inmunosensores electroquímicos destinados a la detección de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2-IgA. Además, estos sueros fueron analizados con dos ELISA ópticos para APDG-IgA y APDG/ATG2, siendo el primero desarrollado en el laboratorio y el segundo un ensayo comercial marca INOVA.

Los resultados de cada inmunosensor fueron analizados mediante las curvas ROC, de manera de seleccionar los valores de corte que generen la mejor especificidad para discriminar entre pacientes celíacos y no celíacos. La clasificación de las muestras por los centros de salud españoles se basó en los resultados de los ensayos ELISA para AGA-IgA y ATG2-IgA. Dos valores de corte se obtuvieron a partir de las curvas ROC, uno para todas las muestras ($n = 70$) y otro para las muestras confirmadas histológicamente con biopsia ($n = 23$). El doble análisis se realizó debido a que sólo se disponía de los resultados del método confirmatorio con biopsia para 23 muestras, mientras que para las muestras restantes ($n = 47$) el resultado informado podría estar comprendido dentro del error propio de los ensayos ELISA. Los hospitales utilizaron dos ensayos para detectar los AGA-IgA, uno marca INOVA (SE = 96,3% y ES = 50,0%) y otro marca Biocientífica (SE = 96,2% y ES = 91,7%) y dos ensayos para detectar ATG2-IgA, uno marca Biosystems (SE = 95,0% y ES = 99,4%) y el otro Biocientífica (SE = 93,6% y ES = 94,3%).

La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y las razones de verosimilitud se muestran en la **Tabla 5.21**, teniendo en cuenta los dos valores de corte obtenidos para cada magneto inmunosensor electroquímico.

El inmunosensor que presentó el menor rendimiento analítico para discriminar entre pacientes celíacos y no celíacos fue el destinado a la detección de APDG-IgG, evidenciando posible efecto matiz de otros anticuerpos del isotipo IgG no específicos de la enfermedad celíaca, debido a la gran proporción en la cual esta clase de inmunoglobulina se encuentran dentro de la matriz serológica y a la baja dilución en la cual se analizaron los sueros (1:25).

Sin considerar este inmunosensor, para los valores de corte considerando todas las muestras, la ES varió desde 93% a 100% para SE entre 81% a 93% y, para los valores de corte de las muestras confirmadas con biopsia, la ES estuvo comprendida en el intervalo desde 80% a 100% para SE desde 85% a 100%. Las eficiencias globales de los métodos, representadas como ABC, indicaron que los magnetos inmunosensores electroquímicos para APDG-IgA y considerando ambos criterios de cálculo del valor de corte, considerando las muestras confirmadas histológicamente resultaron altamente exactos y con magnitudes similares a los ELISA, tomados como métodos de rutina; mientras el resto de los inmunosensores resultaron moderadamente exactos (Griener y col., 2000).

RESULTADOS y DISCUSION

Por otro lado, teniendo en cuenta los +LR y -LR, los métodos se clasificaron como “muy útil”, “moderadamente útil” y “escasamente útil” según los valores de “ >10 y $<0,1$ ”, “ $(5 - 10)$ y $(0,1 - 0,2)$ ” y “ $(2 - 5)$ y $(0,5 - 0,2)$ ”, respectivamente, acorde a la bibliografía (Chien y Khan, 2001). Además, J es comúnmente usada para medir la eficiencia de diagnóstico global, siendo máxima cuando el valor de J se acerca a 1 (Schisterman et. al., 2005). Debido a todo ello, el mayor rendimiento analítico comparable con los resultados de los métodos de rutina (ELISA) se obtuvo para el magneto inmunosensor electroquímico de APDG-IgA, considerando los dos valores de corte obtenidos a partir del análisis de los resultados con las curvas ROC.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Tabla 5.21. Análisis de los datos mediante la curva ROC. Para cada ensayo, dos valores de corte con el criterio de la mayor especificidad en la discriminación entre casos celíacos y no celíacos se identificaron: uno para todas las muestras (n = 70) y otro para las muestras confirmadas histológicamente (n = 23). Los intervalos de confianza para el 95% aparecen entre paréntesis

Ensayo	Todas las muestras (n = 70)						
	Valor de corte (U)	ABC	SE (%)	ES (%)	+LR	-LR	J
Inmunosensor APDG-IgA	24	0,978 (0,910 - 0,998)	91 (77 - 97)	96 (82 - 100)	25 (4 - 174)	0,1 (0,04 - 0,3)	0,869
Inmunosensor APDG-IgG	7	0,767 (0,651 - 0,860)	67 (51 - 80)	89 (72 - 98)	6 (2 - 19)	0,4 (0,2 - 0,6)	0,559
Inmunosensor ATG ₂	24	0,958 (0,881 - 0,991)	83 (69 - 93)	93 (77 - 99)	12 (3 - 45)	0,2 (0,09 - 0,4)	0,845
Inmunosensor APDG/ATG ₂	16	0,894 (0,797 - 0,955)	81 (66 - 91)	93 (77 - 99)	11 (3 - 43)	0,2 (0,1 - 0,4)	0,798
ELISA APDG-IgA	56	0,983 (0,915 - 0,999)	93 (81 - 99)	100 (88 - 100)	∞	0,07 (0,02 - 0,2)	0,929
ELISA APDG/ATG ₂	29	0,981 (0,915 - 0,999)	93 (81 - 99)	93 (81 - 99)	13 (3 - 50)	0,08 (0,03 - 0,2)	0,857
Ensayo	Muestras confirmadas histológicamente (n = 23)						
	Valor de corte (U)	ABC	SE (%)	ES (%)	+LR	-LR	J
Inmunosensor APDG-IgA	24	1,000 (0,852 - 1,000)	100 (75 - 100)	100 (69 - 100)	∞	0,0	1,00
Inmunosensor APDG-IgG	7	0,800 (0,582 - 0,936)	69 (39 - 91)	100 (69 - 100)	∞	0,3 (0,1 - 0,7)	0,692
Inmunosensor ATG ₂	20	0,881 (0,678 - 0,977)	85 (55 - 98)	80 (44 - 96)	4 (1 - 15)	0,2 (0,05 - 0,7)	0,646
Inmunosensor APDG/ATG ₂	6	0,927 (0,738 - 0,993)	85 (55 - 98)	100 (69 - 100)	∞	0,2 (0,04 - 0,6)	0,846
ELISA APDG-IgA	40	1,000 (0,852 - 1,000)	100 (75 - 100)	100 (69 - 100)	∞	0,0	1,00
ELISA APDG/ATG ₂	53	1,000 (0,852 - 1,000)	100 (75 - 100)	100 (69 - 100)	∞	0,0	1,00

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La **Tabla 5.22** muestra la correspondencia de los resultados obtenidos mediante el diagnóstico del hospital y los resultados logrados con los valores de corte de las curvas ROC. Nuevamente, el menor rendimiento analítico se obtuvo con el magneto inmunosensor electroquímico para APDG-IgG. Los otros inmunosensores tuvieron buenas características, como SE y ES, que rondaron desde 80 a 100% y eficiencias desde 83 a 100%. Los valores de coeficiente Kappa de Cohen desde 0,81 a 1,00, desde 0,61 a 0,80 y desde 0,41 a 0,60 se clasificaron como “Excelente”, “Sustancial” y “Moderado” mediante las guías publicadas (Khan y Chien, 2001). Además, teniendo en cuenta que los valores PFP% y PFN% menores que 15% se consideran aceptables, los inmunosensores que presentaron mayores porcentajes fueron los destinados a la detección de APDG-IgG y ATG₂, considerando los valores de corte calculados para todas las muestras y los inmunosensores para APDG-IgG y ATG₂, teniendo en cuenta el valor de corte calculado para las muestras confirmadas histológicamente. Esto refleja que los inmunosensores con altos PFP% y/o PFN% tienen alta probabilidad de clasificar a una muestra como celíaca, cuando en realidad no lo es y viceversa.

Tabla 5.22. Tablas de contingencia.

Ensayo	Valor de corte (U)	Todas las muestras (n = 70)				Eficiencia (%)
		SE (%)	ES (%)	PFP (%)	PFN (%)	
Inmunosensor APDG-IgA	24	90	96	9	11	93 (^a k = 0,854)
Inmunosensor APDG-IgG	7	69	89	31	11	77 (^a k = 0,494)
Inmunosensor ATG ₂	24	81	96	19	4	87 (^a k = 0,765)
ELISA APDG-IgA	56	93	100	7	0	96 (^a k = 0,882)
ELISA APDG/ATG ₂	29	86	96	14	4	90 (^a k = 0,852)
Ensayo	Valor de corte (U)	Muestras confirmadas histológicamente (n = 23)				Eficiencia (%)
		SE (%)	ES (%)	PFP (%)	PFN (%)	
Inmunosensor APDG-IgA	24	100	100	0	0	100 (^a k = 1,000)
Inmunosensor APDG-IgG	7	69	100	0	31	83 (^a k = 0,572)
Inmunosensor ATG ₂	20	85	80	20	15	83 (^a k = 0,563)
ELISA APDG-IgA	40	100	100	0	0	100 (^a k = 1,000)
ELISA APDG/ATG ₂	53	100	100	0	0	100 (^a k = 1,000)

^ak = Kappa de Cohen

Finalmente, se puede concluir que el magneto inmunosensor electroquímico para detectar APDG-IgA fue el que presentó el mejor rendimiento analítico de los ensayos electroquímicos, con resultados similares a los ELISA ópticos, tomados como metodologías de rutina. Cabe señalar que dentro de las metodologías desarrolladas para detectar APDG, como diagnóstico de la enfermedad

RESULTADOS y DISCUSION

celíaca se encuentran inmunoensayos ópticos y un ensayo inmunofluorométrico, cuyas características principales se detallan en la **Tabla 5.23**.

Tabla 5.23. Métodos basados en inmunoensayos desarrollados para APDG.

Soporte	Técnica analítica	Isotipo	SE (%)	ES (%)	Nº muestras analizadas	Referencias
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA IgG	- -	- -	70	Aleanzi y col., 2001
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	82	84	128	Schwartz y col., 2004
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA IgG	95 92	99 100	205	Sugai y col., 2006
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA IgG	98 97	93 100	141	Niveloni y col., 2007
Fase sólida lantánido	Ensayo inmunofluorométrico	IgA IgG	92 75	90 98	168	Ankelo y col., 2007
Microplaca ELISA	^a Inmunoensayo óptico	IgA IgG	84 84	90 98	562	Volta y col., 2008
Microplaca ELISA	^a Inmunoensayo óptico	IgA IgG	- -	- -	40	Barbato y col., 2011
Microplaca ELISA	^b Inmunoensayo óptico	IgA IgG	97 94	92 94	139	Sakly y col., 2012
Electrodo m-GEC	Magneto inmunosensor electroquímico	IgA	91	96	70	Este estudio, 2013
		IgG	67	89		
		IgA IgG	100 69	100 100	23	
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	93	100	70	
		IgA	100	100	23	

^aQuanta Lite Gliadin II IgG e IgA; Inova Diagnostics, San Diego, CA, E.E.U.U., ^bElisa Euroimmun®, Lübeck, Alemania.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el magneto inmunosensor electroquímico para APDG-IgA, el rendimiento analítico fue similar o superior a los encontrados en la bibliografía cuando se considera la totalidad de las muestras o sólo las muestras confirmadas histológicamente, respectivamente. Esto demuestra que la metodología electroquímica tendría similares características que los ELISA ópticos, utilizados rutinariamente en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Cabe destacar que las metodologías electroquímicas presentan la potencialidad, frente a los ensayos ELISA ópticos, de poder desarrollar dispositivos de pequeñas dimensiones que permitan disminuir el volumen de muestra y reactivos y ser acoplados a instrumentación portátiles, fácilmente transportable a los diferentes centros de salud alejados de las grandes urbanizaciones.

La **Tabla 5.24** muestra las metodologías electroquímicas desarrolladas hasta el momento, destinadas al diagnóstico de anticuerpos presentes en los enfermos celíacos. Como se puede

RESULTADOS y DISCUSION

observar, existe una evolución desde la detección individual de AGA y ATG2 hasta su detección combinada. Conociendo las limitaciones de los AGA, es decir que estos no presentan buena especificidad para la enfermedad celíaca, se han desarrollado los APDG que resultan más específicos y sensibles en el diagnóstico.

