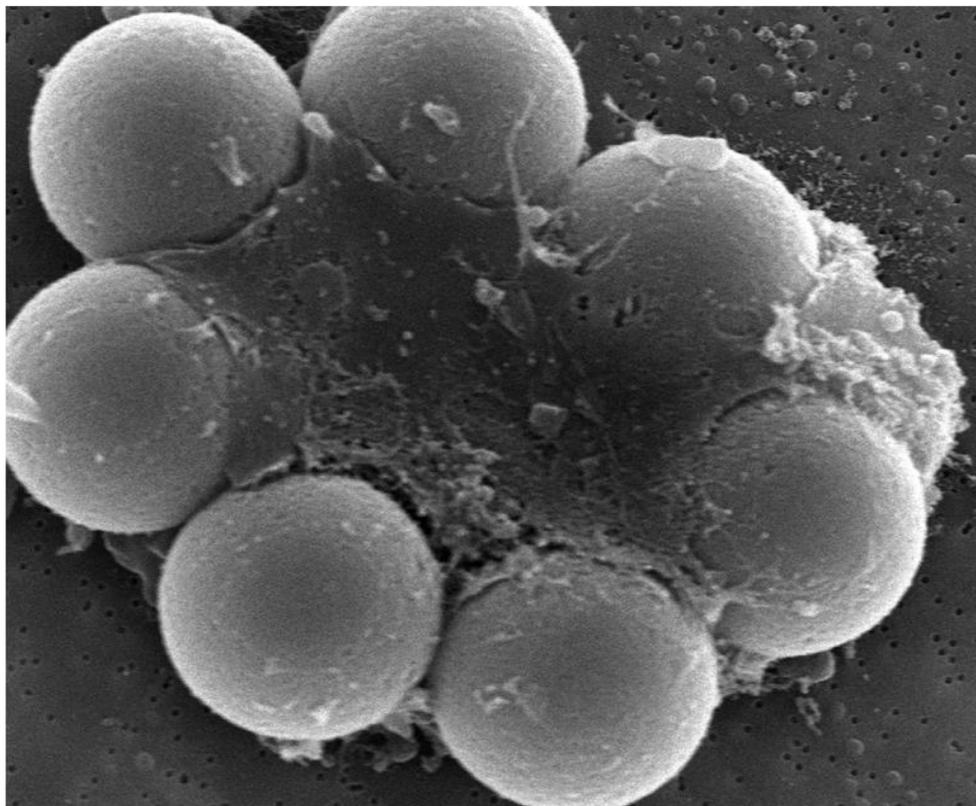

Departament de Química
Mòdul d'Iniciació a la Recerca i
Treball de Fi de Màster

BIOSENSOR PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE INMUNODEFICIENCIAS



SOLEDAD CARINELLI

DIRECTOR: M^a ISABEL PIVIDORI

La única verdad es la realidad

Aristóteles

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, Esthella y Luis, por todo el esfuerzo que hicieron durante este año para que hoy llegue hasta aquí; por todo el amor y por toda la confianza que depositaron en mí: Gracias!

A mis hermanas, mis adoradas hermanitas Natalia y Patricia, por acompañarme y transitar junto a mí en la distancia, ese nuevo desafío que fue el Master y la vida, las amo!

A Mariqui, por todo el esfuerzo y el empeño que pusiste para que hoy esté entre ustedes. Gracias por la oportunidad que me has dado, por tu ayuda y predisposición. Gracias por haber confiado en mí.

A Susana y Tamara, simplemente por todo. Gracias por sus consejos constantes, por sentarse conmigo a resolver cuanto problema se presentaba, realmente es increíble la voluntad que tienen en ayudar. Gracias por haber hecho mi estadía más placentera, por haber escuchado todas mis angustias y problemas, y por haberme regalado nuevas amistades.

A Mercè, gracias por tu enorme paciencia, tu dulzura, y por tu predisposición incansable a ayudarme en todo.

A Cristina, por ayudarme diariamente con el trabajo en el laboratorio, por resolver mis dudas, y por estar siempre atenta a que todo vaya bien. Gracias!

Y gracias a todas aquellas personas que, aunque no las haya nombrado, formaron parte de mi vida durante el desarrollo de este “aprendizaje”.

RESUMEN

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) y el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) afecta a millones de personas en todo el mundo, y constituye una amenaza a la salud y la vida de muchas otras más, sobre todo en países en vías de desarrollo.

Existe un gran interés en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el diagnóstico de dicha enfermedad de forma rápida, económica y fuera del ámbito del laboratorio por personal no especializado. Los biosensores son dispositivos ideales para cubrir esta demanda analítica facilitando la toma de decisiones y permitiendo un uso racional de técnicas analíticas confirmatorias más costosas.

Se plantea el diseño de una estrategia magneto-ELISA con detección óptica así como un dispositivo magneto biosensor electroquímico para el diagnóstico de SIDA a través del recuento de células marcadoras de la enfermedad presentes en la sangre. Ambas estrategias se basan en la captura inmunomagnética de linfocitos T CD4⁺ con partículas magnéticas modificadas con anticuerpos monoclonales específicos (anti-CD3). La detección de las células capturadas se realiza con un anticuerpo primario anti-CD4 marcado con biotina (antiCD4-biotina) y con un conjugado de estreptavidina y de la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante). La unión de esta enzima al anticuerpo primario se realiza a través del complejo biotina/estreptavidina. Se proponen dos tipos de sistemas de detección: óptico y electroquímico. Esto se logra mediante la elección adecuada del sustrato para cada sistema planteado. El dispositivo biosensor basados en un transductor electroquímico renovable y magnético acoplado a partículas magnéticas específicas para las células marcadoras de la enfermedad, consigue la simplificación metodológica y facilita la transferencia de la tecnología hacia la fabricación de un biokit diagnóstico en el ámbito clínico. La potencial aplicación de los dispositivos analíticos propuestos en este trabajo tienen un interés social elevado por su idoneidad para realizar análisis, rápidos, económicos y en el ámbito de la propia consulta médica.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
antiCD4-biotina	Anticuerpo anti-CD4 conjugado a biotina
antiCD3-MP	Partícula magnética modificada con anticuerpo anti-CD3
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albumina sérica bovina, del inglés <i>bovine serum albumin</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
estrepAv-HRP	Enzima peroxidasa –HRP– conjugada a estreptavidina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Dispersión frontal de la luz, del inglés <i>forward scatter</i>
HQ	Hidroquinona
HRP	Enzima peroxidasa, del inglés <i>Horseradish peroxidase</i>
LT	Linfocito T
m-GEC	Magneto electrodo basado en compósitos grafito-epoxi
MP	partículas magnéticas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA	Organización de las Naciones unidas contra el SIDA
PBS	Solución tampón fosfato, del inglés <i>phosphate buffer solution</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Picoeritrina
RT-PCR	Reacción de la cadena de la polimerasa en transcripción reversa, del inglés <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SEM	Microscopia electrónica de barrido, del inglés <i>scanning electronic microscopy</i>
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
SSC	Dispersión lateral de la luz, del inglés <i>side scatter</i>
VC	Voltamperometría cíclica
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación actual del virus de inmunodeficiencia humana.....	1
1.2. La enfermedad de inmunodeficiencia adquirida.....	1
1.3. Etapas y Clasificación de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana.....	2
1.4. Tratamiento contra el virus de la inmunodeficiencia humana.....	3
1.5. Diagnóstico del virus de inmunodeficiencia humana.....	3
1.6. Recuento de linfocitos T CD4 ⁺	4
1.7. Los biosensores. Una alternativa prometedora para el diagnóstico de inmunodeficiencia adquirida.....	6
1.8. Técnicas electroquímicas en biosensores electroquímicos.....	6
1.9. Materiales transductores en biosensores electroquímicos. Los compósitos.....	7
1.10. Las partículas magnéticas.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. EXPERIMENTAL.....	10
3.1. Esquema del biorreconocimiento de linfocitos T CD4 ⁺ en las estrategias desarrolladas en el presente trabajo para el diagnóstico de síndrome de inmunodeficiencia...	10
3.2. Equipamiento.....	11
3.3. Reactivos y soluciones.....	11
3.4. Construcción y caracterización de los electrodos magnéticos basados en compósitos de grafito-epoxi (m-GEC).....	12
3.4.1. Diseño y construcción del cuerpo del magneto electrodo m-GEC.....	12
3.4.2. Preparación de electrodos magnéticos basados en un compósito de grafito epoxi (m-GEC).....	13
3.4.3. Caracterización de los transductores electroquímicos basados en grafito-epoxi (m-GEC).....	13
3.5. Captura inmunomagnética de linfocitos T CD4 ⁺	14
3.6. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por microscopia electrónica de barrido y microscopia óptica.....	14
3.7. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por citometría de flujo.....	15
3.8. Ensayo magneto-ELISA para la determinación de linfocitos T CD4 ⁺	15

