

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2016

MEMORIA DEL PROYECTO Nº SV-16-GIJÓN-1-01

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: Análisis de marcadores cardiopáticos mediante marcaje magnético

Investigador/a/es responsable/es: Montserrat Rivas Ardisana

Tfno: 98518 2387 **E-mail:** rivas@uniovi.es

Otros investigadores: Carmen Blanco López, Laura Elbaile Viñuales, Rosario Díaz Crespo

Empresas o instituciones colaboradoras: Dismed S.A. y la Fundación Prodiotec

2. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL PROYECTO

2.1 Resumen ejecutivo

El resumen ejecutivo del Proyecto debe ser una síntesis clara y concisa del trabajo realizado, describiendo brevemente los motivos que justifican su realización, los beneficiarios, los objetivos específicos y su grado de consecución, la metodología aplicada y los resultados obtenidos.

Extensión: unas 500-600 palabras (limitado a un máximo de 4000 caracteres, incluidos espacios).

Interés del proyecto

Cuando se produce un daño al corazón se liberan hacia la sangre los llamados *marcadores cardiopáticos*. La medida de estos marcadores es muy útil para el diagnóstico, evaluación y monitorización de pacientes con sospecha de *síndrome coronario agudo* e *isquemia cardíaca*. Los síntomas de estas cardiopatías son el dolor y la opresión torácicos, las náuseas y la dificultad para respirar. Sin embargo, los mismos síntomas pueden observarse también en otras patologías que no afectan al corazón. Por ello, resulta muy interesante la cuantificación de los marcadores cardíacos para un diagnóstico rápido y el establecimiento de un tratamiento adecuado.

La proteína C reactiva (PCR), contenida en el plasma sanguíneo, aumenta dramáticamente sus niveles en respuesta a los procesos inflamatorios que tienen lugar en el cuerpo.

Por otra parte, la *troponina* es una proteína presente en el músculo cardíaco y responsable de su contracción muscular. En situación normal la presencia de troponina en sangre es baja pero un ataque cardíaco eleva instantáneamente sus niveles.

Por todo lo expuesto, un sistema de detección conjunto de los niveles de PCR y troponina puede resultar muy útil para el diagnóstico urgente y *point-of-care* del riesgo cardíaco.

Objetivos específicos

Desde el punto de vista de la investigación aplicada, el objetivo del presente proyecto ha sido la detección de las proteínas mencionadas, la PCR como objetivo mínimo y la troponina como un objetivo más ambicioso en un plazo más largo, mediante el desarrollo de inmunoensayos magnéticos en papel y su cuantificación mediante el sistema NanoSensor (éste fue desarrollado con el apoyo del IUTA en años precedentes y presenta las cualidades requeridas para el diagnóstico de crisis cardíaca: rapidez y bajo coste).

El grado de consecución de los objetivos fue realmente satisfactorio. Se logró la inmovilización específica de la troponina (la elección final de esta proteína como diana del análisis se debió a la disponibilidad de los reactivos inmunológicos) en tiras de nitrocelulosa y su cuantificación con NanoSensor. Se mejoró la sensibilidad del sensor mediante la impresión de micropistas más estrechas y mejor definidas con una nueva fresadora de PCBs y mediante el uso de un sistema microposicionador para realizar el escaneo de la tira.

El objetivo de formación preveía la iniciación de una estudiante en la investigación multidisciplinar, una formación muy apreciada y demandada en los campos de conocimiento implicados así como en la industria. María Salvador, ingeniera química y máster en Biotecnología, ha realizado esta investigación integrada en equipos de Física Aplicada y Química Analítica y, con ello defendió su Trabajo Fin de Máster (obteniendo la máxima calificación, 10) y participó en varios congresos en algunos de los cuales presentó personalmente una conferencia y un póster. Además, contribuyó muy activamente a la Semana de la Ciencia mostrando resultados de su proyecto a estudiantes de secundaria.