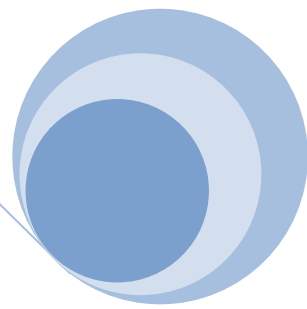
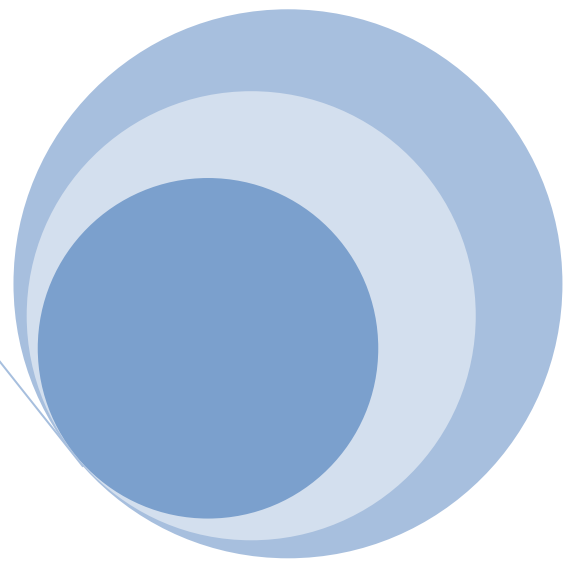
Por otro lado, sólo uno de los artículos (Pividori y col., 2009) calculan la SE y ES de las metodologías, lo cual dificulta la comparación entre los diferentes desarrollos. Además, el número de muestras analizadas en nuestros estudios fueron ampliamente superiores al utilizado en todos los ensayos electroquímicos encontrados en bibliografía destinados al diagnóstico de la enfermedad celíaca. En base a todos estos hallazgos, se deduce que el magneto inmunosensor electroquímico para detectar APDG-IgA presentó el mejor rendimiento analítico. Cabe destacar, que las partículas magnéticas específicas para la unión de péptidos han mostrado un excelente comportamiento analítico como soporte de la reacción del inmunosensor. Las ventajas de utilizar este tipo de PM radican en el simple y rápido protocolo requerido para la inmovilización.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

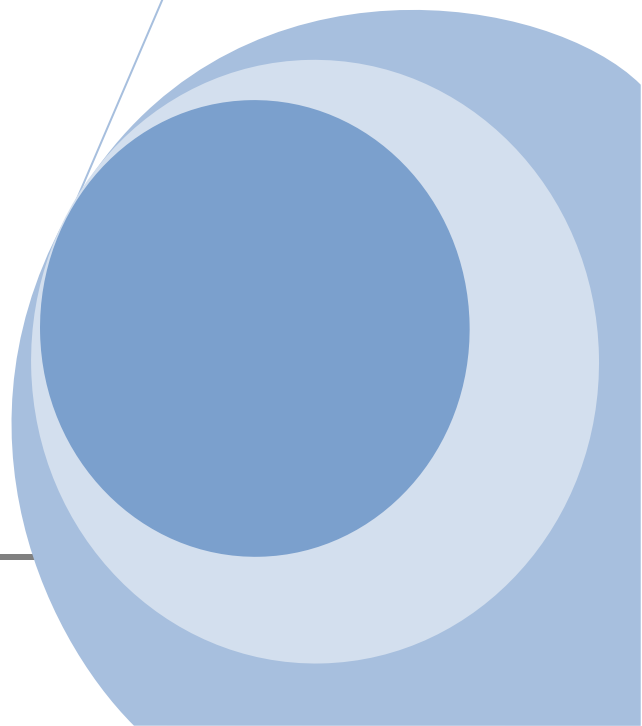
Tabla 5.24. Métodos electroquímicos de diagnóstico de la enfermedad celíaca

Soporte	Técnica analítica	Analito	SE (%)	ES (%)	Nº muestras	Referencias
SPE	Inmunosensor impedimétrico	ATG2-IgA e IgG	-	-	6	Balkenhohl y Lisdat, 2007
TG2 inmovilizada en GEC	Inmunosensor amperométrico	ATG2-IgA	70	100	20	Pividori y col., 2009
Electrodo Au	Inmunosensor amperométrico	AGA-IgG	-	-	22	Pereira y col., 2010
Autoensamble de ^a CMC	Biosensor supramolecular	AGA-IgA e IgG	-	-	2	Ortiz y col., 2011
Electrodo Au con tioles	Inmunosensor impedimétrico	ATG2-IgA e IgG	-	-	16	Dulay y col., 2011
Electrodo Au con tioles	Inmunosensor impedimétrico	AGA-IgA e IgG	-	-	6	Rosales-Rivera y col., 2011
^b SPCE-MWCNTs-NPAus	Inmunosensor voltamétrico	ATG2-IgA e IgG	-	-	8	Neves y col., 2012a
^b SPCE-MWCNTs-NPAus	Inmunosensor voltamétrico	AGA-IgA AGA-IgG	-	-	10	Neves y col., 2012b
SPE	Inmunosensor voltamétrico	ATG2-IgA ATG2-IgG AGA-IgA AGA-IgG	-	-	6	Neves y col., 2013
SPE	Inmunosensor magneto voltamétrico	ATG2-IgA	100	84	48	Kergaravat y col., 2013
m-GEC	Inmunosensor magneto amperométrico	APDG-IgA APDG-IgG ATG2-IgA APDG/ATG2	91 67 83 81	96 89 93 93	70	Nuestro estudio, 2013

^aCMC = carboximetilcelulosa; ^bSPCE-MWCNTs-NPAus = SPE nanoestructurados - nanotubos de carbono multicapas modificados con carboxilos - nanopartículas de oro.



6. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir de las metodologías desarrolladas en la presente tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones parciales:

En la primera sección, se optimizaron las señales electroquímicas de siete cosustratos en los sistemas HRP-cosustrato- H_2O_2 , mediante ensayos de optimización de un factor y optimizaciones sistemáticas con técnicas quimiométricas. La técnica electroquímica seleccionada fue la voltametría de onda cuadrada para todos los sistemas de revelación, excepto para el sistema con TMB como cosustrato. Este cosustrato presentó la particularidad de que sus potenciales de oxidación y reducción en la VC estuvieron muy próximos entre sí; por lo cual al aplicar un barrido en la rama catódica se obtenía una corriente de reducción indeseada debido a productos de oxidación generados por el potencial aplicado y no como consecuencia de la reacción enzimática. Es por ello que este fue el único sistema sólo analizado mediante amperometría. El cosustrato OPD mostró la mayor eficiencia electroquímica y buenas características en su rol como cosustrato de HRP (alta afinidad y eficiencia por la enzima) en comparación a los otros seis cosustratos. A partir de los siete sistemas optimizados se construyeron curvas de calibración para la cuantificación de HRP. Las sensibilidades analíticas de los diferentes sistemas fluctuaron desde $3,0 \times 10^{10}$ a $1,3 \times 10^9$ mol L⁻¹ de concentración de HRP. El sistema HRP-OPD- H_2O_2 presentó el intervalo lineal más amplio ($9,6 \times 10^{-11}$ a $1,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) con el menor LD ($3,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹), en un tiempo de reacción reducido (60 s); por lo cual fue seleccionado con la finalidad de, posteriormente, ser aplicado como sistema de revelación de diferentes ensayos de bioafinidad.

En la segunda sección, se puso a prueba la capacidad de recuperación y preconcentración de un analito a partir de una matriz compleja, mediante la utilización de PM funcionalizadas. Para ello, se desarrolló un magneto biosensor electroquímico basado en un formato competitivo simple con la finalidad de cuantificar biotina en muestras de origen lácteo. Específicamente, la biotina presente en las muestras y la biotina-HRP compitieron por los sitios libres de estreptavidina, la cual se encontraba inmovilizada sobre PM. La recuperación de las PM modificadas se realizó directamente sobre el transductor electroquímico (m-GEC) y se utilizó OPD- H_2O_2 como sistema de revelación de la actividad enzimática mediante voltametría de onda cuadrada. El tiempo de análisis total fue de 40 minutos para 20 ensayos realizados conjuntamente. A partir de una curva de calibración para biotina, se pudo cuantificar la vitamina en un suplemento dietario y una formulación infantil. A

CONCLUSIONES

partir de adiciones de biotina estándar en las muestras se lograron buenas recuperaciones, que oscilaron entre 86 y 120%. Además, la adición de la vitamina en una muestra libre de biotina permitieron comprobar la ausencia del efecto matriz, ya que se obtuvieron recuperaciones entre 95 y 110%, con CV% menores al 15%. La eficacia en las recuperaciones a partir de matrices complejas, con alto contenido proteico, puede ser atribuida al uso de las PM como soporte de la reacción, pudiendo ser fácilmente manipuladas con la utilización de imanes permanentes. El método desarrollado con un LD de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (9 μg de biotina en 100 g de muestra) ofrece como ventaja, con respecto a las metodologías clásicas de cuantificación de biotina, un procedimiento simple y rápido, sin necesidad de extracciones complejas y/o derivatizaciones, en el cual sólo se requiere un simple pretratamiento de la muestra basado en una extracción con solución tampón.

En la tercera sección, se desarrolló un magneto inmunoensayo fluorescente basado en TG₂ inmovilizada sobre PM tosilo, con la finalidad de detectar ATG₂, de manera de contribuir al diagnóstico de la enfermedad celíaca. Con respecto al rendimiento analítico logrado con el presente desarrollo, se pueden destacar ciertas ventajas con respecto a los ensayos ELISA, con detección óptica, disponibles comercialmente y utilizados como métodos de rutina en los centros de salud: (i) el sistema de revelación usado en el magneto inmunoensayo fluorescente permitió disminuir 10 minutos el tiempo total de ensayo; (ii) el método presentado es aproximadamente cuatro veces más sensible; (iii) las PM-TG₂ mostraron buena estabilidad y baja adsorción inespecífica del anticuerpo rotulado con HRP, cuando el analito de interés no estaba presente en el ensayo; (iv) se obtuvo un menor valor de corte (8,1 U de ATG₂ frente a 20 U del ELISA) a partir de la curva ROC que permitió una buena discriminación entre pacientes celíacos y no celíacos, con una SE de 96,6%, una ES de 94,7% y una eficiencia como ABC de 97,0%. La utilidad clínica del magneto inmunoensayo fluorescente se demostró mediante el análisis de 48 muestras provenientes de pacientes clínicamente clasificados como celíacos y no celíacos. El inmunoensayo exhibió una SE del 96,6%, una ES del 89,5% y una eficiencia del 93,7% comparado con el ELISA comercial. Acorde a todas estas características, el magneto inmunoensayo fluorescente propuesto puede ser considerado como una herramienta analítica de alto rendimiento para el diagnóstico clínico de la enfermedad celíaca.

En la cuarta sección, se desarrolló un magneto inmunosensor electroquímico para la detección de ATG₂ en pacientes celíacos. En las etapas de optimización y validación, se utilizó un prototipo a partir del cual se seleccionaron las condiciones óptimas del inmunoensayo. Para ello, las PM-TG₂ se utilizaron como soporte de la inmunoreacción, permitiendo la captura del analito modelo ATG₂ del isotipo IgG desarrollados en cabra, disponible comercialmente, con la posterior detección electroquímica mediante el empleo del sistema de revelación previamente optimizado (OPD-H₂O₂). Como sistema de transducción se empleó la celda electroquímica tradicional constituida por tres electrodos, siendo el electrodo de trabajo (c-GEC) diseñado en nuestro laboratorio. Se logró un buen

CONCLUSIONES

rendimiento analítico del prototipo desarrollado, con recuperaciones desde 94 a 123% del ATG₂ modelo a partir de suero y plasma como matriz, con precisiones intra- e inter-ensayo menores al 13% y al 16%, respectivamente. Posteriormente, buscando miniaturizar el prototipo optimizado y lograr un desarrollo con mayor potencialidad de ser comercializado y producido en grandes cantidades para su implementación en el mercado, se transfirieron las condiciones optimizadas en el transductor c-GEC a los SPE. Este nuevo formato se utilizó para evaluar ATG₂ presentes en sueros a partir de 48 muestras de pacientes clasificados clínicamente como celíacos y no celíacos, obteniendo un valor de corte de 16,95 U de ATG₂, mediante el análisis con la curva ROC con SE del 100% y ES del 84%. Al comparar los resultados obtenidos con el magneto inmunosensor electroquímico con los de un ELISA comercial, se obtuvieron iguales SE y ES que las calculadas a partir de la curva ROC y una eficiencia del 93,7%. El ensayo propuesto es más simple, económico y no depende de la subjetividad del operador comparado con los métodos serológicos de alta especificidad para la enfermedad celíaca que detectan a los EMA mediante IFI. Además, presentó buena SE y ES en el análisis serológico comparado con los ELISA de detección óptica, utilizando un procedimiento analítico sin pretratamiento de las muestras y con instrumental más económico.

En la quinta sección, se desarrolló un magneto inmunosensor electroquímico para la detección amperométrica de APDG y se compararon sus características con un desarrollo cuyo biorreconocimiento se basaba en ATG₂. En el diseño de los inmunosensores se seleccionaron partículas magnéticas de pequeño tamaño para inmovilizar a los PDG y TG₂, con la finalidad de aumentar la sensibilidad y disminuir los tiempos del inmunoensayo. Diferentes estrategias basadas en magnetos inmunosensores electroquímicos fueron desarrolladas y aplicadas al análisis de muestras de pacientes celíacos y no celíacos. Los resultados de cada inmunosensor fueron analizados mediante las curvas ROC, manteniendo el criterio de la mejor especificidad, que permita discriminar entre pacientes celíacos y no celíacos, de manera de disminuir los falsos negativos y someter a personas no celíacas a la confirmación con biopsia. Dos valores de corte se calcularon, uno para todas las muestras analizadas (n = 70) y otro para las muestras confirmadas histológicamente con biopsia (n = 23). Por un lado, se detectaron los APDG para los isotipo IgA e IgG en los sueros, debido a que existe amplia información bibliográfica de que ambos isotipos son buenos marcadores serológicos de la enfermedad celíaca. En el caso particular de este desarrollo, el inmunosensor para APDG-IgG presentó una menor SE, considerando los dos criterios de corte con respecto al inmunosensor para APDG-IgA. Esto puede ser atribuido a un, posiblemente, efecto matriz causado por anticuerpos IgG no específicos de la enfermedad celíaca; debido a la abundancia de anticuerpos del isotipo IgG en el suero humano. Por otro lado, la detección de ATG₂-IgA presenta un rendimiento analítico aceptable (SE y ES superiores al 80%) pero inferior al obtenido mediante APDG-IgA. Al comparar los resultados obtenidos mediante los diferentes magnetos inmunosensores

CONCLUSIONES

electroquímicos con los resultados informados por los hospitales, se obtienen bajos rendimientos nuevamente para el inmunosensor que detecta APDG-IgG. Teniendo en cuenta las muestras confirmadas histológicamente ($n = 23$), el inmunosensor con mayor rendimiento fue APDG-IgA (SE, ES y eficiencia de 100%); con similares características a dos ELISA tradicionales, ensayados simultáneamente como métodos de rutina. En función de todo esto, cabe destacar que el magneto inmunosensor electroquímico que detecta APDG-IgA presentó un buen rendimiento analítico en la discriminación de pacientes con y sin enfermedad celíaca, no existiendo en bibliografía evidencia de metodologías electroquímicas con finalidades similares.