3.8.1. Optimización de la concentración de anticuerpo antiCD4-biotina y del conjugado estreptAv-HRP.....	17
3.8.2. Optimización del bloqueo de la superficie de las microplacas de poliestireno.....	17
3.9. Magneto biosensor electroquímico para la determinación de linfocitos T CD4 ⁺	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Construcción y caracterización de los electrodos magnéticos basados en compósitos grafito-epoxi (m-GEC).....	19
4.2. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por microscopía electrónica de barrido y óptica.....	20
4.3. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por citometría de flujo.....	21
4.3.1 Eficiencia de captación de los linfocitos T.....	22
4.3.2. Estudio de la viabilidad de los linfocitos T.....	23
4.3.3. Estudio de la liberación de linfocitos del complejo LT-MP durante el procedimiento de lavado.....	24
4.4. Ensayo magneto-ELISA para la determinación de linfocitos T D4 ⁺	25
4.4.1. Optimización de la concentración de anticuerpo antiCD4-biotina y del conjugado estreptAV-HRP.....	25
4.4.2. Optimización del bloqueo de la superficie de las microplacas de poliestireno.....	26
4.4.3. Detección de linfocitos T CD4 ⁺ mediante un ensayo magneto-ELISA.....	27
4.5. Magneto biosensor electroquímico para la determinación de linfocitos CD4 ⁺	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. PERSPECTIVAS.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual del virus de inmunodeficiencia humana

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) afecta a millones de personas en todo el mundo, y constituye una amenaza a la salud y la vida de muchas otras más, sobre todo en países en vías de desarrollo. La Organización de Naciones Unidas contra el SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) estiman que en el 2007, cerca de 140.000 personas, entre adultos y niños, han sido identificadas como positivas para el VIH en España, 2.300 han muerto debido al SIDA y poco más de 1.000 nuevos casos de VIH se han registrado ese mismo año^[1].

Sin embargo, los principales efectos de esta enfermedad se potencian en países de mediano y bajo desarrollo. Las regiones más afectadas son África, el este y sur de Asia, y en menor medida el Caribe.

Según el reporte global presentado por la OMS, el número de personas que viven con VIH en el 2009 es de 33.3 millones, de los cuales, 2.5 millones son niños menores de 15 años. En este mismo año, se han registrado 2.6 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes debido al SIDA. Alrededor de 5.2 millones de personas infectadas por el VIH tuvieron acceso al tratamiento con terapia antirretrovírica en países de medianos y bajos ingresos. Aún así, unos 10 millones de pacientes carecen de acceso a este tratamiento^[2].

En este contexto, se está llevando a cabo un esfuerzo global enorme entre distintos países y organizaciones, para ayudar a ampliar y prestar servicios integrales con la finalidad de reducir la propagación de la infección y mitigar sus efectos.

Es importante remarcar que mientras el precio de los medicamentos desciende considerablemente^[3], el costo y la complejidad técnica de las pruebas de laboratorio esenciales para el seguimiento de la enfermedad del SIDA, tal como la carga viral y el recuento de linfocitos T CD4⁺, se mantiene a unos costes muy elevados.

1.2. La enfermedad de inmunodeficiencia adquirida

El VIH, identificado en 1983, es un retrovirus que afecta a las células del organismo que expresan el receptor CD4 en su superficie (linfocitos T colaboradores, macrófagos, monocitos, y células dendríticas) uniéndose mediante la glicoproteína gp120 de su membrana para luego penetrar en las células.

Una vez en el interior de las células, la transcriptasa reversa del VIH transcribe el ARN viral a ADN, que se integra en el ADN celular. El ADN viral integrado recibe el nombre de *provirus*. Cuando la célula es activada, el provirus inicia la síntesis de proteínas virales que formarán nuevos viriones. Finalmente

las células infectadas son destruidas como consecuencia de la acción patógena del VIH y los viriones son liberados al medio externo donde infectarán nuevas células ^[4].

Las células CD4⁺ forman parte del sistema inmunitario y están implicadas en la defensa contra enfermedades. En consecuencia, una infección por VIH deja a la persona vulnerable ante otras enfermedades.

Existen dos tipos de virus VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más frecuente en África central, Europa y Australia, y el VIH-2 se encuentra en África occidental y algunas partes de Europa ^[5, 6].

El virus del VIH puede transmitirse mediante contacto sexual, transmisión vertical de madre a hijo (embarazo, parto o lactancia), o vía parenteral (a través de sangre infectada o hemoderivados, por trasplantes de órganos, o maniobras con instrumentos punzocortantes) ^[7].

1.3. Etapas y Clasificación de la infección por virus de inmunodeficiencia humana

La progresión de la enfermedad presenta tres etapas claramente diferenciadas ^[8], como se muestran en la figura 1, y que se describen a continuación:

Infección Primaria (Síndrome retroviral agudo). En general se presenta como un cuadro agudo que dura entre 1-6 semanas. En esta etapa ocurre la infección de linfocitos T CD4⁺ y la migración a ganglios linfáticos, hay elevada replicación y carga viral en sangre. Las pruebas de anticuerpos resultan negativas.