Metodología

El uso de NanoSensor requiere el marcaje específico de la entidad biológica de interés mediante nanopartículas superparamagnéticas que son detectables y cuantificables por él. Por ello, la metodología a seguir pasa por las siguientes etapas: (i) síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita con las características adecuadas para el sistema NanoSensor (estabilidad en disolución y buenas propiedades magnéticas y cristalinas); (ii) funcionalización de las mismas para activar la detección mediante la incorporación a su superficie de un anticuerpo capaz de reconocer la entidad biológica deseada; y (iii) conjugación de las nanopartículas funcionalizadas para su unión específica a la entidad vía el mencionado anticuerpo. El test previsto para la cuantificación de ambos marcadores es el inmunoensayo de flujo lateral: sobre la tira de nitrocelulosa se imprimen líneas de anticuerpos de captura contra el analito en cuestión que permiten su inmovilización (junto con las nanopartículas superparamagnéticas) y su posterior "lectura" mediante el sensor.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

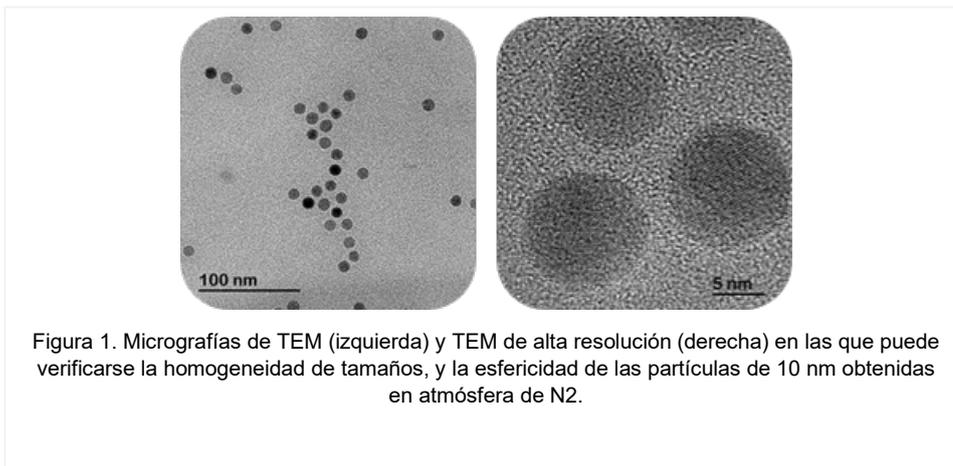
En el diseño del proyecto se fijaron unos objetivos parciales cuya resolución se analiza a continuación que se enumeran a continuación

1. Síntesis de nanopartículas de magnetita con las características idóneas para su detección y cuantificación por el sistema NanoSensor.

Se sintetizaron en nuestro laboratorio nanopartículas de magnetita de 10 nm mediante co-precipitación de sales de hierro (FeCl_3 y FeCl_2) en medio ácido y en distintas atmósferas. Se constató la importancia de la atmósfera protectora (en este caso se utilizó gas nitrógeno) para lograr una excelente esfericidad y evitar la aglomeración de las partículas. Además, esta protección contribuye a la reproducibilidad de los resultados de la síntesis que, de otra forma, es altamente dependiente de la posible oxidación de las sales en los instantes iniciales del proceso.

Se constató, utilizando las partículas para realizar inmunoensayos magnéticos, que un cierto grado de aglomeración de las partículas era favorable ya que, al incrementarse el número de partículas por unidad de proteína (que queda marcada por, al menos, un aglomerado), se aumenta considerablemente la señal magnética y, en consecuencia, la sensibilidad para la biodetección.

Aunque no estaba considerado un objetivo del proyecto, debido a las conclusiones anteriores, se decidió ensayar la aglomeración controlada de partículas mediante la adición de lisina a la disolución y se determinó el tamaño máximo de los aglomerados que permiten el flujo por la tira de nitrocelulosa.