En referencia a los objetivos propuestos para este trabajo de tesis y teniendo en cuenta las conclusiones particulares antes mencionadas se concluye que:

- ❖ Se optimizaron siete sistemas de revelación para HRP, una enzima comúnmente utilizada como rótulo en los diferentes formatos de la inmunoreacción. Además, se compararon los rendimientos analíticos de cada sistema, seleccionando el que presentó el mejor comportamiento al ser evaluados mediante técnicas electroquímicas.

- ❖ Se desarrollaron metodologías analíticas, incluyendo a las PM como soporte de la reacción de bioafinidad, obteniendo buenas recuperaciones de analitos biológicos al ser evaluadas dentro de matrices complejas, como son los alimentos y los sueros sanguíneos. Las partículas magnéticas específicas para unir péptidos demostraron un buen rendimiento analítico al ser utilizadas en el diseño del inmunosensor APDG, involucrando un procedimiento de inmovilización más rápido y simple que el que requieren las PM funcionalizadas con grupos tosilo.

- ❖ Se detectaron los ATG2-IgA con elevada sensibilidad y especificidad mediante dos metodologías analíticas acopladas a detección fluorescente y electroquímica. Los anticuerpos captados mediante un formato de inmunoreacción indirecto, localizados sobre PM funcionalizadas con grupos tosilo, fueron fácilmente manipulados con el empleo de imanes permanentes, ubicados por debajo de placas de microtitulación de 96 pocillos, en la metodología fluorescente o en el transductor (c-GEC o SPE) en la metodología electroquímica.

- ❖ Se aplicaron las dos metodologías desarrolladas para la detección de ATG2 en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Al comparar el magneto inmunoensayo fluorescente, con respecto a los ELISA tradicionalmente utilizados como métodos de rutina en los centros de salud, se puede concluir que se redujo el valor de corte a la mitad aproximadamente, se disminuyó el tiempo de análisis en 30 min y se obtuvo cuatro veces más sensibilidad en el diagnóstico. En cuanto al magneto inmunosensor electroquímico, este es más simple, económico y no depende de la subjetividad del operador en comparación con la determinación de los EMA, utilizados como metodologías de referencia en el diagnóstico de la celiaquía y se obtuvo el doble de sensibilidad en el diagnóstico, con

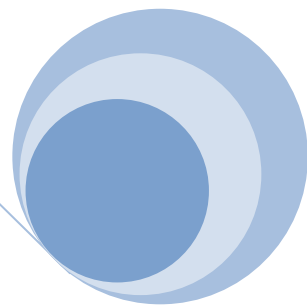
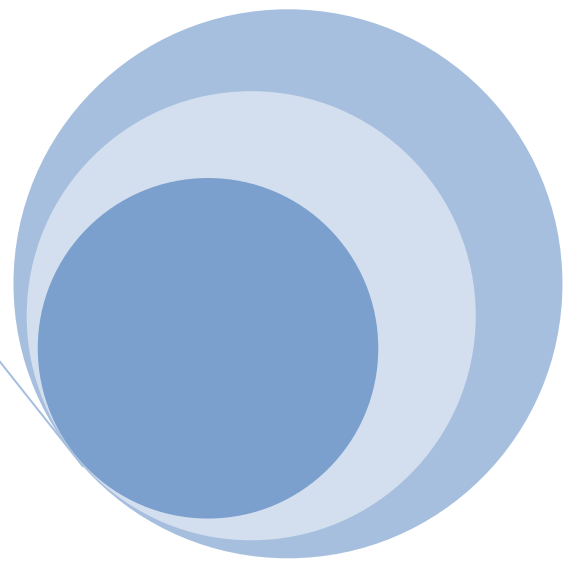
CONCLUSIONES

un valor de corte similar al del ELISA. Comparando las metodologías desarrolladas, en el caso de aquella con detección fluorescente se requirió un menor tiempo de análisis, el doble de sensibilidad en el diagnóstico y un menor valor de corte que la electroquímica; sin embargo, ambas lograron buena discriminación entre muestras provenientes de pacientes celíacos y no celíacos y presentaron la misma eficiencia frente a las muestras clínicamente diagnosticadas (93,8%). Si bien, ambos desarrollos presentan la potenciabilidad de transferencia a dispositivos miniaturizados, existen mayores evidencias de implementación en metodologías con detección electroquímica. Esto se debe a que las magnitudes eléctricas (diferencia de potencial, intensidad de corriente, carga, etc.) en contraste con ciertas magnitudes ópticas (como son la absorción de la energía radiante) pueden ser fácilmente controladas en escalas dimensionales pequeñas, utilizando pequeños dispositivos como fuentes de energía y nano/microelectrodos como transductores. Recientemente, métodos basados en estas técnicas son considerados innovación tecnológica, ya que pueden ser utilizados como métodos de rutina, una vez cumplidos los requisitos de fiabilidad, validación y comercialización.

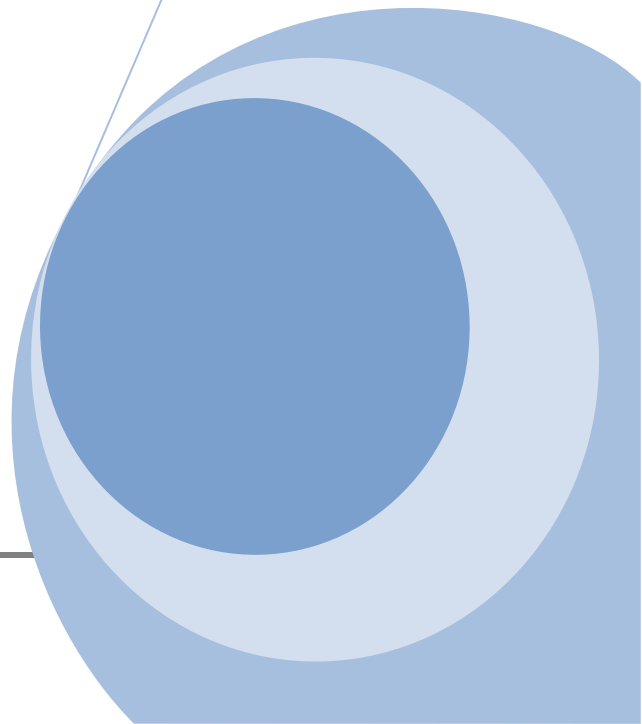
❖ Se demostraron la utilidad diagnóstica de los APDG-IgA, debido a que se obtuvieron excelentes valores de sensibilidad y especificidad en el magneto inmunosensor electroquímico, con rendimiento analítico similar a los logrados con ELISA óptica, utilizado como metodología tradicional de detección de estos anticuerpos. Además, se compararon los rendimientos analíticos de diferentes magnetos inmunosensores electroquímicos destinados a la detección de APDG-IgA, APDG-IgG y ATG2-IgA con los obtenidos mediante ELISA tradicionales. Los mejores resultados se lograron con el inmunosensor para APDG-IgA. Es importante remarcar que en bibliografía no se ha encontrado ninguna metodología con detección electroquímica destinada a los APDG-IgA, por lo que esta estrategia se encuentra en trámite de patentamiento.

❖ Se transmitieron los resultados logrados en diferentes medios de difusión gráficos, como diarios y revistas de alcance internacional; y audiovisuales como radio y televisión.

❖ El doctorando logró incorporar nuevos conocimientos y actitudes frente a las diferentes dificultades presentadas en el transcurso de la tesis. Además, en función de los objetivos específicos de la tesis, se comprendió la importancia de desarrollar metodologías que mejoren el diagnóstico de la enfermedad celíaca a partir del intercambio y el planteo de necesidades de los profesionales de la salud, contribuyendo en la difusión y la producción de dispositivos que serán de utilidad para la sociedad en general.



7. PERSPECTIVAS



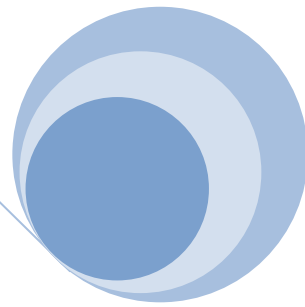
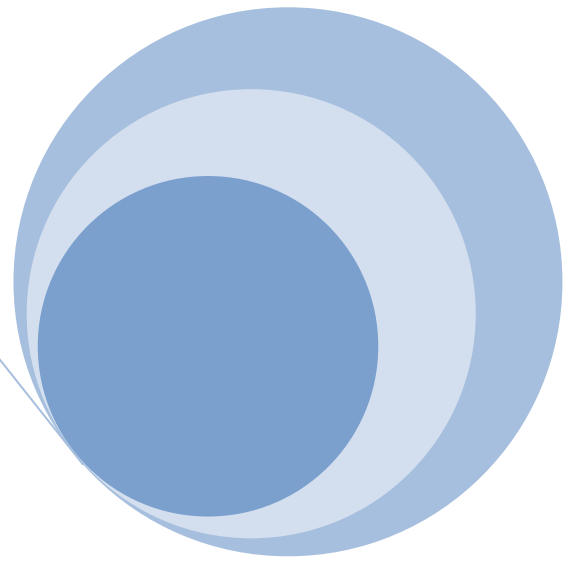
PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

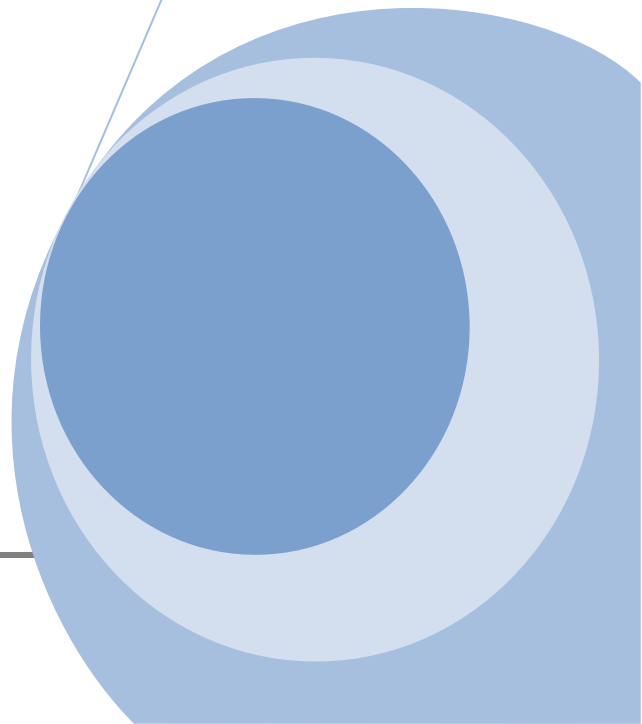
Con la finalidad de mejorar la especificidad de los inmunoensayos en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, se debería cambiar el antígeno TG2 proveniente de cobayo por TG2 recombinante humana, debido a que entre ambas proteínas existe un 81% de homología.

Los resultados logrados con los inmunoensayos con detección electroquímica y fluorescente fueron muy alentadores, lo cual deja abierta la posibilidad de nuevos desarrollos en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. La miniaturización de los procedimientos analíticos a partir de *microchips*, plataformas microfluídicas, laboratorio sobre un *chips* o Sistema de Microanálisis Total son las tendencias actuales de los análisis biológicos y químicos. Estos sistemas son diseñados con la ventaja de utilizar pequeñas cantidades de muestra y disminuir el consumo de reactivos, generar análisis rápidos, reducir costos y posibilidad de realizar detecciones fuera del laboratorio. Además, incluir PM en estos desarrollos posibilita la fácil miniaturización y automatización mediante la manipulación controlada por actuadores magnéticos en microsistemas que incluyan microcanales y microceldas. En este contexto, la detección fluorescente y electroquímica serían las más factibles de aplicar con respecto a la detección óptica de espectroscopía UV-VIS, ya que los métodos basados en absorbancia no son lo suficientemente sensibles en pequeña escala, debido a que el paso óptico se reduce por los pequeños calibres de los microcanales utilizados.

Los inmunoensayos aquí presentados siguen en continuo estudio y desarrollo dentro de nuestro grupo de investigación, con el objetivo de mejorar las condiciones de la transducción de la señal analítica a través del empleo de nuevos materiales y con la finalidad de lograr la construcción completa de los futuros dispositivos, con bajos costos de producción y el empleo de insumos nacionales. Desde el punto de vista específico de la enfermedad celíaca, el contar con dispositivos bioanalíticos económicos resulta primordial, ya que cualquier centro de salud podría disponer de una simple metodología para estudios poblacionales, anticipando el tratamiento para aquellos pacientes asintomáticos y, ulteriormente, evitando complicaciones para los pacientes que la padezcan. Además, estos prototipos pueden ser fácilmente transferidos con diversas finalidades, como ser la detección de marcadores de otras enfermedades o controlar los niveles de los componentes permitidos y no permitidos en un alimento o medicamento, entre otras muchas aplicaciones.