Infección asintomática (latencia clínica). Esta etapa dura entre 2-15 años aproximadamente. Se observa un descenso de la viremia hasta el estado basal (nivel metabólico bajo), los linfocitos T CD4⁺ son destruidos de forma continua y lenta.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Constituye el estadio más avanzado de la enfermedad y se diagnostica cuando el recuento de linfocitos T CD4⁺ es inferior a 500 linfocitos T CD4⁺ μL^{-1} . En esta etapa aumenta la replicación viral y aparecen algunas neoplasias e infecciones oportunistas.

El recuento de linfocitos T CD4⁺ en la sangre guarda relación con la etapa evolutiva de la infección. En función de este parámetro, existen tres categorías inmunológicas: grupo 1 (500 linfocitos T CD4⁺ μL^{-1} o superior), grupo 2 (200-499 linfocitos T CD4⁺ μL^{-1} o superior), y grupo 3 (menos de 200 linfocitos T CD4⁺ μL^{-1}). Por otro lado, se definen las categorías clínicas en donde los grupos se dividen en A (pacientes asintomáticos, con infección aguda por VIH, y con linfadenopatía persistente generalizada), B (pacientes con enfermedad por VIH sintomática, que no indican SIDA) y C (pacientes con enfermedades que indican SIDA). Un paciente tiene SIDA, según el Centro de Control de

Enfermedades y Prevención, cuando está clasificado dentro de la categoría clínica del grupo C o, bien, en la categoría inmunológica del grupo 3 [9].

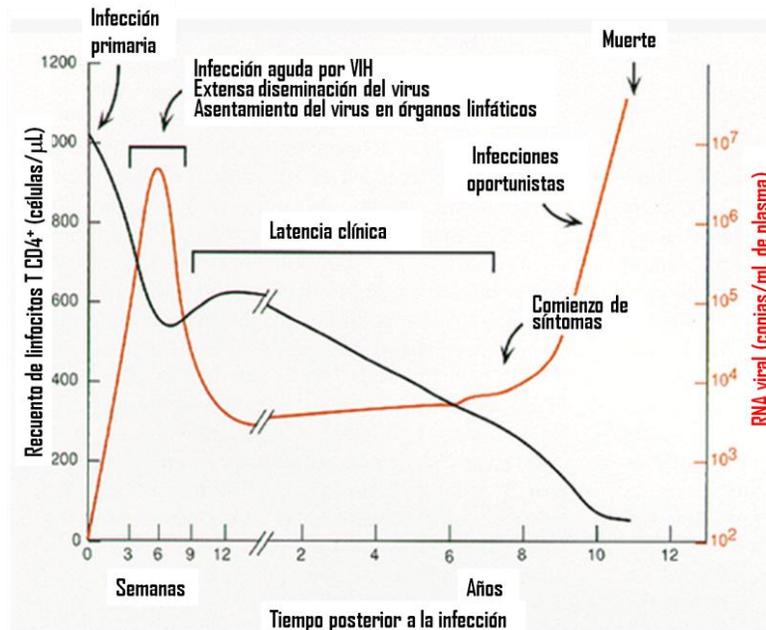


Figura 1. Curso típico de la infección por VIH. Los plazos varían en diferentes pacientes. En negro, evolución del recuento de linfocitos T CD4⁺. En rojo, evolución de la carga viral.

1.4. Tratamiento contra el virus de inmunodeficiencia humana

El objetivo principal del tratamiento contra el VIH es lograr el mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad a través de la supresión de la replicación viral y la preservación de la función inmune. Los fármacos usados actualmente no erradican el virus por lo que se requiere un tratamiento de por vida. Dentro del tratamiento contra el virus se incluye el tratamiento y profilaxis de la patología asociada al SIDA.

En la actualidad se tiende a iniciar la medicación de forma más temprana considerándose que un paciente debe recibir tratamiento antiviral cuando presenta enfermedades marcadoras de SIDA o un recuento de linfocitos T CD4⁺ menor de 350 μL^{-1} de sangre [2]. Hasta el 2006 según las guías y recomendaciones de la OMS, el valor correspondiente era de 200 linfocitos T CD4⁺ μL^{-1} .

1.5. Diagnóstico del virus de inmunodeficiencia humana

El diagnóstico de la infección por el VIH puede realizarse de modo directo o indirecto [10]. Los métodos directos detectan al virus o alguno de sus componentes, mientras que los indirectos reconocen anticuerpos específicos producidos como respuesta al virus.

Los métodos directos están limitados a recién nacidos y a individuos cursando la primoinfección viral. Dentro de estos podemos citar al cultivo celular, las técnicas inmunoenzimáticas (EIA) para la detección del antígeno p24, y las técnicas moleculares como la PCR y RT-PCR para la cuantificación de DNA o RNA viral, respectivamente ^[11].

Por otro lado, los métodos indirectos se dividen en pruebas de *screening*, que son más sensibles, y pruebas confirmatorias, que se caracterizan por su alta especificidad. Dentro de las pruebas de *screening* encontramos las técnicas inmunoenzimáticas tales como los ensayos ELISA, aglutinación, Dot blot e inmunocromatografía. Dentro de los ensayos confirmatorios, el más empleado es el Western Blot. Otras metodologías de confirmación son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el análisis por radioinmunoprecipitación (RIPA) y el inmunoensayo lineal (LIA). Estos métodos presentan alta subjetividad o complejidad, que dificultan su utilización rutinaria como pruebas de confirmación ^[11].

1.6. Recuento de linfocitos T CD4⁺

El recuento de linfocitos T CD4⁺ es actualmente uno de los marcadores biológicos más importantes en la determinación del estado clínico de una infección por VIH. Este valor es usado en diagnóstico de SIDA, para decidir cuándo iniciar una terapia antirretroviral y se mantiene, luego de la iniciación del tratamiento, como el marcador más relevante para seguir la progresión de la enfermedad ^[12]. El recuento de linfocitos T CD4⁺ se expresa como el número de linfocitos T CD4⁺ por microlitro de sangre en adultos, y generalmente como porcentaje de linfocitos T CD4⁺ entre todos los linfocitos T en niños.

En países desarrollados se recomienda realizar el recuento de linfocitos T CD4⁺ de 2 a 4 veces al año durante todas las etapas de infección y durante el tiempo de vida del tratamiento ^[13]. La técnica analítica más utilizada para el recuento en sangre es la citometría de flujo, considerada como el método de referencia debido a su rapidez, precisión y reproducibilidad.

El citómetro de flujo emplea láseres que estimulan anticuerpos con marcas fluorescentes (normalmente FITC, yoduro de propidio, PE, Cy3 y Cy5) específico para el receptor CD4 y otros marcadores de superficie celular, para distinguir los tipos de linfocitos. Varios factores –incluido el costo del citómetro de flujo (entre 50.000 y 250.000 euros) y su mantenimiento, la complejidad técnica y operacional y el alto costo de los reactivos – hacen a estos instrumentos imprácticos y/o dificultosos para llevarse a cabo en regiones de escasos recursos. Otra técnica utilizada es el recuento microscópico manual que resulta muy laborioso y se realiza luego de varios pasos que incluyen la separación celular, liberación nuclear y la tinción diferencial. Esta estrategia resulta inviable para el análisis descentralizado y fuera del ámbito del laboratorio, como puede ser en la propia consulta médica, por lo que existe la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el diagnóstico y evaluación de la evolución de inmunodeficiencias de forma rápida y económica ^[14].