En todos los casos, las partículas

sintetizadas y las aglomeradas se caracterizaron magnética, química y estructuralmente mediante distintas técnicas: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR), Análisis Termogravimétrico (TGA), y Magnetometría de Muestra Vibrante (VSM) y Zero-Field-Cooling/Field-Cooling (ZFC/FC), en los correspondientes Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo.

2. **Funcionalización de las nanopartículas para activar la detección mediante la incorporación a su superficie de los anticuerpos capaces de reconocer la PCR y la troponina.**

Las nanopartículas se sintetizaron con recubrimiento de ácidopoliacrílico el cual posteriormente se activó mediante el uso de un agente entrecruzante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) como estabilizador.

3. **Conjugación de las nanopartículas funcionalizadas para su unión específica a la PCR por un lado, y a la troponina por otro, vía los mencionados anticuerpos.**

La unión específica de las nanopartículas a troponina I se ensayó mediante dos anticuerpos específicos contra esta proteína, ambos comerciales (ver Tabla 1).

El primer paso para el desarrollo del inmunoensayo con las nanopartículas magnéticas fue su ensayo preliminar con nanopartículas de oro, dada la experiencia previa del equipo investigador en este sentido. Posteriormente se llevó a cabo la conjugación equivalente de las nanopartículas de magnetita.

Tabla 1. Anticuerpos anti-troponina I utilizados en los diferentes experimentos.

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

4. **Preparación de las tiras de flujo lateral que permitan dos líneas de test asociadas a los dos marcadores cardíacos y su adaptación al sistema Nanosensor para su medida.**

Se prepararon varias series de TFL mediante impresión de líneas de anticuerpos. Como se ha comentado, se sustituyó la inmovilización de PCR por un estudio más amplio de las distintas opciones de inmovilización de troponina. Hay que tener en cuenta que en este tipo inmunoensayo son necesarios al menos dos anticuerpos específicos contra el analito, uno para el enlace a las partículas (anticuerpo de marcaje) y otro para la inmovilización en la línea de test de la TFL (anticuerpo de captura). Además de los anticuerpos comerciales ya mencionados, se decidió ensayar otra pareja producidos mediante un hibridoma en el propio laboratorio en trabajos anteriores. En la figura 2 se pueden ver las diferentes configuraciones del formato tipo sándwich que se probaron. Los sándwiches más eficaces en la captura resultaron ser los tipos 1 y 2.

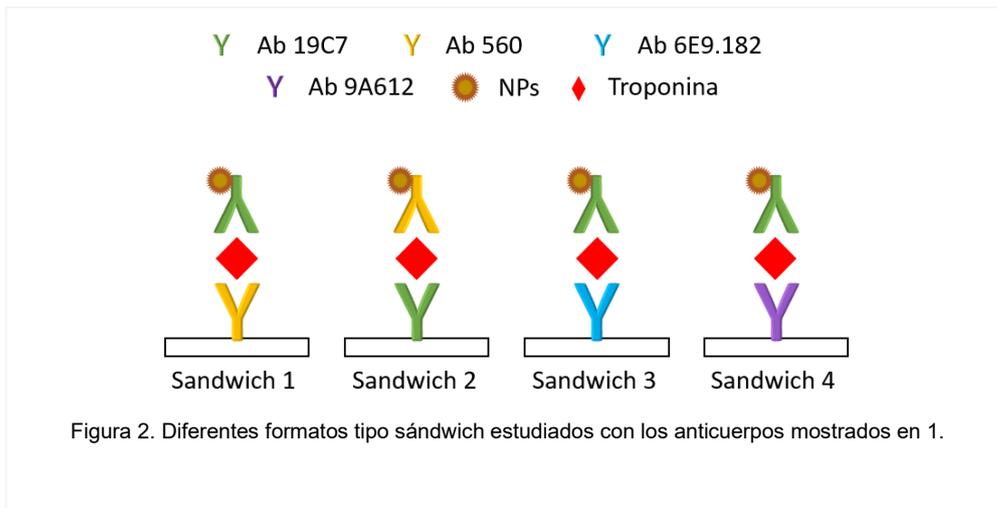


Figura 2. Diferentes formatos tipo sándwich estudiados con los anticuerpos mostrados en 1.