8.BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Rabeah, K.; Ashkenazi, A.; Atias, D.; Amir, L. y Marks, R.S. (2009) *Highly sensitive amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli*. Biosens. Bioelectron. 24: 3461-3466.
- Adornetto, G.; Volpe, G.; De Stefano, A.; Martini, S.; Gallucci, G.; Manzoni, A.; Bernardini, S.; Mascini, M. y Moscone, D. (2012) *An ELIME assay for the rapid diagnosis of coeliac disease*. Anal. Bioanal. Chem. 403: 1191-1194.
- Agrawal, A.; Sathe, T. y Nie, S. (2007) *Single-Bead Immunoassays Using Magnetic Microparticles and Spectral-Shifting Quantum Dots*. J. Agric. Food Chem. 55: 3778-3782.
- Alaedini, A. y Green, P.H. (2008) *Autoantibodies in celiac disease*. Autoimmunity. 41: 19-26.
- Aleanzi, M.; Demonte, A.M.; Esper, C.; Garcilazo, S. y Waggener, M. (2001) *Antibody Recognition against Native and Selectively Deamidated Gliadin Peptides*. Clin. Chem. 47: 2023-2028.
- Alefantis, T.; Grewal, P.; Ashton, J.; Khan, A.S.; Valdes, J.J. y Del Vecchio, V.G. (2004) *A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-through put screening*. Mol. Cell. Probes 18: 379-382.
- Alemzadeh, I. y Nejati, S. (2009) *Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase*. J. Hazard. Mater. 166: 1082-1086.
- Ankelo, M.; Kleimola, V.; Simell, S.; Simell, O.; Knip, M.; Jokisalo, E.; Tarkia, M.; Westerlund, A.; He, Q.; Viander, M.; Ilonen J. y Hinkkanen, A.E. (2007) *Antibody responses to deamidated gliadin peptide show high specificity and parallel antibodies to tissue transglutaminase in developing coeliac disease*. Clin. Exp. Immunol. 150: 285-293.
- AOAC (1993) *Peer-Verified Method Program, Manual on Policies and Procedures*, Arlington, E.E.U.U.
- Appell, M. y Bosma, W.B. (2011) *Effect of surfactants on the spectrofluorimetric properties of zearalenone*. J. Lumin. 131: 2330-2334.
- Arévalo, F.J.; Granero, A.M.; Fernández, H.; Raba, J.; Zon, M.A. (2011) *Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor*. Talanta 83: 966-973.
- Armstrong, D.; Don-Wauchope, A.C. y Verdu, E.F. (2011) *Testing for gluten-related disorders in clinical practice: The role of serology in managing the spectrum of gluten sensitivity*. Can. J. Gastroenterol. 25: 193-197.

BIBLIOGRAFIA

- Arranz, E. y Garrote, J.A. (2010) *Inmunología de la enfermedad celiaca*. Gastroenterol. Hepatol. 33: 643-651.
- Azevedo, A.M.; Martins, V.C.; Prazeres, D.M.F.; Vojinovic, V.; Cabral, J.M.S. y Fonseca, L.P. (2003) *Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology*. Biotechnol. Annu. Rev. 9: 199-247.
- Balkenhohl, T. y Lisdat, F. (2007a) *Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera*. Anal. Chim. Acta 597: 50-57.
- Balkenhohl, T. y Lisdat, F. (2007b) *An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins*. Analyst 132: 314-322.
- Barbato, M.; Maiella, G.; Di Camillo, C.; Guida, S.; Valitutti, F.; Lastrucci, G.; Mainiero, F. y Cucchiara, S. (2011) *The anti-deamidated gliadin peptide antibodies unmask celiac disease in small children with chronic diarrhoea*. Digest. Liver Dis. 43: 465-469.
- Bard, A.J. y Faulkner, L.R. (2001) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, E.E.U.U.
- Baskeyfield, D.E.H.; Davis, F.; Magan, N. y Tothill, I.E. (2011) *A membrane-based immunosensor for the analysis of the herbicide isoproturon*. Anal. Chim. Acta 699: 223-231.
- Basso, D.; Guariso, G.; Bozzato, D.; Rossi, E.; Pescarin, M.; Fogar, P.; Moza, S.; Navaglia, F.; Pelloso, M.; Gasparetto, M.; Zambon, C-F.; Padoan, A.; Greco, E.; Rugge, M.; Plebani, M. (2011) *New screening tests enrich anti-transglutaminase results and support a highly sensitive two-test based strategy for celiac disease diagnosis*. Clin. Chim. Acta 412: 1662-1667.
- Benhar, I.; Eshkenazi, I.; Neufeld, T.; Opatowsky, J.; Shaky, S. y Rishpon, J. (2001) *Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors*. Talanta 55: 899-907.
- Berson, S.A. y Yalow, R.S. (1959) *Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods*. Nature 184: 1648-1649.
- Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Silveira Villar, L. y Escaleira, L.A. (2008) *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta 76: 965-977.
- Bilal, S. y Holze, R. (2006) *Electrochemical copolymerization of o-toluidine and o-phenylenediamine*. J. Electroanal. Chem. 592: 1-13.
- Bitsch, R. (2003) *Biotin/Properties and Determination*, Elsevier, Germany.
- Bodalo, A.; Gomez, J.L.; Gomez, E.; Hidalgo, A.M.; Gomez, M. y Yelo, A.M. (2007) *Elimination of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide: Kinetic model and intrinsic parameters*. Biochem. Eng. J. 34: 242-247.
- Bojorge-Ramirez, N. I.; Medeiros Salgado, A. y Valdman, B. (2007) *Amperometric Immunosensor for Detecting Schistosoma mansoni Antibody*. Assay and Drug Development Technologies 5: 673-682.
- Bonamico, M.; Tiberti, C.; Picarelli, A.; Mariani, P.; Rossi, D.; Cipolletta, E.; Greco, M.; Tola, M.D.; Sabbatella, L.; Carabba, B.; Magliocca, F.M.; Strisciuglio, P. y Di Mario, U. (2001)

BIBLIOGRAFIA

Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. Am. J. Gastroenterol. 96: 1536–1540.

Bonjour, J.P. (1984) *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects* (Ed.: L. J. Machlin) Marcel Dekker, New York, p. 403–435.

Bosnjakovic, A.; Mishra, M.K.; Han, H.J.; Romero, R. y Kannan, R.M. (2012) *A dendrimer-based immunosensor for improved capture and detection of tumor necrosis factor- α cytokine.* Anal. Chim. Acta 720: 118–125.

Bowers-Komro, D.M.; Chastain, J.L. y McCormick, D.B. (1986) *Separation of biotin and analogs by high-performance liquid chromatography.* Methods Enzymol. 122: 63–67.

Bradford, M. M. (1976) *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248–254.

Brown, I.; Mino-Kenudson, M.; Deshpande, V. y Lauwers, G.Y. (2006) *Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: an increasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis.* Arch. Pathol. Lab. Med. 130: 1020–1025.

Brynda, E.; Houska, M.; Kvor, J. y Ramsden, J.J. (1998) *Immobilisation of multilayer bioreceptor assemblies on solid substrates.* Biosens. Bioelectron. 13: 165–172.

Burgueño, M.J.; García-Bastos, J.L. y González-Buitrago, J.M. (1995) *Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas.* Med Clin (Barc): 104: 661–670.

Buskirk, A.R.; Landrigan, A. y Liu, D.R. (2004) *Engineering a Ligand-Dependent RNA Transcriptional Activator.* Chem. Biol. 11: 1157–1163.

Caballero, B. (2009) *Guide to Nutritional Supplements.* Elsevier, Academic Press, Reino Unido.

Castillo-Ortiz, J.D.; Durán-Barragán, S.; Sánchez-Ortíz, A. y Ramos-Remus, C. (2011) *Anti-transglutaminase, antigliadin and ultra purified anti-gliadin antibodies in patients with a diagnosis of rheumatoid arthritis.* Reumatol. Clín. 7: 27–29.

Cataldo, F.; Marino, V.; Bottaro, G.; Greco, P. y Ventura, A. (1997) *Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency.* J. Pediatric. 131: 306–308.

Centi, S.; Laschi, S.; Fránek, M. y Mascini, M. (2005) *A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalized magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs).* Anal. Chim. Acta 538: 205–212.

Cespedes, F. y Alegret, S. (2000) *New materials for electrochemical sensing II. Rigid carbon-polymer composites.* Trends Anal. Chem. 19: 276–285.

Cespedes, F.; Fabregas, E. y Alegret, S. (1996) *New materials for electrochemical sensing. I. Rigid conducting composites.* Trends Anal. Chem. 15: 296–304.

BIBLIOGRAFIA

- Cheng, Y.; Liu, Y.; Huang, J.; Li, K.; Zhang, W.; Xian, Y.; Jin, L. (2009). *Combining biofunctional magnetic nanoparticles and ATP bioluminescence for rapid detection of Escherichia coli*. *Talanta* 77: 1332-1336.
- Chien, P.F.W. y Khan, K. (2001) *Evaluation of a clinical test. II: Assessment of validity*. *Br. J. Obst. Gynaecol.* 108: 568-572.
- Clark, C. y Lyons, C. (1962) *Electrode System for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102: 29-45.
- Código Alimentario Argentino (2007) based on Codex Alimentarius Commission, 2007a. *Standards for Infant Formulas and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants (CodexStan 72-1981)*.
- Conneely, G.; Aherne, M.; Lu, H. y Guilbault, G.G. (2007) *Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 121: 103-112.
- Cornell, B.A.; Braach-Maksvytis, V.L.B.; King, L.G. Osman, P.D.; Raguse, B.; Wieczorek, L. y Pace, R.J. (1997) *A biosensor that uses ion-channel switches*. *Nature* 387: 580-583.
- Cox, C.; Camus, P.; Buret, J. y Duivivier, J. (1982) *An enzymatic cycling procedure for NAD⁺ using an irreversible reaction with NAD⁺-peroxidase*. *Anal. Biochem.* 119: 185-193.
- Crespo Pérez, L.; Castillejo de Villasante, G.; Cano Ruiz, A. y León, F. (2012) *Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease*. *Eur. J. Inter. Med.* 23: 9-14.
- Cruz, H.; Rosa, C.C. y Oliva, A. (2002) *Immunosensors for diagnostic applications*. *Sensors Update* 9: 283-312.
- Cuadrado, N.H.; Arellano, J.B.; Calvetec, J.J.; Sanz, L.; Zhadand, G.G.; Polikarpove, I.; Bursakovf, S.; Roiga, M.G. y Shnyrov, V.L. (2012) *Substrate specificity of the Chamaerops excelsa palm tree peroxidase. A steady-state kinetic study*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 74: 103-108.
- Davies, D.R. y Metzger, H. (1983) *Structural basis of antibody function*. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 87-117.
- De Leenheer, A.; Lamb, D.; Lambert, W. y Van Bocxlaer, J. (2000) *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. Tercera edición, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York, E.E.U.U.
- Del Campillo-Campbell, A.; Dykhuizen, D. y Cleary, P. (1979) *Enzymatic reduction of d-biotin d-sulfoxide to d-biotin*. *Method Enzymol.* 62: 379-385.
- Delgado Reyes, F.; Fernández Romero, J.M. y Luque de Castro, M.D. (2001) *Determination of biotin in foodstuffs and pharmaceutical preparations using a biosensing system based on the streptavidin-biotin interaction*. *Anal. Chim. Acta* 436: 109-117.
- Delibato, E.; Volpe, G.; Romanazzo, D.; De Medici, D.; Toti, L.; Moscone, D. y Palleschi, G. (2009) *Development and Application of an Electrochemical Plate Coupled with Immunomagnetic*

BIBLIOGRAFIA

Beads (ELIME) Array for Salmonella enterica Detection in Meat Samples. J. Agric. Food Chem. 57: 7200–7204.

Deng, A y Yang, H. (2007) *A multichannel electrochemical detector coupled with an ELISA microtiter plate for the immunoassay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.* Sens. Actuat. B-Chem. 124: 202–208.

Deng, T.; Li, J.; Huan, S.; Yang, H.; Wang, H.; Shen, G. y Yu, R. (2006) *Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for biotin based on mixed selfassembled monolayers and metastable molecular complex receptor.* Biosens. Bioelectron. 21: 1545–1552.

Desbene, P.L.; Coustal, S. y Frappier, F. (1983) *Separation of biotin and its analogs by high-performance liquid chromatography: Convenient labeling for ultraviolet or fluorimetric detection.* Anal. Biochem. 128: 359–362.

DeSilva, B.; Smith, W.; Weiner, R.; Kelley, M.; Smolec, J.M.; Lee, B.; Khan, M.; Tacey, R.; Hill, H.; Celniker, A. (2003) *Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules.* Pharm. Res. 11: 1885–1900.

Díaz-González, M.; González-García, M.B. y Costa-García, A. (2005) *Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes.* Biosens. Bioelectron. 20: 2035–2043.

Dieterich, W.; Ehnis, T.; Bauer, M.; Donner, P.; Volta, U. y Riecken, E. (1997) *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.* Nat. Med. 3: 797–780.

Donaldson, M.R.; Firth, S.D.; Wimpee, H.; Leiferman, K.M.; Zone, J.J.; Horsley, W.; O’Gorman, M.A.; Jackson, W.D.; Neuhausen, S.L.; Hull, C.M. y Book, L.S. (2007) *Correlation of Duodenal Histology With Tissue Transglutaminase and Endomysial Antibody Levels in Pediatric Celiac Disease.* Clin. Gastroenterol. Hepatol. 5: 567–573.