La citometría de flujo es un método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz (*light scatter*) de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada. La interacción de una célula con la luz del láser puede producir dos tipos de dispersión: a) Dispersión frontal de la luz o FSC (*forward scatter*), cuyo grado de dispersión es proporcional al tamaño de la célula/partícula; y b) dispersión lateral de la luz o SSC (*side scatter*), cuyo grado de dispersión es proporcional al contenido de orgánulos membranosos (granularidad). La citometría proporciona datos sobre el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna, e intensidad relativa de fluorescencia. Presenta como ventajas la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. Sin embargo, la citometría no aporta información sobre la distribución espacial de las células estudiadas.

En los últimos años, los esfuerzos en investigación estuvieron dirigidos a desarrollar métodos alternativos para el recuento de linfocitos T CD4⁺. Así aparecieron en el mercado nuevas tecnologías como ser el FACSCount de Becton Dickinson ^[15], the Partec CyFlow ^[16], y los instrumentos Guava ^[17] y Point-of-Care Technologies ^[18,19]. Aunque estas nuevas versiones hacen la citometría de flujo más accesible, el costo de los reactivos se mantiene elevado, y en la mayoría de los casos, son estrategias técnicamente complejas.

La separación de bajo costo por Cito-esferas ^[20] o micropartículas de linfocitos T CD4⁺ de otras células de la sangre, seguida por una técnica de recuento manual estándar usando microscopio óptico, ofrece costos significativamente más bajos ^[14]. Estos métodos, sin embargo, son de bajo rendimiento, requieren una labor intensiva, y son menos precisos que la citometría de flujo tradicional y, por tanto, no han sido ampliamente incorporados en recuentos de rutina.

Es por esto, la necesidad urgente de diseñar métodos nuevos, simples y accesibles para la determinación de linfocitos T CD4⁺ que puedan ser implementados en lugares de escasos recursos brindándole así la posibilidad de detección precoz de la infección en zonas de bajo recursos, coincidentes con las zonas de más alta prevalencia.

Se han documentado unos pocos ejemplos de sistemas de recuento de linfocitos T CD4⁺, basados en microfluídica ^[21] o biosensores ^[22-24]. Mishra y col. ^[25] desarrollaron un chip con captura de linfocitos T CD4⁺ de sangre lisada sobre la superficie modificada de electrodos. La cuantificación fue realizada mediante técnicas de impedancia. La principal desventaja de este sistema fue la gran cantidad de pasos necesarios para la fabricación del electrodo y el costo elevado en función de la demanda. Por otro lado, Rodríguez y col. ^[26] han presentado un prototipo prometedor para el recuento de linfocitos T

CD4⁺, mostrando resultados concordantes con los obtenidos por citometría de flujo. En este trabajo, los leucocitos fueron teñidos con anticuerpos, capturados sobre una membrana dentro de una celda de flujo, y detectados mediante microscopía.

1.7. Los biosensores. Una alternativa prometedora para el diagnóstico de inmunodeficiencia adquirida

Un sensor químico puede definirse como un pequeño dispositivo capaz de cuantificar concentraciones de constituyentes químicos y convertir esta información, en tiempo real, en una señal medible ^[27]. Según la IUPAC, un biosensor se define como un tipo específico de sensor químico constituido por dos partes integradas: un elemento de reconocimiento biológico o biorreceptor y un transductor fisicoquímico ^[28]. La interacción entre el biorreceptor y el analito ocasiona cambios físicos o químicos (de tipo eléctrico, óptico, térmico o másico) que son detectados y transformados en una señal eléctrica por el transductor ^[29].

La utilización del biorreceptor aporta selectividad y pueden emplearse proteínas, ácidos nucleicos, microorganismos, organelas, o tejidos. La elección del material biológico depende de las características del analito.

En los últimos años, los sensores electroquímicos han cobrado notable importancia dentro del campo de las determinaciones analíticas gracias a las ventajas que presentan. El uso de éstos permite obtener señales sensibles, de sencilla interpretación y en tiempo real. Ofrece la posibilidad de trabajar con volúmenes pequeños y sin la necesidad de realizar un pretratamiento de la muestra, y de ser integrados a *kits* portátiles que permitan realizar medidas *in situ*. Estos dispositivos son robustos, de fácil manejo y mantenimiento y presentan tiempos de respuesta muy cortos. Combinan el bajo costo de instrumentación con la versatilidad en el desarrollo de nuevas superficies electrónicas destinadas a la resolución de distintas muestras.

En el presente trabajo se han desarrollado magneto biosensores electroquímicos para la detección de linfocitos T CD4⁺ de transducción electroquímica, por tratarse del tipo de instrumentación idónea para aplicaciones en zonas de escasos recursos. A continuación se detallan las técnicas electroquímicas utilizadas para la caracterización de los electrodos.

1.8. Técnicas electroquímicas en biosensores electroquímicos

Amperometría ^[30, 31]. Se basa en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva sobre la superficie electródica a la cual se la ha sometido a un potencial constante durante un tiempo determinado. La elección adecuada de este potencial aporta cierta selectividad electroquímica, ya que produce descarga de una u otra especie química.

La intensidad de corriente, I , es una medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica (reducción u oxidación) descrita por la ley de Faraday, en su forma diferencial, como:

$$I = n.F \frac{\delta C}{\delta t}$$

Donde $\frac{\delta C}{\delta t}$ es la velocidad de oxidación o de reducción del analito, en mol s^{-1} , F es la constante de Faraday y n es el número de electrones por molécula implicados en la reacción. Como se deriva de la ecuación, la corriente, o salto de corriente, es directamente proporcional a la velocidad de transformación del analito en la superficie del electrodo.

La medida amperométrica se lleva a cabo utilizando un sistema de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia. El electrodo de trabajo es el electrodo sobre el cual se mide el paso de corriente una vez fijada la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, actuando este último como contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico. El tercer electrodo, el electrodo de referencia, mantiene constante el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia suele ser de Ag/AgCl , mientras que el electrodo de trabajo y auxiliar son de materiales conductores e inertes, como metales nobles, modificaciones del carbono y polímeros conductores.

Voltamperometría cíclica ^[30, 32]. Es una técnica muy utilizada ya que proporciona información cualitativa sobre las propiedades redox del analito y permite estudiar los mecanismos de las reacciones de óxido-reducción, así como caracterizar los transductores electroquímicos. Ofrece una localización rápida de potenciales redox de las especies electroactivas, y una evaluación conveniente del efecto del medio sobre el proceso redox.

La voltamperometría cíclica (VC) consiste en un escaneo lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario, con una forma de onda triangular, pudiendo utilizarse uno o varios ciclos. El barrido lineal se realiza desde un valor inicial E_i , hacia un límite predeterminado $E_{\lambda 1}$, (potencial de cambio), donde la dirección del barrido se invierte. Durante el escaneo reverso las moléculas reducidas son reoxidadas. El barrido de potencial mide la corriente resultante y la gráfica de estos dos parámetros recibe el nombre de voltamperograma cíclico.