Persiguiendo la mejora de la eficiencia en la captura se realizaron otras pruebas como el lavado previo de la membrana mediante sumersión en agua miliQ, selección del running buffer (que tiene la función de facilitar el flujo capilar de la muestra por la membrana), agentes de bloqueo (para evitar la retención inespecífica del analito o las partículas) y la optimización de la concentración de partículas añadida a la muestra (aunque hay que garantizar que su número sea suficiente para marcar todas las proteínas, si el número es excesivo la muestra no fluirá por impedimentos estéricos).

Se realizaron TFLs con distintas concentraciones de troponina, siempre por triplicado, y

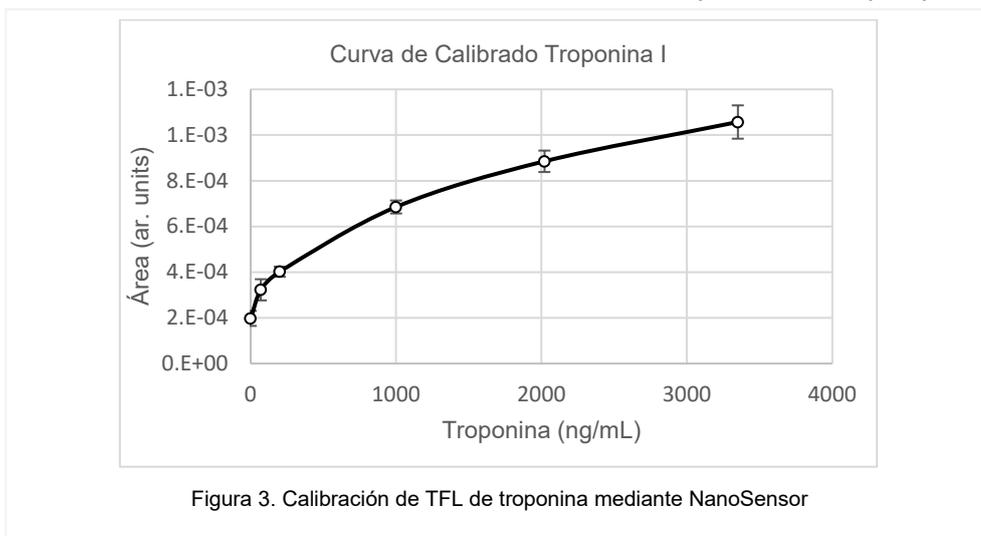


Figura 3. Calibración de TFL de troponina mediante NanoSensor

se evaluaron con el sistema NanoSensor. La capacidad del sistema NanoSensor-TFL para cuantificar troponina quedó demostrada si bien se concluyó que la eficiencia del marcaje es manifiestamente mejorable. La eficiencia del marcaje mediante partículas de oro fue buena y pero bastante peor en el caso de las de magnetita; se atribuye esto a que

en el último la unión partícula-anticuerpo tiene lugar por enlace covalente. Este tipo de enlace es muy fuerte por lo que es muy posible que esté deformando los anticuerpos y con ello reduciendo su efectividad.

5. Diseño de un prototipo del propio sistema Nanosensor de tamaño manejable para ser comercializado.

El NanoSensor se mejoró especialmente mediante dos estrategias. Una de ellas pasó por la impresión mediante técnicas de fresado de micropistas detectoras más estrechas que las usadas en trabajos anteriores ya que se había concluido que una reducción en este sentido mejoraría la sensibilidad.

Efectivamente, la señal aumentó gracias a esto lo que permitió disminuir la frecuencia de detección desde los 11 MHz hasta los 10 MHz. Esto, de manera inmediata, reduce los ruidos espurios y la influencia de otros factores ambientales como el movimiento de objetos en su entorno. Además, es previsible que esto facilite considerablemente la fabricación de un dispositivo portátil ya que para la medida de la impedancia del circuito (que es la base de esta sensorización) existen en el mercado pequeños dispositivos integrados de posible aplicación.