Dong, J.; Gao, N.; Peng, Y.; Guo, C.; Lv, Z.; Wang, Y.; Zhou, C.; Ning, B.; Liu, M. y Gao, Z. (2012) *Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element.* Food Control 25: 543–549.

Dulay, S.; Lozano-Sánchez, P.; Iwuoha, E.; Katakis, I. y O’Sullivan, C. (2011) *Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry.* Biosens. Bioelectron. 26: 3852–3856.

Enrico, D.L.; Manera, M.G.; Montagna, G.; Cimaglia, F.; Chiesa, M.; Poltronieri, P.; Santino, A. y Rella, R. (2013) *SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples.* Opt. Commun. 294: 420–426.

Escosura-Muniz, A. y Merkoçi, A. (2011) *A Nanochannel/Nanoparticle-Based Filtering and Sensing Platform for Direct Detection of a Cancer Biomarker in Blood.* Small 7: 675–682.

Esseghaier, C.; Ng, A.; Zourob, M. (2013) *A novel and rapid assay for HIV-1 protease detection using magnetic bead mediation.* Biosens. Bioelectron. 41: 335–341.

BIBLIOGRAFIA

EURACHEM (1998) *Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM Secretariat, Londrés, Inglaterra.

EURACHEM (2005) *Métodos Analíticos Adecuados para su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030, segunda edición, Los Qués, México.

Faguet, J.P.; Puisieux, F. y Duchene, D. (1977) *Les comprimés effervescents: formulation, fabrication, contrôle*. Labo-Pharma, Probl. Tech. 269: 747-758.

Fanjul-Bolado, P.; Gonzalez-Garcia, M.B. y Costa-Garcia, A. (2005) *Amperometric detection in TMB/HRP-based assays*. Anal. Bioanal. Chem. 382: 297-302.

Farrel, R.F. y Nelly, C.P. (2002) *Celiac sprue*. N. Engl. J. Med. 346: 180-188.

Fasano, A. y Catassi, C. (2001) *Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum*. Gastroenterol. 120: 636-651.

Fasano, A.; Berti, I.; Gerarduzzi, T.; Not, T.; Colletti, R.B.; Drago, S.; Elitsur, Y.; Green, P.H.; Guandalini, S.; Hill, I.D.; Pietzak, M.; Ventura, A.; Thorpe, M.; Kryszak, D.; Fornaroli, F.; Wasserman, S.S.; Murray, J.A. y Horvath, K. (2003) *Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study*. Arch. Intern. Med. 63: 286-292.

Faustini, M.; Battocchio, M; Vigo, D.; Prandi, A.; Veronesi, M.C.; Comin, A. y Cairoli, F. (2007) *Pregnancy diagnosis in dairy cows by whey progesterone analysis: An ROC approach*. Theriogenology 67: 1386-1392.

FDA (2000) *Guidance for Industry (draft): Analytical Procedures and Methods Validation*.

FDA (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.

Fernández-Bañares, F.; Esteve-Comas, M. y Rosinach, M. (2005) *Screening of celiac disease in high risk groups*. Gastroenterol. Hepatol. 28: 561-566.

Ford, J.; Hurrell, R. y Finot, P. (1983) *Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins*. Br. J. Nutr. 49: 355-364.

Ford, J.E. (1967) *The influence of the dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and during subsequent exposure to sunlight*. J. Dairy Res. 34: 239-247.

Fornara, O.; Odeberg, J.; Khan, Z.; Stragliotto, G.; Peredo, I.; Butler L. y Söderberg Naucér, C. (2013). *Human cytomegalovirus particles directly suppress CD4 T-lymphocyte activation and proliferation*. Immunobiology 218: 1034-1040.

Fornera, S. y Walde, P. (2010) *Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenyldiamine*. Anal. Biochem. 407: 293-295.

Fowler, J.M.; Wong, D.K.Y.; Halsall, H.B. y Heineman, W.R. (2008) *Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors*. En: *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. (Eds.: X. Zhang, H. Ju, J. Wang), Elsevier Inc., Amsterdam, p. 115-143.

BIBLIOGRAFIA

- Fox, P. y McSweeney, P. (1998) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer, Thomson Science, London, Reino Unido.
- Freifelder, D. (2003) *Técnicas de Bioquímica y Biología molecular*. Reverté S.A., Barcelona, España.
- Fukui, T.; Inuma, K.; Oizumi, J. y Izumi, Y. (1994) *Agar plate method using Lactobacillus plantarum for biotin determination in serum and urine*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 40: 491-498.
- Gan, Z. y Marquardt, R.R. (1999) *Colorimetric competitive inhibition method for the quantification of avidin, streptavidin and biotin*. J. Biochem. Bioph. Methods 39: 1-6.
- Gao, H.; Sanger, M.; Luginbuhl, R. y Sigrist, H. (1995) *Immunosensing with photoimmobilized immunoreagents on planar wave guides*. Biosens. Bioelectron. 10: 317-328.
- Gao, Y.; Guo, F.; Gokavi, S.; Chow, A.; Sheng, Q. y Guo, M. (2008) *Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays*. FoodChem. 110: 769-776.
- Gianfrani, C.; Auricchio, S. y Troncone, R. (2005) *Adaptative and innate immune responses in celiac disease*. Immunol. Lett. 99: 141-145.
- Gomes-Filho, S.L.R.; Dias, A.C.M.S.; Silva, M.M.S.; Silva, B.V.M. y Dutra, R.F. (2013) *A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T*. Microchem. J. 109: 10-15.
- Gomez, J.C.; Selvaggio, G.S.; Viola, M.; Pizarro, B.; la Motta, G.; de Barrio, S.; Castelletto, R.; Echeverría, R.; Sugai, E.; Vazquez, H.; Mauriño, E. y Bai, J.C. (2001) *Prevalence of Celiac Disease in Argentina: Screening of an Adult Population in the La Plata Area*. Am. J. Gastroenterol. 96.
- Gomez, J.L.; Bolado, A.; Gomez, E.; Hidalgo, A.M. y Gomez, M., (2005) *A New Method to Estimate Intrinsic Parameters in the Ping-pong Bisubstrate Kinetic: Application to the Oxipolymerization of Phenol*. Am. J. Biochem. Biotechnol. 1: 115-120.
- Gomez, M.; Matafonova, G.; Gomez, J.L.; Batoev, V. y Christofi, N. (2009) *Comparison of alternative treatments for 4-chlorophenol removal from aqueous solutions: use of free and immobilized soybean peroxidase and KrCl excilamp*. J. Hazard. Mater. 169: 46-51.
- Gong, F.; Zhou, Z.; Shen, G. y Yu, R. (2002) *Schistosoma japonicum antibody assay by immunosensing with fluorescence detection using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrate*. Talanta 58: 611-618.
- Gorton, L. (2005) *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Elsevier B.V., Sweden.
- Green, N. (1975) *Avidin*. Adv. Protein Chem. 29: 85-133.
- Green, P.H. y Cellier, C. (2007) *Celiac disease*. N. Engl. J. Med. 357: 1731-1743.
- Green, P.H. y Jabri, B. (2003) *Coeliac disease*. Lancet 362: 383-391.
- Greiner, M.; Pfeiffer, D. y Smith R.D. (2000) *Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests*. Prev. Vet. Med. 45: 23-41.

BIBLIOGRAFIA

- Greiner, M.; Sohr, D. y Gijbel, P. (1995) *A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests*. J. Immunol. Methods 185: 123-132.
- Grützner, N.; Hang, I.; Heilmann, R.M.; Spillmann, T.; Suchodolski, J.S. y J.M. Steiner. (2013) *Analytical validation of radioimmunoassays for the quantification of select pancreatic enzymes in jejunal fluid and fecal extracts from dogs*. Vet. J. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.022>
- Guo, Z.; Li, L. y Shen, H. (1999) *Study and analytical application of bromopyrogallol red as a hydrogen donor substrate for peroxidase*. Anal. Chim. Acta 379: 63-68.
- Hawcroft, D.; Hector, T. y Rowell, F. (1987) *Quantitative Bioassay*. John Wiley & Sons, Inc., New York, E.E.U.U., p. 91.
- Hayakawa, K. y Oizumi, J. (1987) *Determination of free biotin in plasma by liquid chromatography with fluorimetric detection*. J. Chromatogr. 413: 247-250.
- Hayat, A.; Barthelmebs, L. y Marty, J-L. (2011) *Enzyme-linked immunosensor base don super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid*. Anal. Chim. Acta 690: 248-252.
- He, Y.; Chen, H.; Zheng, J.; Zhang G. y Chen, Z. (1997) *Differential pulse voltammetric enzyme-linked immunoassay for the determination of Helicobacter pylori specific immunoglobulin G (IgG) antibody*. Talanta 44: 823-830.
- Helenius, M.; Jalkanen, S. y Yegutkin, G. (2012) *Enzyme-coupled assays for simultaneous detection of nanomolar ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and pyrophosphate concentrations in extracellular fluids*. Biochim. Biophys. Acta 1823: 1967-1975.
- Hervás, M.; López, M.A. y Escarpa, A. (2009) *Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety*. Anal. Chim. Acta 653: 167-172.
- Hinton, P.R.; Brownlow, C.; McMurray, I. y Cozens, B. (2004) *SPSS Explained*. Routledge Inc., New York, E.E.U.U.
- Ho, J.; Hsu, W.; Liao, W.; Chiu, J.; Chen, M.; Chang, H. y Li, C. (2010) *Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid*. Biosens. Bioelectron. 26: 1021-1027.
- Hokanson, G.C. (1994) *A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial validation process*. Pharm. Tech. 118-130.
- Höllner, U.; Wachter, F.; Wehrli, C. y Fizez, C. (2006) *Quantification of biotin in feed, food, tablets, and premixes using HPLC-MS/MS*. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 831: 8-16.
- Holme, D.J. y Peck, H. (1998) *Analytical Biochemistry*. En: *Inmunological methods*. Addison Wesley Longman Limited, London, Reino Unido, p. 227-245.

BIBLIOGRAFIA

Hong, S.C.; Lee, J.; Shin, H-C.; Kim, C-M.; Park, J.Y.; Koh, K.; Kim, H-J.; Chang, C.L. y Lee, J. (2011) *Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 in patient urine by surface plasmon resonance spectroscopy*. *Sens. Actuat B-Chem.* 160: 1434-1438

Hong-Xu, C.; Qin-Pei, D.; Li-Wei, Z. y Xin-Xiang, Z. (2009) *Quantification of testosterone and epitestosterone in biological samples by capillary electrophoresis with immunoaffinity extraction*. *Talanta* 78: 464-470.

ICH (1996). *Tripartite guideline Q2B: Validation of analytical procedures: methodology*. Center for Drug Evaluation and Research, The U.S. Food and Drug Administration.

ICH (2005) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of Analytical Procedures*. Text and Methodology - Q2 (R1).

Ikariyama, Y.; Furuki, M. y Aizawa, M. (1985) *Sensitive bioaffinity sensor with metastable molecular complex receptor and enzyme amplifier*. *Anal. Chem.* 57: 496-500.

Iost, M.R. y Crespilho, F.N. (2012) *Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics*. *Biosens. Bioelectron.* 31: 1-10.

ISO 3534-1. (1993) *Statistics-Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms*. ISO, Ginebra, Suiza.

IUPAC (1997) *Compendium of Analytical Nomenclature*. Analytical Chemistry Division. [Http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/](http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/).

IUPAC (1999) *Recommendations*. *Anal. Chim. Acta* 391: 105-126.

IUPAC (2002) *Technical Report*. *Pure Appl. Chem.* 74: 835-855.

Jacobs, C.B.; Peairs, M.J. y Venton, B.J. (2010) *Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules*. *Anal. Chim. Acta* 662: 105-127.

Järvenpää, M.-L.; Kuningas, K.; Niemi, I.; Hedberg, P.; Ristiniemi, N.; Pettersson, K. y Lövgren T. (2012) *Rapid and sensitive cardiac troponin I immunoassay based on fluorescent europium(III)-chelate-dyed nanoparticles*. *Clin. Chim. Acta* 414: 70-75.

Jayasena, S.D. (1999) *Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. *Clin Chem* 45: 1628-1650.

Jiao, K.; Sun, W.; Zhang, S. y Sun, G. (2000) *Application of p-phenylenediamine as an electrochemical substrate in peroxidase-mediated voltammetric enzyme immunoassay*. *Anal. Chim. Acta* 413: 71-78.

Kaiser, T.; Gudat, P.; Stock, W.; Pappert, G. y Luppá, P.B. (2000) *Biotinylated steroid derivatives as ligands for biospecific binding studies with monoclonal antibodies using immunosensor technology*. *Anal. Biochem.* 282: 173-185.