1.9. Materiales transductores en biosensores electroquímicos. Los compósitos

De entre los materiales conductores que se pueden utilizar como transductores electroquímicos (platino, oro, grafito, u otros materiales conductores continuos), los compósitos son materiales integrados por varios componentes mezclados que forman un compuesto con características propias. Los materiales compósitos utilizados en este trabajo están formados por la combinación de un

polímero aislante y una sustancia eléctricamente conductora. Ambos componentes conservan sus propiedades originales, no obstante el nuevo material al cual dan origen, posee propiedades químicas, mecánicas y físicas propias ^[33].

El grupo de Sensors i Biosensors de la UAB, donde se ha llevado a cabo este trabajo, tiene una gran experiencia en la fabricación de biosensores basados en transductores electroquímicos compósitos. En concreto, en materiales compósitos rígidos de grafito-epoxi (GEC), que permiten un diseño compacto, resistente y de fácil manipulación. Estos compósitos presentan numerosas ventajas frente los materiales tradicionales conductores: elevada sensibilidad, rigidez, robustez, superficie renovable y son compatibles con solventes no acuosos ^[34]. El diseño de un electrodo con propiedades magnéticas basado en un compósito grafito-epoxi (m-GEC) combina la posibilidad de capturar, de forma rápida y sencilla, partículas magnéticas modificadas con las excelentes propiedades electroquímicas del transductor grafito-epoxi.

En el presente trabajo, se plantea la inmovilización del material biológico sobre la superficie del transductor mediante captura magnética, por tanto, al transductor GEC se le incorpora un imán, consiguiendo así un magneto electrodo basado en un compósito de grafito-epoxi (m-GEC).

1.10. Las partículas magnéticas

Las partículas magnéticas representan un gran avance respecto a las técnicas de separación en bioanalítica, ofreciendo la ventaja de realizar la separación de forma más rápida y simple, a través de la aplicación de un campo magnético externo, sin necesidad de utilizar técnicas de centrifugación ni columnas cromatográficas. El uso de estas partículas magnéticas ofrece numerosas ventajas como la fácil manipulación, escasa formación de agregados y buena dispersión en solución acuosa, entre otras. Pero sin duda, su característica más importante es la capacidad de concentrar biomoléculas y la minimización del efecto matriz de la muestra ^[35].

La particularidad de estas partículas es el paramagnetismo, es decir, el comportamiento magnético solo en presencia de un campo magnético externo. Las partículas magnéticas están constituidas de un núcleo de material magnético (óxido de hierro) encapsulado en un polímero inerte (poliestireno) que le proporciona una superficie definida. La superficie polimérica puede estar modificada por grupos químicos o por moléculas biológicas ofreciendo así una alternativa a los soportes sólidos tradicionales no magnéticos.

2. OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo se dirige hacia la materialización de un sistema biosensor para la determinación del número de linfocitos T CD4⁺ presente en sangre periférica que resulte robusto, económico, portátil y de uso simple para su aplicación en el diagnóstico y seguimiento de inmunodeficiencias como el VIH y el SIDA en entornos de escasos recursos económicos.

Se pretende conseguir una metodología analítica capaz de contar linfocitos T CD4⁺ mediante una reacción de captura inmunológica sobre partículas magnéticas. Se propone, para el mismo sistema, dos tipos de detección basados en la reacción con anticuerpos específicos para los linfocitos T CD4⁺: uno óptico (magneto-ELISA) y uno electroquímico (magneto biosensor) empleando la enzima peroxidasa (HRP) como marcador enzimático y el sustrato adecuado en cada caso.

A continuación se enumeran los objetivos generales que son abordados en este trabajo:

- Desarrollar una estrategia de inmunoseparación y concentración de linfocitos T CD4⁺ basada en la captura selectiva de linfocitos T en partículas magnéticas con anticuerpos específicos contra marcadores de superficie CD3.
- Caracterizar y evaluar la efectividad de la captura inmunológica en partículas magnéticas de linfocitos T CD4⁺ mediante técnicas microscópicas y citometría de flujo.
- Diseñar una estrategia magneto-ELISA tipo sándwich con detección óptica utilizando micropartículas modificadas con anticuerpos específicos anti-CD3 y marcación inmunológica hacia receptores específicos anti-CD4.
- Construir magneto electrodos basados en compósitos grafito-epoxi (m-GEC).
- Caracterizar los electrodos construidos mediante voltamperometría cíclica.
- Diseñar un dispositivo magneto biosensor basado en un transductor electroquímico acoplado a partículas magnéticas modificadas con anticuerpos específicos de linfocitos T CD4⁺.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Esquema del biorreconocimiento de linfocitos T CD4⁺ en las estrategias desarrolladas en el presente trabajo para el diagnóstico de síndrome de inmunodeficiencia

El desarrollo de herramientas analíticas para el recuento de linfocitos T CD4⁺, simples de operar, portátiles y económicas es un objetivo fundamental para el diagnóstico de SIDA en países en vías de desarrollo y, así, para el control de la pandemia. Si bien en los últimos años se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar dichas tecnologías, aún no se han obtenido resultados óptimos. Así, son escasos los métodos propuestos para tal fin [25]. Es por esto, que en el presente trabajo se propone el desarrollo de dos estrategias para la detección y cuantificación rápida de linfocitos T CD4⁺ en sangre humana, siendo una de ellas un sistema magneto biosensor electroquímico y la otra un ensayo magneto-ELISA con detección óptica.

Ambos métodos desarrollados se basan en el aislamiento de las células CD3⁺, que es el marcador molecular de linfocitos T totales mediante partículas magnéticas modificadas con anticuerpo anti-CD3 (antiCD3-MP), seguida de la marcación de los linfocitos T CD4⁺ mediante un anticuerpo anti-CD4 conjugado con biotina (antiCD4-biotina). La detección se realiza a través de la medida óptica o electroquímica utilizando un conjugado de estreptavidina y de la enzima peroxidasa (estrepAv-HRP). Dicho conjugado se une a aquellas células que se encuentren marcadas con el anticuerpo antiCD4-biotina. Un aumento en la señal indicaría, por tanto, un aumento en la concentración de enzima HRP y por lo tanto un mayor número de linfocitos T CD4⁺ presentes en la muestra.

En la figura 2 se muestra esquemáticamente, los fundamentos de la técnica explicadas anteriormente.