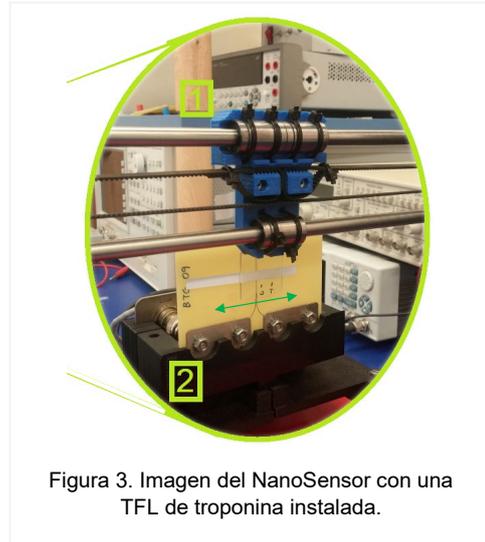


Figura 3. Imagen del NanoSensor con una TFL de troponina instalada.

Además, se incorporó el escaneo de la muestra mediante desplazamiento de la misma gracias a un microposicionador diseñado en un proyecto IUTA del año 2015. Este sistema probó ser mucho mejor que el desplazamiento del dispositivo sensor que introduce ruido por vibraciones mecánicas en la señal. Gracias al escaneo se obtiene, por integración de la señal, la contribución de todas las partículas de la muestra sin importar que no estén homogéneamente distribuidas en las líneas.

2.3 Tareas realizadas

A continuación se enumeran brevemente las tareas de investigación realizadas.

1. Optimización de la síntesis de nanopartículas de magnetita
2. Funcionalización de las nanopartículas y conjugación a troponina I
3. Puesta a punto de los inmunoensayos de troponina y preparación de TFLs.
4. Mejora del sistema NanoSensor para evaluación de TFLs.

2.4 Resultados obtenidos

Se ha descrito en el apartado 2.2 dentro del grado de consecución de los objetivos.

2.5 Trabajos o necesidades futuras

De los trabajos realizados se concluye la necesidad de mejorar la eficiencia del marcaje con magnetita. El enlace a la troponina no es bueno probablemente debido a que el recubrimiento de ácido poliacrílico de las partículas obliga a realizar la combinación con el anticuerpo a través de un enlace covalente. Pensamos que otro tipo de recubrimiento mejorará susodicha eficiencia. Planeamos explorar nuevas rutas de síntesis que den lugar a nanopartículas recubiertas e otros polímeros (por ejemplo PEI) o de otros metales (oro o plata).

La mejora de NanoSensor es una tarea continua de nuestra investigación. Se pretende mejorar la señal del sensor por la vía de una mayor y mejor miniaturización de las pistas sensoras utilizando otras técnicas de impresión. Además, para poder avanzar en la dirección de la transferencia de la técnica a la industria, es interesante realizar el traslado hacia un dispositivo realmente portátil acoplando la pista sensora a un circuito sencillo de medida de impedancia en las condiciones de frecuencia, voltaje y potencia seleccionadas.

2.6 Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias...)

Actividades de divulgación en ámbitos distintos de los académicos

María Salvador, contratada con este proyecto, participó con el resto del equipo de investigación de la EPIG, en el reportaje emitido en el la *Televisión del Principado de Asturias TPA* sobre el NanoSensor y la investigación asociada que viene siendo sistemáticamente apoyada por el IUTA desde el año 2011:

TP  <https://youtu.be/yKftgZCmbnA>

Tesis Fin de Máster

Además de la culminación de una etapa formativa importante, las tesis son también una actividad de divulgación:

Estudiante: María Salvador Fernández

TESIS: Máster (Máster de Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud)

TÍTULO: Análisis de marcadores cardiopáticos mediante marcaje magnético.