BIBLIOGRAFIA

- Kallakunta, V.M.; Staruch, A. y Mutus, B. (2010) *Sinapinic acid can replace ascorbate in the biotin switch assay*. *Biochim. Biophys. Acta* 1800: 23–30.
- Kamata, K.; Hagiwara, T.; Takahashi, M.; Uehara, S.; Nakayama, K. y Akiyama, K. (1986) *Determination of biotin in multivitamin pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *J. Chromatogr.* 356: 326–330.
- Kamruzzaman, M.; Alam, A-M.; Lee, S.H. y Dang, T.D. (2013) *Chemiluminescence microfluidic system on a chip to determine vitamin B₁ using platinum nanoparticles triggered luminol-AgNO₃ reaction*. *Sensor Actuat. B- Chem.* 185: 301-308.
- Karaseva, N.A. y Ermolaeva, T.N. (2012) *A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food*. *Talanta* 93: 44–48.
- Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanaviciene, A.; Kirlyte, J. y Ramanavicius, A. (2010) *Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor*. *Anal. Chem.* 82:6401–6408.
- Kellner, C.; Botero, M.L.; Latta, D.; Drese, K.; Fragoso, A. y O'Sullivan, C.K. (2011) *Automated microsystem for electrochemical detection of cancer markers*. *Electrophoresis* 32: 926-930
- Kergaravat, S.V.; Beltramino, L.; Garnero, N.; Trotta, L.; Wagener, M.; Pividori, M.I.; Hernandez, S.R. (2013a) *Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease*. *Biosens. Bioelectron.* 48: 203–209.
- Kergaravat, S.V.; Beltramino, L.; Garnero, N.; Trotta, L.; Wagener, M.; Fabiano, S.N.; Pividori, M.I.; Hernandez, S.R. (2013b) *Magneto immunofluorescence assay for diagnosis of celiac disease*. *Anal. Chim. Acta* 798: 89-96.
- Kergaravat, S.V.; Gómez, G.A.; Fabiano, S.N.; Laube Chávez, T.I.; Pividori, M.I.; Hernández, S.R. (2012b) *Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor*. *Talanta* 97: 484–490.
- Kergaravat, S.V.; Pividori, M.I. y Hernandez, S.R. (2012a) *Evaluation of seven cosubstrates in the quantification of horseradish peroxidase enzyme by square wave voltammetry*. *Talanta* 88: 468–476.
- Khan, K.S. y Chien, P.F.W. (2001) *Evaluation of a clinical test. I: Assessment of reliability*. *Br. J. Obst. Gynaecol.*, 108: 562-567.
- Khor, S.; Liu, G.; Fairman, C.; Iyengar, S. y Gooding, J. (2011) *The importance of interfacial design for the sensitivity of a label-free electrochemical immuno-biosensor for small organic molecules*. *Biosens. Bioelectron.* 26: 2038–2044.
- Kizek, R.; Masarik, M.; Kramer, K.J.; Potesil, D.; Bailey, M.; Howard, J.A.; Klejdus, B.; Mikelova, R.; Adam, V.; Trnkova, L. y Jelen, F. (2005) *An analysis of avidin, biotin and their interaction at attomole levels by voltammetric and chromatographic techniques*. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 1167–1178.

BIBLIOGRAFIA

- Kochmann, S.; Hirsch, T. y Wolfbeis, O.S. (2012) *Graphenes in chemical sensors and biosensors*. *Trac-Trend Anal. Chem.* 39: 87-113.
- Korkut, S.; Keskinler, B. y Erhan, E. (2008) *An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives*. *Talanta* 76: 1147-1152.
- Kosugi, A.; Koizumi, Y.; Yanagida, F. y Udaka, S. (2000) *A permease exhibiting a dual role for lysine and biotin uptake in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 90-93.
- Kumar, A.; Meena, M.; Begum, N.; Kumar, N.; Kumar Gupta, R.; Aggarwal, S.; Prasad, S. y Batra, S. (2011) *Latent celiac disease in reproductive performance of women*. *Fertil. Steril.* 95: 922-927.
- Lahely, S.; Ndaw, S.; Arella, F. y Hasselmann, C. (1999) *Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection*. *FoodChem.* 65: 253-258.
- Lai, C.; Zeng, G-M.; Huang, D-L.; Feng, C-L., Hu, S.; Su, F-F.; Zhao, M-H.; Huang, C. y Wei, Z. (2010) *Detection Based on Immunogold Labeling Technique and Its Expected Application in Composting*. *Chinese J. Anal. Chem.* 38: 909-914.
- Lai, L.; Wang, D.; Chang, C. y Wang, C. (2006) *Catalytic Characteristics of Peroxidase from Wheat Grass*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8611-8616.
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Three edition, Springer, Baltimore, E.E.U.U.
- Laube, T.; Kergaravat, S.; Fabiano, S.; Hernandez, S.; Alegret, S. y Pividori, M. (2011) *Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff: Towards food safety for celiac patients*. *Biosens. Bioelectron.* 27: 46-52.
- Leon, F.; Camarero, C.; R-Pena, R.; Eiras, P.; Sanchez, L.; Baragaño, M.; Lombardia, M.; Bootello, A. y Roy, G. (2001) *Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in celiac disease diagnosis*. *Scand. J. Gastroenterol.* 36: 849-853.
- Lermo, A.; Fabiano, S.; Hernández, S.; Galve, R.; Marco, M.P.; Alegret, S. y Pividori, M.I. (2009) *Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors*. *Biosens. Bioelectron.* 24: 2057-2063.
- Li, Q.; Tang, D.; Su, T.; Huang, J. y Chen G. (2011) *Carbon nanotube-based symbiotic coaxial nanocables with nanosilica and nanogold particles as labels for electrochemical immunoassay of carcinoembryonic antigen in biological fluids*. *Talanta* 84: 538-546.
- Li, Y.; Cheng, P.; Gong, J.; Fang, L.; Deng, J.; Liang, W. y Zheng, J. (2012) *Amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli O157:H7 in food specimens*. *Anal. Biochem.* 421: 227-233.

BIBLIOGRAFIA

Ling, M.; Marfo, K.; Masiakos, P.; Aljanabi, A.; Lindower, J.; Glicklich, D.; de Boccardo, G.; Greenstein, S.; Chapochnik-Friedmann, J.; Kayler, L.; Kinkhabwala, M.; Akalin, E. (2012) *Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients*. Hum. Immunol. 73: 879-883.

Liu, J-m.; Lin, L-p.; Jiang, S-L.; Cui, M.L.; Jiao, L.; Zhang, X.Y.; Zhang, L-h.; Zheng, Z.Y.; Lin, X. y Lin, S-q. (2013) *Fullerol-fluorescein isothiocyanate-concanavalin agglutinin phosphorescent sensor for the detection of alpha-fetoprotein and forecast of human diseases*. Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros. 115: 136-144.

Liu, K.; Zhang, J.J.; Wang, C. y Zhu, J.J. (2011) *Graphene-assisted dual amplification strategy for the fabrication of sensitive amperometric immunosensor*. Biosens. Bioelectron. 26: 3627-3632.

Livaniou, E.; Costopoulou, D.; Vassiliadou, I.; Leondiadis, L.; Nyalala, J.O.; Ithakissios, D.S. y Evangelatos, G.P. (2000) *Analytical techniques for determining biotin*. J. Chromatogr. A 88: 1331-343.

Loeffler, G.F. y Ebey, G.C. (1989) *Pharmaceutical Tablet Compression Tooling* (Eds.: Lieberman, H.A.; Lachman, L.; Schwartz, J.B.), Marcel Dekker, New York, E.E.U.U. p. 571-609.

LSRO (LifeSciencesResearchOffice) (1998) Report: Assessment of Nutrient Requirements for Infant formulas. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, Washington, E.E.U.U.

Lu, B.; Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R. y O'Kennedy, R. (1997) *Development of an "electrically wired" amperometric immunosensor for the determination of biotin based on a non-diffusional redox osmium polymer film containing an antibody to the enzyme label horseradish peroxidase*. Anal. Chim. Acta 345: 59-66.

Lu, H.; Conneely, G.; Pravda, M. y Guilbault, G.G. (2006) *Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable electrochemical immunosensors*. Steroids 71: 760-767.

Lum, J.; Wang, R.; Lassiter, K.; Srinivasan, B.; Abi-Ghanem, D.; Berghman, L.; Hargis, B.; Tung, S.; Lu, H. y Li, Y. (2012) *Rapid detection of avian influenza H5N1 virus using impedance measurement of immuno-reaction coupled with RBC amplification*. Biosens. Bioelectron. 38: 67-73.

Luppa, P.B.; Sokoll, L.J. y Chan, D.W. (2001) *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clin. Chim. Acta 314: 1-26.

MacLean, W.; Van Dael, P.; Clemens, R.; Davies, J.; Underwood, E.; O' Risky, L.; Rooney, D. y Schrijver, J. (2010) *Upper levels of nutrients in infant formulas: comparison of analytical data with the revised Codex infant formula standard*. J. Food Compos. Anal. 23: 44-53.

Mahony, J.O.; Nolan, K.; Smyth, M.R.; Mizaikoff, B. *Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry*. (2005) Anal. Chim. Acta 534: 31-39.

BIBLIOGRAFIA

Mäki, M.; Mustalahti, K.; Kokkonen, J.; Kulmala, P.; Haapalahti, M.; Karttunen, T.; Ilonen, J.; Laurila, K.; Dahlbom, I.; Hansson, T.; Höpfl, P. y Knip, M. (2003) *Prevalence of celiac disease among children in Finland*. N. Engl. J. Med. 348: 2517-2524.

Mandal, A. y Mayberry, J. (2000) *How common is celiac disease in South America?* Am. J. Gastroenterol. 95: 579-580.

Mankaï, A.; Sakly, W.; Landolsi, H.; Gueddah, L.; Sriha, B.; Ayadi, A.; Sfar, M.T.; Skandrani, K.; Harbi, A.; Essoussi, A.S.; Korbi, S.; Fabien, N.; Jeddi, M. y Ghedira., I. (2005) *Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease, comparison of an enzyme linked immunosorbent assay and a dot blot assay*. Pathol. Biol. 53: 204-209.

Maple, L.; Lathrop, R.; Bozich, S.; Harman, W.; Tacey, R.; Kelley, M. y Danilkovitch-Miagkova, A. (2004) *Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum*. J. Immunol. Methods 295: 169-182.

Marko-Varga, G.; Emeus, J.; Gorton, L. y Ruzgas, T. (1995) *Development of Enzyme-Based Amperometric Sensors for the Determination of Phenolic Compounds*. Trends Anal. Chem. 14: 319-328.

Martin, H.; Murray, C.; Christeller, J. y McGhie, T. (2008) *A fluorescence polarization assay to quantify biotin and biotin-binding proteins in whole plant extracts using Alexa-Fluor 594 biocytin*. Anal. Biochem. 381: 107-112.

Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.; De Jong, S.; Lewis, P. y Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J. y Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Data Handling in Science and Technology 20 A. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier Science, Amsterdam, Países Bajos, p. 475-518.

McFall, R.M. y Treat, T.A. (1999) *Quantifying the information value of clinical assessments with signal detection theory*. Ann. Rev. Psychol. 50: 215-241.

Mekler, V.M. y Bystryak, S.M. (1992) *Application of o-phenyldiamine as a fluorogenic substrate in peroxidase-mediated enzyme-linked immunosorbent assay*. Anal. Chim. Acta, 264: 359-363.

Mello, L.D. y Kubota, L.T. (2002) *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. Food Chem. 77: 237-256.

Mendes, R.K.; Laschi, S.; Stach-Machado, D.R.; Kubota, L.T. y Marrazza, G. (2012) *A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust*. Sens. Actuat. B-Chem. 166-167: 135-140.

Mendonça, M.; Conrad, N.L.; Conceição, F.R.; Moreira, Â.N.; da Silva, W.P.; Aleixo, J.A.G. y Bhunia, A.K.. (2012) *Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of Listeria monocytogenes and L. ivanovii*. BMC Microbiology 12: 275-290.

BIBLIOGRAFIA

- Michnick, S.W. y Sidhu, S.S. (2008) *Submitting antibodies to binding arbitration*. Nat. Chem. Biol. 4: 326 – 329.
- Mikkelsen, S.R. y Cortón, E. (2004) *Bianalytical Chemistry*. John Wiley & Sons, INC., Hoboken, E.E.U.U.
- Miller, J.C. y Miller, J.N. (1993) *Estadística para Química Analítica*, segunda edición, Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware.
- Mishra, S.; Storer, M.K.; Sherwin, C.M.T. y Lewis, J.G. (2005) *A simple binding assay for the direct determination of biotin in urine*. Clin. Chim. Acta 360: 60–66.
- Mock, D. y Mock, N. (1997) *Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic biotin supplementation*. J. Lab. Clin. Med. 129: 384–388.
- Mock, D.M.; Mock, N.I y Stratton, S.L (1997) *Concentrations of biotin metabolites in human milk*. J. Pediatr. 131: 456–458.
- Mora, M.; Litwin, N.; Toca, M.M.; Azcona, M.I.; Solís Neffa, R.; Ortiz, G.; Wagener, M.; Olivera, J.; Rezzónico, G.; Marchisone, S.; Oropeza, G.; Bastianelli, C.; Solaegui, M.; González, A.; Battiston, F. (2010) *Prevalencia de enfermedad celíaca: Estudio multicéntrico en población pediátrica en cinco distritos urbanos de Argentina*. Rev. Argent. Salud Pública 1: 26-31.
- Moreno-Guzman, M.; Gonzalez-Cortes, A.; Yanez-Sedeno, P. y Pingarron, J.M. (2011) *A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles*. Anal. Chim. Acta 692: 125-130.
- Motulsky, H. y Christopoulos, A. (2004) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*. Oxford University Press, New York, E.E.U.U.
- Mulder, C. y Cellier, C. (2005) *Coeliac disease*. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 19: 313–321.
- Munoz, E.M.; Lorenzo-Abalde, S.; González-Fernández, A.; Quintela, O.; Lopez-Rivadulla, M. y Riguera, R. (2011) *Direct surface plasmon resonance immunosensor for in situ detection of benzoylecgonine, the major cocaine metabolite*. Biosens. Bioelectron. 26: 4423–4428.
- Munteanu, F.D.; Ciucu, A.; Lindgren, A.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csoregi, E.; van Huystee, R.B.; Gazaryan, I.G. y Lagrimini, L.M. (1998) *Bioelectrochemical Monitoring of Phenols and Aromatic Amines in Flow Injection Using Novel Plant Peroxidases*. Anal. Chem. 70: 2596–2600.
- Myers, R.H. y Montgomery, D.C. (1995) *Response Surface Methodology*. JohnWiley & Sons Inc., New York, E.E.U.U.
- Nakanishi, K.; Muguruma, H. y Karube, I. (1996) *A novel method of immobilizing antibodies on a quartz crystal microbalance using plasma-polymerized films for immuno-sensors*. Anal. Chem. 68: 1695–1700.
- Natrajan, A.; Sharpe, D.; Costello, J. y Jiang, Q. (2010) *Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output*. Anal. Biochem. 406: 204-213.