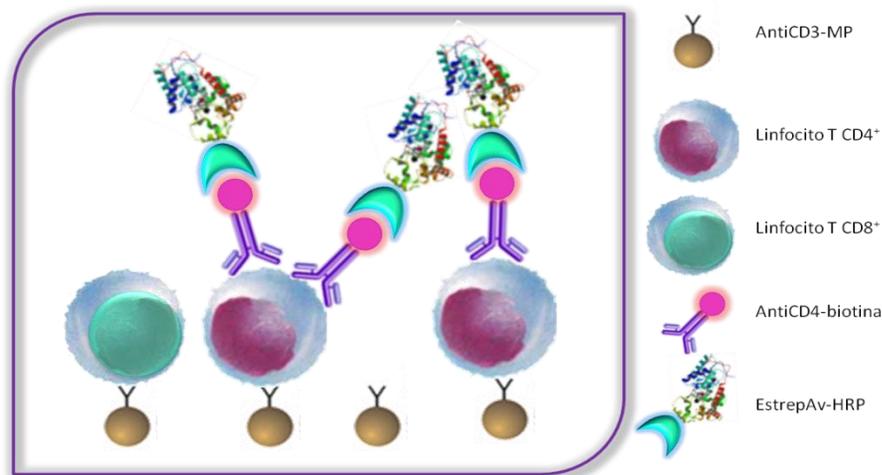


Figura 2. Esquema simplificado del sistema de detección de linfocitos T CD4⁺ presentes en sangre, basada en la separación inmunomagnética con partículas magnéticas antiCD3-MP, y en la detección basada en el anticuerpo antiCD4-biotina y el conjugado enzimático estrepAv-HRP.

3.2. Equipamiento

La caracterización de los electrodos magnéticos m-GEC se realizó por voltamperogramas cíclicos con el equipo Autolab PGSTAT (Eco Chemie, Holanda). Las medidas amperométricas se realizaron con un amperímetro LC-4C de la casa comercial BAS (Bionalytical Systems Inc, USA). Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un sistema de tres electrodos: uno de referencia Ag/AgCl con solución interna de KNO₃ saturada con AgCl y solución externa 0.1 mol L⁻¹ de KCl (Orion 900200), uno auxiliar de Pt (Crison 52-67 1) y el electrodo magnético de trabajo m-GEC basado en un compuesto rígido grafito-epoxi.

El recuento de células con cámara de Neubauer se realizó con el microscopio óptico Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instrument, USA).

Para la captura inmunomagnética, las incubaciones de linfocitos T se realizaron mediante el agitador de microplacas Minishaker MS3 basic (IKA, USA) en el caso de los ensayos magneto-ELISA y el agitador con control de temperatura Thermomixer 5436 (Eppendorf, Alemania) en el caso de los magneto biosensores electroquímicos.

La separación de las partículas magnéticas en magneto biosensores electroquímicos se realizó con un separador magnético (Dyna MPC) suministrado por Dynal Biotech (Oslo, Noruega). La lectura óptica en los ensayos magneto-ELISA se realizó con el lector de ELISA Tipo Sunrise Remote (Tecan, Austria).

El estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética fue realizado con el citómetro de flujo Modelo FACSCanto (BD Bioscience, USA) y el microscopio óptico Telaval 31 (Zeiss, Alemania).

Para la obtención de imágenes SEM se utilizó el microscopio electrónico de barrido Hitachi LTD S-570 (Tokyo, Japón), y para el tratamiento previo de las muestras el metalizador E5000 Sputter Coater Polaron Equipment Limited (Watford, UK) y el desecador para punto crítico K850 Critical Point Drier Emitech (Ashford, UK).

3.3. Reactivos y soluciones

Para la construcción de los magneto electrodos de grafito-epoxi (m-GEC) se utilizó polvo de grafito de un tamaño de partícula de 50 μm (Merck, Alemania), resina epoxi (Epo-Tek, Epoxy Technology, USA), tubos de PVC (diámetro_{int} 6 mm y 22 mm de longitud), discos de cobre; discos de neodimio de diámetro_{int} = 3 mm (N35D315, Halde Gac); papeles abrasivos de diferente granulometría (180, 600 y 1000) y papel de alúmina de 3 μm (polishing strips 948201, Orion). Para la citometría se usó yoduro de propidio (Producto N° P4864, Sigma).

Para la determinación de linfocitos T CD4⁺ mediante ensayos magneto-ELISA y biosensores electroquímicos basados en los magneto electrodos se utilizaron anticuerpo anti-CD4 modificado con

biotina (antiCD4-biotina, producto N° 347321, BD Bioscience), y el conjugado de estreptavidina de *Streptomyces avidinii* marcado con la enzima peroxidasa (estrepAv-HRP Producto N° S5512, Sigma). Para la detección óptica en los ensayos magneto ELISA se usó el kit de sustrato para ELISA (Producto N° 34021, Thermo Scientific). La captación de los linfocitos se realizó con partículas magnéticas Dynabeads® CD3 (Producto N° 111-51D, Invitrogen). Reactivos como el Tween-20, caseína y la albúmina de suero bovina (BSA) se adquirieron en Sigma.

Todas las células utilizadas en los ensayos fueron suministradas por el laboratorio de Immunología Celular (Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, IBB) y provienen de cultivo fresco de linfocitos T CD4⁺ de páncreas, infectadas con EBV (virus de Epstein-Barr) pertenecientes al clon PB 100.29. Otros reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

Las composiciones de las soluciones utilizadas, preparadas en todos los casos con agua bidestilada, fueron las siguientes: Solución tampón fosfato (PBS): 0.01 mol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7.4; Solución tampón fosfato (PBS1): 0.01 mol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, 0.5% BSA, 2 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7.4; Solución de lavado: 0.1% p/v BSA en tampón fosfato 0.01 mol L⁻¹ (Na₂HPO₄), 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH: 7.4; Solución de tampón fosfato (PBS2): 0.1 mol L⁻¹ fosfato (Na₂HPO₄), 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH 7.4, Solución de la celda electroquímica: 1.8 mmol L⁻¹ de hidroquinona, 4.9 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en tampón fosfato (PBS2), a pH 7.4.

3.4. Construcción y caracterización de los electrodos magnéticos basados en compósitos de grafito-epoxi (m-GEC)

3.4.1. Diseño y construcción del cuerpo del magneto electrodo m-GEC

La construcción del cuerpo del magneto electrodo m-GEC consistió en la incorporación de una conexión metálica en el interior de un tubo de PVC de 22 mm de longitud (diámetro_{int} 6 mm, diámetro_{ext} 8 mm), dejando una cavidad virtual de 3 mm de profundidad en la cual se introducirá la pasta de grafito-epoxi junto con el disco de neodimio. Los pasos para lograr dicho objetivo consistieron en la soldadura en el extremo de un conector hembra de 2 mm de diámetro una lámina de cobre circular. Posteriormente, las láminas de cobre fueron pulidas para eliminar la capa de óxido que pudiese tener. Dicha capa, de no ser eliminada, podría aumentar la resistencia al paso de corriente y, por lo tanto, disminuir la sensibilidad del electrodo. Finalmente, se introdujo la conexión anterior dentro de un tubo cilíndrico de PVC, dejando una cavidad virtual de 3 mm de profundidad en la parte superior donde se introduce la pasta de carbono-epoxi y el imán.

En la figura 3 se muestran los materiales utilizados y el proceso de fabricación de los mismos.