Fecha: 19 de julio de 2016

Directoras: M. Carmen Blanco López y Montserrat Rivas Ardisana

Calificación Sobresaliente (10,0)

Tesis Doctoral

La tesis de David Lago Cachón se defendió este año y fue apoyada financieramente por el IUTA (David fue beneficiario de la ayuda en 2011-2014):

Doctorando: David Lago-Cachón

TESIS: Doctoral (Programa de Doctorado en Física Fundamental y Aplicada)

TÍTULO: Sensor impeditivo de nanopartículas superparamagnéticas y su aplicación a la cuantificación de PSA.

Fecha: 14 de octubre de 2016

Directores: Montserrat Rivas Ardisana y José Ángel García Díaz

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Congresos científicos internacionales

Se presentaron dos trabajos relativos a esta investigación en congresos de carácter internacional a los que contribuyó la propia estudiante (hay que decir que estos trabajos son también fruto del proyecto IUTA del año 2015 en el que también estuvo contratada):

TÍTULO: Superparamagnetic-particles mediated quantification of biomarkers

AUTORES: M. Rivas, J.C. Martínez-García, J.A. García, D. Lago-Cachón, A. Moyano, M. Salvador, M.C. Blanco-López, M. Oliveira-Rodríguez, J. Rivas

CONGRESO: 61st Conference on Magnetism and Magnetic Materials MMM

CELEBRACIÓN: Nueva Orleans (EEUU), noviembre de 2016

TÍTULO: Magnetic sensor for protein quantification by Magnetic Lateral Flow Immunoassay

AUTORES: M. Rivas, J.C. Martínez-García, J.A. García, D. Lago-Cachón, A. Moyano, M. Salvador, M.C. Blanco-López, M. Oliveira-Rodríguez, J. Rivas
 CONGRESO: 10th International Conference on Fine Particles Magnetism ICFPM
 CELEBRACIÓN: Gaithersburg (EEUU), julio de 2016

Congresos científicos nacionales

La propia estudiante dio una charla oral en el BAC 2016 y contribuyó a la presentación de un póster:

TÍTULO: Quantification of troponin by superparamagnetic lateral flow immunoassay
 AUTORES: María Salvador, Amanda Moyano, Montserrat Rivas, José C. Martínez-García, Myriam Oliveira-Rodríguez, Carmen Blanco-López
 CONGRESO: Congreso Anual de Biotecnología (BAC)
 CELEBRACIÓN: Gijón (España) en julio de 2016

TÍTULO: Biosensor for immunomagnetic analysis of prostate specific antigen (PSA)
 AUTORES: Amanda Moyano, María Salvador, Montserrat Rivas, Myriam Oliveira-Rodríguez, M. Carmen Blanco-López, David Lago-Cachón, José C. Martínez-García, José A. García
 CONGRESO: Congreso Anual de Biotecnología (BAC)
 CELEBRACIÓN: Gijón (España) en julio de 2016

Producción científica: artículos publicados en revistas indexadas en JCR

D. Lago-Cachón, M. Rivas, J.C. Martínez-García, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Blanco-López, J.A. García, *High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, **423**, pp. 436-440 (2017).

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-16-GIJÓN-1.01	4600 €			
Otras fuentes	FC-15-GRUPIN14-037	14000 €	6000 €	15000 €	9000 €
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	María Salvador Fernández			
	Tareas	Investigación.			
	Período	2016			

4. OTROS PROYECTOS Y CONTRATOS CON FINANCIACIÓN EXTERNA

Título del proyecto/contrato	MATERIALES MAGNÉTICOS AVANZADOS
Referencia	FC-15-GRUPIN14-037
Investigador/a/es principal/es	Jesús A. Blanco Rodríguez

Equipo investigador	Montserrat Rivas, José Carlos Martínez, Laura Elbaile, José Ángel García, Pedro Gorría, Rosario Díaz, Carmen Piqué, Belén Fernández, Javier Carrizo
Periodo de vigencia	2015-17
Entidad financiadora	Principado de Asturias
Cantidad subvencionada	150000 €