BIBLIOGRAFIA

- Neagu, D.; Perrino, S.; Micheli, L.; Palleschi, G. y Moscone, D. (2009) *Aflatoxin M₁ determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate*. *Int. Dairy J.* 19: 753-758.
- Nelson, B.; Sharpless, K. y Sander, L. (2006) *Improved Liquid Chromatography Methods for the Separation and Quantification of Biotin in NIST Standard Reference Material 3280: Multivitamin/Multielement Tablets*. *J. Agric. FoodChem.* 54: 8710-8716.
- Neves, M.M.P.S.; González-García, M.B.; Delerue-Matos, C. y Costa-García, A. (2012a) *Multiplexed electrochemical immunosensor for detection of celiac disease serological markers*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 187: 33- 39.
- Neves, M.M.P.S.; González-García, M.B.; Nouws, H.P.A. y Costa-García, A. (2012b) *Celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on nanohybrid screen-printed carbon electrodes*. *Biosens. Bioelectron.* 31: 95- 100.
- Neves, M.M.P.S.; González-García, M.B.; Santos-Silva, A. y Costa-García, A. (2012c) *Voltammetric immunosensor for the diagnosis of celiac disease based on the quantification of anti-gliadin antibodies*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 163: 253- 259.
- Niveloni, S.; Sugai, E.; Cabanne, A.; Vazquez, H.; Argonz, J.; Smecuol, E.; Moreno, M.L.; Nachman, F.; Mazure, R.; Kogan, Z.; Gomez, J.C.; Mauriño, E. y Bai, J.C. (2007) *Antibodies against Synthetic Deamidated Gliadin Peptides as Predictors of Celiac Disease: Prospective Assessment in an Adult Population with a High Pretest Probability of Disease*. *Clin. Chem.* 53: 12 2186-2192.
- Oh, B-Y.; Lee, W.; Chun, B.S.; Bae, Y.M.; Lee, W.H. y Choi, J-W. (2005) *Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Yersinia enterocolitica*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 257-258: 369-374.
- Olivieri, A. y Goicoechea, H. (2007) *La calibracion en Quimica Analitica*, Ediciones UNL, Santa Fe.
- Ortiz, M.; Fragoso, A. y O'Sullivan, C.K. (2011) *Detection of antigliadin autoantibodies in celiac patient samples using a cyclodextrin-based supramolecular biosensor*. *Anal. Chem.* 83: 2931-2938
- Park, M.; Cella, Chen, L.N.W.; Myung, N.V. y Mulchandani, A. (2010) *Carbon nanotubes-based chemiresistive immunosensor for small molecules: Detection of nitroaromatic explosives*. *Biosens. Bioelectron.* 26: 1297-1301.
- Pereira, S.V.; Raba, J. y Messina, G.A. (2010) *IgG anti-gliadin determination with an immunological microfluidic system applied to the automated diagnostic of the celiac disease*. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2921-2927.
- Perrotta, P.R.; Arévalo, F.J.; Vettorazzi, N.R.; Zón, M.A. y Fernández, H. (2012) *Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 162: 327-333.

BIBLIOGRAFIA

- Petrovic, S. (2000) *Cyclic Voltammetry of Hexachloroiridate (IV): An Alternative to the Electrochemical Study of the Ferricyanide Ion*. Chem. Educator. 5, 231-235.
- Pividori, M.I. y Alegret, S. (2005) *Electrochemical genosensing based on rigid carbon composites*. Anal. Lett. 38: 2541-2565.
- Pividori, M.I.; Lermo, A.; Bonanni, A.; Alegret, S. y del Valle, M. (2009) *Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease*. Anal. Biochem. 388: 229-234.
- Pividori, M.I.; Lermo, A.; Campoy, S.; Barbe, J. y Alegret, S. (2007) *Rapid electrochemical verification of PCR amplification of Salmonella spp. based on m-GEC electrodes*. Comprehensive Anal. Chem. 49: 221-226.
- Pulido, A.; Ruisánchez, I.; Boque., R. y Xavier Rius, F. (2002) *Estimating the uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits*. Anal. Chim. Acta 455: 267-275.
- Ramanathan, K. y Danielsson, B. (2001) *Principles and applications of thermal biosensors*. Biosens. Bioelectron. 16: 417-423.
- Rehner, G. y Stein, J. (1997) *High-performance liquid chromatographic determination of biotin in biological materials after crown ether-catalyzed fluorescence derivatization with panacyl bromide*. Methods Enzymol. 279: 286-295.
- Reviejo, A.J. y Pingarron, J.M. (2000) *Biosensores electroquímicos. Una Herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico*. An. R. Soc. Esp. Quim. 96: 5-15.
- Ricci, F.; Adornetto, G. y Palleschi, G. (2012) *A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors*. Electrochim. Acta 84: 74- 83.
- Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L. y Palleschi, G. (2007) *A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis*. Anal. Chim. Acta 605: 111-129.
- Richardson, M.D.; Turner, A.; Warnock, D.W. y Llewellyn, P.A. (1983) *Computer-assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis*. J. Immunol. Methods 56: 201-207.
- Riestra, S.; Fernández, E. y Rodrigo, L. (2000) *Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. Strategies of serologic screening*. Scand. J. Gastroenterol. 35: 398-402.
- Rolls, B.A. (1982) *Effect of processing on nutrients content of food: milk and milk products*. En: *Handbook of Nutritive Value of Processed Food* (Ed.: Rechcigl, M.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U., pp. 383-399.
- Romanazzo, D.; Ricci, F. Volpe, G.; Elliott, C.T.; Vesco, S.; Kroeger, K.; Moscone, D.; Stroka, J., VanEgmond, H., Vehniainen, M., Palleschi, G. (2010) *Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples*. Biosens. Bioelectron. 25: 2615-2621.

BIBLIOGRAFIA

- Rosales-Rivera, L.C.; Acero-Sánchez, J.L.; Lozano-Sánchez, P.; Katakis, I. y O'Sullivan, C.K. (2011) *Electrochemical immunosensor detection of antigliadin antibodies from real human serum*. Biosens. Bioelectron. 26: 4471-4476.
- Sabatino, A.D. y Corazza, G.R. (2009) *Coeliac disease*. Lancet 373: 1480-1493.
- Sahoo, B.; Kumar Sahu, S. y Pramanik, P. (2011) *A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 69: 95-102.
- Sakly, W.; Mankai, A.; Ghdes, A.; Achour, A.; Thabet, Y. y Ghedira, I. (2012) *Performance of anti-deamidated gliadin peptides antibodies in celiac disease diagnosis*. Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 36: 598-603.
- Sakuragawa, A.; Taniai, T. y Okutani, T. (1998) *Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads*. Anal. Chim. Acta 374: 191-200.
- Saleh, S.I.; Aboutaleb, A.; Kassem, A.A. y Stamm, A. (1984) *Evaluation of some water soluble lubricants for direct compression*. Labo-Pharma, Probl. Tech. 32: 588-591.
- Salvatore, S.; Hauser, B.; Devreker, T.; Arrigo, S. y Vandenplas, Y. (2008) *Chronic enteropathy and feeding in children: an update*. Nutrition 24: 1205-1216.
- Santandreu, M.; Cespedes, F.; Alegret, S. y Martinez-Fabregas, E. (1997) *Amperometric immunosensor based on rigid conducting immunocomposites*. Anal. Chem. 69: 2080-2085.
- Sardy, M.; Csikos, M.; Geisen, C.; Preisz, K.; Kornsee, Z.; Tomsits, E.; Tox, U.; Hunzelmann, N.; Wieslander, J.; Karpati, S.; Paulsson, M. y Smyth, N. (2007) *Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease*. Clin. Chim. Acta 376: 126-135.
- Schisterman, E.F.; Perkins, N.J.; Liu, A. y Bondell, H. (2005) *Optimal Cut-point and Its Corresponding Youden Index to Discriminate Individuals Using Pooled Blood Samples*. Epidemiology 16: 73-81.
- Schuppan, D.; Junker, Y. y Barisani, D. (2009) *Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies*. Gastroenterology 137: 1912-1933.
- Schwartz, E.; Kahlenberg, F.; Sack, U.; Richter, T.; Stern, M.; Conrad, K.; Zimmer, K-P. y Mothes, T. (2004) *Serologic Assay Based on Gliadin-Related Nonapeptides as a Highly Sensitive and Specific Diagnostic Aid in Celiac Disease*. Clin. Chem. 50: 2370-2375.
- Sendall, F.E.J.; Staniforth, J.N.; Rees, J.E. y Leatham, M.J. (1983) *Effervescent tablets*. Pharm. J. 230: 289-294.
- Serafin, V.; Eguilaz, M.; Agui, L.; Yanez-Sedeno, P. y Pingarron, J.M. (2011) *An Electrochemical Immunosensor for Testosterone Using Gold Nanoparticles - Carbon Nanotubes Composite Electrodes*. Electroanalysis 23: 169-176.

BIBLIOGRAFIA

- Sharma, P.; Sablok, K.; Bhalla, V. y Suri, C.R. (2011) *A novel disposable electrochemical immunosensor for phenyl urea herbicide diuron*. *Biosens. Bioelectron.* 26: 4209–4212.
- Shivakumar, A.; Nagaraja, P.; Chamaraja, N.A.; Krishna, H. y Avinash, K. (2011) *Determination of catalase activity using chromogenic probe involving iso-nicotinic acid hydrazide and pyrocatechol*. *J. Biotechnol.* 155: 406–411.
- Shivakumar, A.; Rangappa, D.; Krishna, H. y Nagaraja, P. (2010) *Development and kinetic validation of an assay for the quantitative determination of peroxidase: Application in the detection of activity in crude plant tissues*. *Enzyme Microb. Technol.* 47: 243–248.
- Shpacovitch, V. (2012) *Application of Surface Plasmon Resonance (SPR) for the Detection of Single Viruses and Single Biological Nano-objects*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 3: 1-3.
- Siegel M. y Khosla C. (2007) *Transglutaminase 2 Inhibitors and their Therapeutic Role in Disease States*. *Pharmacol. Ther.* 115: 232–245.
- Siegel, S. y Castellan, N.J. (1988) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, second edition, McGraw Hill, New York, E.E.U.U.
- Skerra, A. (2008) *Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities*. *The FEBS Journal* 275: 2677–2683.
- Skládal, P. (2003) *Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions*. *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 491-502.
- Solna, R.; Dock, E.; Christenson, A.; Winther-Nielsen, M.; Carlsson, C.; Emneus, J.; Ruzgas, T. y Skladal, P. (2005) *Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases*. *Anal. Chim. Acta* 528: 9–19.
- Song, R.; Schlecht, P.C. y Ashley, K. (2001) *Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics*. *J. Hazard. Mater.* 83: 29-39.
- Staggs, C.G.; Sealey, W.M.; McCabe, B.J.; Teague, A.M. y Mock, D.M. (2004) *Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding*. *J. Food Compos. Anal.* 17: 767–776.
- Starcher, B. (2001) *A Ninhydrin-based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples*. *Anal. Biochem.* 292, 125–129.
- Stein, J.; Hahn, A.; Lembeke, B. y Rehner, G. (1992) *High-performance liquid chromatographic determination of biotin in biological materials after crown ether-catalyzed fluorescence derivatization with panacyl bromide*. *Anal. Biochem.* 200: 89–94.
- Stenberg, P.; Roth, E.B. y Sjöberg, K. (2008) *Transglutaminase and the pathogenesis of coeliac disease*. *Eur. J. Intern. Med.* 19: 83–91.
- Stratton, R.J. y Smith, T.R. (2006) *Role of enteral and parenteral nutrition in the patient with gastrointestinal and liver disease*. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20: 441–466.