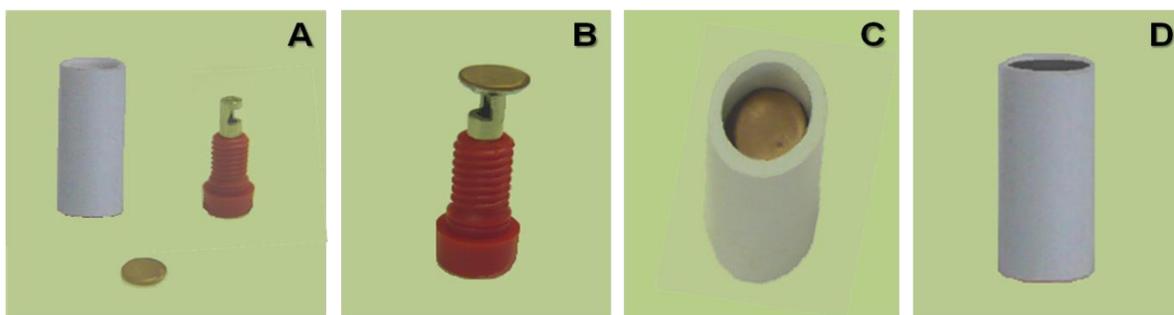


Figura 3. Etapas de construcción de los electrodos magnéticos. A) Materiales empleados: tubo cilíndrico de PVC, conector tipo hembra de 2 mm de diámetro, y disco de cobre, B) Soldadura del conector hembra y pulido de la lamina de cobre, C) Introducción de la conexión dentro del tubo de PVC, y D) Incorporación del imán y la pasta de carbono-epoxi en la cavidad virtual.

3.4.2. Preparación de electrodos magnéticos basados en un compósito de grafito-epoxi (m-GEC)

La pasta de compósito utilizada para la construcción de los electrodos consistió en una mezcla de polvo de grafito (fase conductora) con resina epoxi (fase aglutinante). Para ello, se mezcló manualmente una resina epoxi no-conductora con polvo de grafito (diámetro de partícula $< 50 \mu\text{m}$), en una relación 1:4 partes en peso (20% grafito, 80% resina). La resina epoxi está constituida por la resina propiamente dicha y el endurecedor, en una proporción de 20:3 partes en peso (87% de resina, 13% de endurecedor). Estos componentes fueron adecuadamente homogeneizados y, el material resultante junto con el disco de neodimio se incorporó en el cuerpo del transductor, con la ayuda de una espátula. Es importante depositar una fina capa de compósito sobre la placa de cobre para evitar que el imán entre en contacto con ésta. De producirse contacto, la conducción eléctrica podría verse perjudicada. Una vez cubierta todo el espacio virtual, los electrodos fueron curados durante 7 días a una temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$, obteniéndose un material rígido. Una vez cumplido este plazo, fueron pulidos siguiendo la secuencia: a) Papel de vidrio N° 180; b) Papel de vidrio N° 600; c) Papel de vidrio N° 1000; d) Papel de alumina de $3 \mu\text{m}$. De este modo, se obtienen unos electrodos con una superficie homogénea, reproducible y renovable repitiendo el mismo proceso de pulido ^[36].

3.4.3. Caracterización de los transductores electroquímicos basados en grafito-epoxi (m-GEC)

La operatividad y funcionalidad de los transductores desarrollados se caracterizó electroquímicamente, mediante voltamperometría cíclica, utilizando el sistema redox hidroquinona 1,4-dihidroxibenceno/benzoquinona. Este sistema fue seleccionado, ya que en los análisis amperométricos posteriores se utilizará hidroquinona como mediador electroquímico ^[37]. Las propiedades redox de esta sustancia son perfectamente conocidas sobre electrodos convencionales,

lo que permite su utilización como patrones electroquímicos al compararlas con las registradas con transductores diseñados en nuestro laboratorio.

La voltamperomería cíclica fue ensayada por la adición de una solución de hidroquinona 1.8 mmol L^{-1} a 20 mL de tampón PBS2. Los parámetros instrumentales de la técnica fueron los siguientes $E_{\text{inicial}} = -600 \text{ mV}$; $E_{\text{de cambio}} = 1000 \text{ mV}$; $E_{\text{final}} = 0 \text{ mV}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Mediante esta técnica se determinó el potencial a aplicar en los ensayos amperométricos y la reproducibilidad de construcción de los magneto electrodos.

3.5. Captura inmunomagnética de linfocitos T CD4⁺

La captura de los linfocitos T CD4⁺ de una muestra con partículas magnéticas fue realizada en la solución tampón fosfato PBS1. El protocolo ^[38] consiste en los siguientes pasos:

- 1) Se colocan 100 μL de una solución de partículas magnéticas modificadas con un anticuerpo anti-CD3 (antiCD3-MP) en un vial de plástico con fondo en U.
- 2) Se introducen los viales en el separador magnético de modo que las partículas magnéticas queden retenidas en la pared del tubo, y se elimina la solución.
- 3) Se agrega 100 μL una solución de linfocitos T CD4⁺ de la concentración deseada.
- 4) Se incuba el vial durante 30 minutos a 4-8 °C en agitación constante.
- 5) Se procede a realizar dos lavados. Para ello se añade 100 μL de solución de lavado, se mantiene la solución en agitación suave durante 2 minutos a temperatura ambiente y se elimina el sobrenadante mediante separación magnética.
- 6) Se resuspenden las partículas magnéticas modificadas con los linfocitos en 100 μL de solución tampón de trabajo.

3.6. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica

Con el objetivo de optimizar de captación de las células linfáticas sobre las partículas magnéticas, se estudió en primer lugar mediante microscopía óptica el efecto la relación de concentración de las partículas magnéticas (antiCD3-MP) y de linfocitos T CD4⁺ sobre la eficiencia de captación. Se obtuvieron imágenes por microscopía óptica de la captación de las células en función de concentraciones crecientes de partículas magnéticas, evaluada como la relación linfocitos T CD4⁺/partículas magnéticas (LT/MP).

En un vial de plástico con fondo en U se realizó la separación inmunomagnética siguiendo los pasos detallados en el punto 3.5. Las relaciones LT/MP estudiadas fueron 1/40, 1/8; 1/4 y 1/2, correspondiente a 10^5 linfocitos T CD4⁺ y $4 \cdot 10^6$, $8 \cdot 10^5$, $4 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ de partículas magnéticas (antiCD3-

MP), respectivamente. Una vez realizada la captación, se colocó un imán en la base de los viales para concentrar la muestra y se observó el concentrado mediante microscopía óptica a 40X.

Las imágenes por microscopía electrónica de barrido fueron realizadas en el Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona para verificar la captura inmunomagnética de linfocitos T CD4⁺ sobre las partículas magnéticas.

Las muestras fueron preparadas por duplicado empleando 10^5 células totales por filtro y $8 \cdot 10^5$ partículas magnéticas, siendo la relación LT/PM de 1/8. En el ANEXO 1 se detalla el protocolo completo utilizado para la preparación de las muestras ^[39].

3.7. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por citometría de flujo

Para el estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por citometría de flujo, se realizó la captación de los linfocitos T en partículas magnéticas según el procedimiento descrito en el punto 3.5 para la relación LT/MP de 1/2, 1/4 y 1/8 (10^5 MP totales con $2 \cdot 10^5$, $4 \cdot 10^5$ y $8 \cdot 10^5$ linfocitos T CD4⁺, respectivamente). Se analizaron los complejos formados entre los linfocitos T y las partículas magnéticas antes y después de los lavados. Todas las muestras fueron llevadas a un volumen final de 400 μ L y este volumen fue analizado mediante citometría de flujo. El tiempo de análisis de la muestra fue de 1 minuto, y los resultados se evaluaron mediante el análisis de las graficas de SSC vs FSC.