BIBLIOGRAFIA

- Stuetz, R.M. (2003) *Application of electronic nose technology for monitoring water and wastewater*, (Ed.: S. Alegret), Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier B.V, Amsterdam, p. 513-539.
- Sugai, E.; Vázquez, H.; Nachman, F.; Moreno, M.L.; Mazure, R.; Smecuol, E.; Niveloni, S.; Cabanne, A.; Kogan, Z.; Gómez, J.C.; Mauriño, E. y Bai, J.C. (2006) *Accuracy of testing for Antibodies to Synthetic Gliadin-Related Peptides in Celiac Disease*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 4: 1112-1117.
- Sugai, E.; Selvaggio, G.; Vazquez, H.; Viola, M.; Mazure, R.; Pizarro, B.; Smecuol, E.; Flores, D.; Pedreira, S.; Mauriño, E.; Gomez, J.C. y Bai, J.C. (2000) *Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease: assessment of a commercial kitELISA for Anti-tTG Antibodies in Celiacs*. Am. J. Gastroenterol. 95: 2318-2322.
- Sugawara, K., Tanaka, S., Nakamura, H. (1995) *Electrochemical assay of avidin and biotin using a biotin derivative labeled with an electroactive compound*. Anal. Chem. 67: 299-302.
- Sugawara, K.; Yamauchia, Y.; Hoshi, S.; Akatsuka, K.; Yamamoto, F.; Tanaka, S. y Nakamura, H. (1996) *Accumulation voltammetry of avidin and biotin using a biotin labeled with Nile Blue A*. Bioelectrochem. Bioenerg. 41: 167-172.
- Sun, W.; Jiao, K.; Zhang, S.; Zhang, C. y Zhang, Z. (2001) *Electrochemical detection for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay using p-aminophenol as substrate and its application in detection of plant virus*. Anal. Chim. Acta 434: 43-50.
- Sun, X.; Zhu, Y. y Wang, X. (2012) *Amperometric immunosensor based on deposited gold nanocrystals/4, 4'-thiobisbenzenethiol for determination of carbofuran*. Food Control 28: 184-191.
- Tanaka, S.; Yamamoto, F.; Sugarwara, K. y Nakamura, H. (1997) *Biotin ligands labeled with daunomycin as an electrochemical probe for avidin and biotin*. Talanta 44: 357-363.
- Tanaka, S.; Yoshida, K.; Kuramitz, H.; Sugawara, K. y Nakamura, H. (1999) *Electrochemical detection of biotin using an interaction between avidin and biotin labeled with ferrocene at Perfluorosulfonated ionomer modified electrode*. Anal. Sci. 15: 863-866.
- Tang, D.; Tang, J.; Su, B. y Chen, G. (2010) *Ultrasensitive Electrochemical Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxin B in Food Using Enzyme-Nanosilica-Doped Carbon Nanotubes for Signal Amplification*. J. Agr. Food Chem. 58: 10824-10830.
- Teesalu, K.; Agardh, D.; Panarina, M.; Utt, M.; Uibo, O.; Uibo, R. (2009) *A modified ELISA for improved detection of IgA, IgG, and IgM anti-tissue transglutaminase antibodies in celiac disease*. Clin. Chim. Acta 403: 37-41.
- Teng, Y.; Zhang, X.; Fu, Y.; Liu, H.; Wang, Z.; Jin, L. y Zhang, W. (2011) *Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of Escherichia coli*. Biosens. Bioelectron. 26: 4661-4666.

BIBLIOGRAFIA

- Thompson, L.; Schmitz, D. y Pan, S. (2006) *Determination of Biotin by High-Performance Liquid Chromatography in Infant Formula, Medical Nutritional Products, and Vitamin Premixes*. J. AOAC Int. 89: 1515–1558.
- Tonutti, E.; Visentini, D.; Bizzaro, N.; Caradonna, M.; Cerni, L.; Villalta, D.; Tozzoli, R. (2003) *The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French–Italian multicentre study*. J. Clin. Pathol. 56: 389–393.
- Torres, E.; Bustos-Jaimes, I. y Le Borgne, S. (2003) *Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants*. Appl. Catal. B: Environ. 46: 1–15.
- Tran, H.V.; Yougnia, R.; Reisberg, S.; Piro, B.; Serradji, N.; Nguyen, T.D.; Tran, L.D.; Dong, C.Z. y Phama, M.C. (2012) *A label-free electrochemical immunosensor for direct, signal-on and sensitive pesticide detection*. Biosens. Bioelectron. 31: 62–68.
- Trullols, E.; Ruisánchez, I.; Rius, F.X. (2004) *Validation of qualitative analytical methods*. Trends Anal. Chem. 23: 137–145.
- Truong, L.T.N.; Chikae, M.; Ukita, Y. y Takamura, Y. (2011) *Labelless impedance immunosensor based on polypyrrole–pyrolicarboxylic acid copolymer for hCG detection*. Talanta 85: 2576–2580.
- Tuerk, C. y Gold, L. (1990) *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science 249: 505–510.
- Ullman, A. (1996) *Formation and Structure of Self-Asssembled Monolayers*. 96: 1533–1554.
- USP (2007), 30th ed., United States Pharmacopeia Convention, Rockville, E.E.U.U.
- Vallina-García, R., del Mar García-Suárez, R.M.; Fernández-Abedul, M.T.; Méndez, F.J. y Costa-García, A. (2007) *Oriented immobilisation of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors*. Biosens. Bioelectron. 23: 210–217.
- Varcálcser Cases, M. (2000) *Principles of Analytical Chemistry. A textbook*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania.
- Veitch, N. (2004) *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry 65: 249–259.
- Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam.
- Vermeersch, P.; Geboes, K.; Mariën, G.; Hoffman, I.; Hiele, M. y Bossuyt, X. (2010) *Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease*. Clin. Chim. Acta 411: 931–935.
- Vermeersch, P.; Richter, T.; Hauer, A.C.; Stern, M.; Uhlig, H.H.; Zimmer, K-P.; Laass, M.W.; Hoffman, I.; Hiele, M.; Mothes, T. y Bossuyt, X. (2011) *Use of likelihood ratios improves clinical interpretation of IgG and IgA anti-DGP antibody testing for celiac disease in adults and children*. Clin. Biochem. 44: 248–250.

BIBLIOGRAFIA

Vetrano, S.; Zampaletta, U.; Anania, M.C.; Di Tola, M.; Sabbatella, L.; Passarelli, F.; Maffia, C.; Sanjust, M.G.; Lettieri, F.; De Pita, O. y Picarelli, A. (2007) *Detection of anti-endomysial and anti-tissue transglutaminase autoantibodies in media following culture of oral biopsies from patients with untreated coeliac disease*. Dig. Liv. Dis. 39: 911-916.

Volta, U.; Granito, A.; Fiorini, E.; Parisi, C.; Piscaglia, M.; Pappas, G.; Muratori, P. y Bianchi, F.B. (2008) *Usefulness of Antibodies to Deamidated Gliadin Peptides in Celiac Disease Diagnosis and Follow-up*. Dig. Dis. Sci. 53: 1582-1588.

Vreeke, M.; Rocca, P. y Heller, A. (1995) *Direct electrical detection of dissolved biotinylated horseradish peroxidase, biotin and avidin*. Anal. Chem. 67: 303-306.

Wang, H.; Wang, J.; Timchalk, C. y Lin, Y. (2008) *Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma*. Anal. Chem. 80: 8477-8484.

Wang, H.; Zhang, Y.; Yu, H.; Wu, D.; Ma, H.; Li, H.; Du, B. y Wei, Q. (2013) *Label-free electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen based on silver hybridized mesoporous silica nanoparticles*. Anal. Biochem. 434: 123-127.

Wang, J. (2001) *Analytical Electrochemistry*, second edition, Wiley-VCH, New York, E.E.U.U.

Wang, L.; Zhang, L-J.; Lv, W.; Han, S-H.; Zhang, F-K. y Pan, J-R. (2011) *Determination of Organophosphorus Pesticides Based on Biotin-Avidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Chinese J. Anal. Chem. 39: 346-350.

Wang, Y.; Wei, D.; Yang, H.; Yang, Y.; Xing, W.; Li, Y. y Deng, A. (2009) *Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples*. Talanta 77: 1783-1789.

Wenz, G. (1994) *Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 803-822.

Wong, R.C.W.; Wilson, R.J.; Steele, R.H.; Radford-Smith, G. y Adelstein, S. (2002) *A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits*. J. Clin. Pathol. 55: 488-494.

Wouters, D.; van Schouwenburg, P.; van der Horst, A.; de Boer, M.; Schooneman, D.; Kuijpers, T.; Aarden, L.A. y Hamann, D. (2009) *High-throughput analysis of the C₄ polymorphism by a combination of MLPA and isotype-specific ELISA's*. Mol. Immunol. 46: 592-600.

Wright, J. y Rawson, K. (1995) *Specific binding assay for biotin based on enzyme channelling with direct electron transfer electrochemical detection using horseradish peroxidase*. Biosens. Bioelectron. 10: 495-500.

Wu, H.; Li, H.; Chua, F.Z.H. Li, S.F.Y. (2013) *Rapid detection of melamine based on immunoassay using portable surface plasmon resonance biosensor*. Sens. Actuat. B-Chem. 178: 541-546.

BIBLIOGRAFIA

- Xu, T.; Miao, J.; Wang, Z.; Yu, L. y Li, C.M. (2011) *Micro-piezoelectric immunoassay chip for simultaneous detection of Hepatitis B virus and α -fetoprotein*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 151: 370–376.
- Xue, C.; Zhaob, H.; Liu, H.; Chen, Y.; Wang, B.; Zhang, Q.; Wu, X. (2011) *Development of sulfhydrylated antibody functionalized microcantilever immunosensor for taxol*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 156: 863– 866.
- Yagiuda, K.; Hemmi, A.; Ito, S.; Asano, Y.; Fushinuki, Y.; Chen, C.Y. y Karube, I. (1996) *Development of a conductivity-based immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine*. *Biosens. Bioelectron.* 11: 703–707.
- Yan, J.; Horák, D.; Lenfeld, J.; Hammond, M.; Kamali-Moghaddam, M. (2013) *A tosyl-activated magnetic bead cellulose as solid support for sensitive protein detection*. *J. Biotechnol.* 167: 235-240.
- Yang, H.; Yuan, R.; Chai, Y.; Mao, L.; Su, H.; Jiang, W. y Liang, M. (2011) *Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification*. *Biochem. Eng. J.* 56: 116–124.
- Yang, M.; Guan, Y.; Yang, Y.; Xia, T.; Xiong, W.; Wang, N. y Guo, C. (2013) *Peroxidase-like activity of amino-functionalized magnetic nanoparticles and their applications in immunoassay*. *J. Colloid Interface Sci.* 405: 291-295.
- Yang, T.; Jung, S.; Mao, H. y Cremer, P.S. (2001) *Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays*. *Anal. Chem.* 73: 165–169.
- Yang, T.; Wang, S.; Jin H.; Bao, W.; Huang, S. y Wang, J. (2013) *An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 178: 310–315.
- Yin, Z.; Liu, Y.; Jiang, L-P. y Zhu, J-J. (2011) *Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres*. *Biosens. Bioelectron.* 26: 1890-1894.
- Ying, Z.; Jiang, Y.; Du, X.; Xie, G.; Yu, J. y Wang, H. (2007) *PVDF coated quartz crystal microbalance sensor for DMMP vapor detection*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 125: 167–172.
- Yoo, G.; Bong, J-H.; Park, M.; Kang, M-J.; Jose, J.; Pyun, J-C. (2013) *Magnetic-bead-based immunoassay using E. coli cells with autodisplayed Z-domains*. *Enzyme Microb. Technol.* 53: 118-122.
- Yoshida, T.; Uetake, A.; Nakai, C.; Nimura, N. y Kinoshita, T. (1986) *Liquid chromatographic determination of biotin by using 1-pyrenyldiazomethane as a pre-column fluorescent labelling reagent*. *J. Chromatogr.* 456: 421–426.
- Yu, D.; Blankert, B.; Bodoki, E.; Bollo, S.; Viré, J.C.; Sandulescu, R.; Nomura, A. y Kauffmann, J.M. (2006) *Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase-immobilised magnetic microparticles*. *Sens. Actuat. B-Chem.* 113: 749–754.

BIBLIOGRAFIA

-
- Zacco, E.; Adrian, J.; Galve, R.; Marco, M.P.; Alegret, S. y Pividori, M.I. (2007). *Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk*. Biosens. Bioelectron. 22: 2184–2191.
- Zacco, E.; Pividori, M.I. y Alegret, S. (2006) *Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms*. Biosens. Bioelectron. 21: 1291–1301.
- Zacco, E.; Pividori, M.I. y Alegret, S. (2006). *Electrochemical magneto immunosensing strategy for the detection of pesticides residues*. Anal. Chem. 78: 1780–1788.
- Zani, A.; Laschi, S.; Mascini, M. y Marrazza, G. (2011) *A New Electrochemical Multiplexed Assay for PSA Cancer Marker Detection*. Electroanalysis 23: 91-99.
- Zapata, J.M.; Sabater, B. y Martin, M. (1998) *Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone*. Phytochemistry 48: 1119–1123.
- Zempleni, J. y Mock, D. (1999) *Biotin biochemistry and human requirements*. J. Nutr. Biochem. 10: 128–138.
- Zempleni, J. y Mock, D. (2000) *Biotin*. En: *In Modern Analytical Methodologies on Fat and Water-Soluble Vitamins* (Eds.: Song, W. y Beecher, G.) Wiley, New York, E.E.U.U., pp. 389–440.
- Zhang, Y. y Zheng, J.B (2007) *Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode*. Electrochim. Acta 52: 7210–7216.
- Zhao, B.Y.; Wei, Q.; Xu, C.; Li, H.; Wu, D.; Cai, Y.; Mao, K.; Cui, Z. y Du, B. (2011) *Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of kanamycin*. Sens. Actuat. B-Chem. 155: 618–625.
- Zhao, H.; Xue, C.; Nan, T.; Tan, G.; Li, Z.; Li, Q.X.; Zhang, Q. y Wang, B. (2010) *Detection of copper ions using microcantilever immunosensors and enzyme-linked immunosorbent assay*. Anal. Chim. Acta 676: 81–86.
- Zhu, X.S.; Duan, D.Y. y Publicover N.G. (2010) *Magnetic bead based assay for C-reactive protein using quantum-dot fluorescence labeling and immunoaffinity separation*. Analyst 135 381–389.
- Zweig, M.H. y Campbell, G. (1993) *Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin. Chem. 39: 561-577.
- Zwirtes de Oliveira, I.R.W. y Cruz Vieira, I. (2006) *Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (Solanum gilo)*. Enzyme Microb. Technol. 38: 449–456.