Además, se estudió la viabilidad de las células. Para ello se realizó una tinción con yoduro de propidio sobre las muestras de LT/MP antes y después de los lavados. El yoduro de propidio se usó para teñir las células muertas. Este colorante tiene la capacidad de entrar libremente a células que presentan la membrana celular comprometida e intercalarse entre las dobles hebras de DNA, pero no pueden atravesar la membrana de células intactas (células viables).

3.8. Ensayo magneto-ELISA para la determinación de linfocitos T CD4⁺

Los ensayos magneto-ELISA fueron realizados en placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano. A continuación se describen todos los pasos ^[40] realizados para la detección de linfocitos T CD4⁺ mediante esta técnica y que se muestran en detalle en la figura 4:

- *Captura inmunomagnética.* Se ha realizado tal como se describe en el punto 3.5. El rango de linfocitos T CD4⁺ evaluado estuvo comprendido entre 0 y 900 LT CD4⁺ μ L⁻¹ y todas las pruebas se realizaron por triplicado.
- *Marcación primaria.* Se adiciona 100 μ L de una solución de anticuerpo, antiCD4-biotina y se lo incubó durante 30 minutos en agitación continua a temperatura ambiente.
- *Lavados.* Se realizan tres lavados de 2 minutos con la solución de lavado.

- **Marcación secundaria.** Se adiciona 100 μL de una solución de conjugado enzimático, estreptAv-HRP y se lo incuba durante 30 minutos en agitación continua a temperatura ambiente.
 - **Lavados.** Se realizan tres lavados de 2 minutos con la solución de lavado.
 - **Desarrollo del color para la detección óptica.** Se adiciona 100 μL de una mezcla de sustratos enzimáticos para la HRP formada por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) en proporción 1/1. La incubación se realiza en la oscuridad, durante 30 minutos en agitación continua a temperatura ambiente.
 - **Detención de la reacción enzimática.** Se adiciona 100 μL de una solución de H_2SO_4 2 mol L^{-1} sobre la mezcla de reacción.
 - Los conjugados de partículas magnéticas y los linfocitos T son separadas mediante el uso del imán, y se transfieren 140 μL de la solución a una placa de lectura.
 - **Detección óptica.** Se realiza la medición de la absorbancia a 450 nm en un lector de de placa.
- En todos los casos, entre los procesos de incubación y los de lavado se procede a la separación de las partículas magnéticas mediante un imán posicionado debajo de la placa, durante 2 minutos.

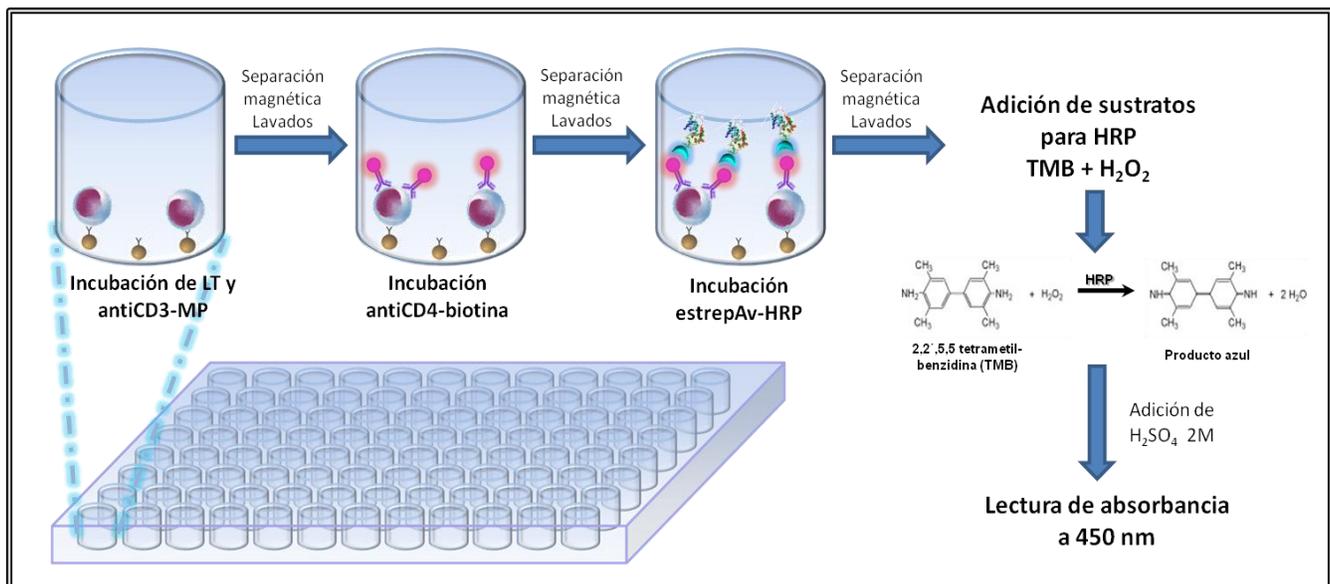


Figura 4. Esquema del procedimiento de detección de linfocitos T CD4^+ mediante magneto-ELISA con detección óptica.

Se han optimizado parámetros de los ensayo magneto-ELISA para la determinación de linfocitos T CD4^+ tales como la concentración de los marcadores y el bloqueo de las microplacas, tal como se explica a continuación.

3.8.1. Optimización de la concentración de anticuerpo antiCD4-biotina y del conjugado estrepAv-HRP

Se ensayaron diferentes concentraciones de anticuerpo antiCD4-biotina (9, 18, 27, 36, 45, 54 ng mL⁻¹), así como de estrepAv-HRP (0.25, 0.5, 1, 2 µg mL⁻¹), manteniendo constante la concentración de partículas magnéticas antiCD3-MP en 8.10⁶ MP mL⁻¹, así como la cantidad de linfocitos T CD4⁺ en 10⁶ linfocitos T CD4⁺ mL⁻¹. En el mismo ensayo, se realizaron los siguientes controles negativos: sin partículas magnéticas, sin linfocitos, y sin anticuerpo primario antiCD4-biotina. El objetivo de estos controles es evaluar la absorción inespecífica y la funcionalidad de los reactivos. Las concentraciones de ambos reactivos fueron optimizadas de manera de obtener una absorbancia lo suficientemente alta para garantizar la detección de niveles de células más bajos que los ensayados, pero no muy elevada como para caer en errores fotométricos. En todos los casos, se procesaron triplicados de cada uno de los ensayos.

3.8.2. Optimización del bloqueo de la superficie de las microplacas de poliestireno

Los inmunoensayos ELISA implican la inmovilización de biomoléculas, principalmente proteínas, al soporte sólido (microplaca de poliestireno) de forma pasiva o mediante interacciones covalentes. Una característica esencial de la superficie es su capacidad de interactuar con proteínas y otras biomoléculas. Sin embargo, la unión no específica de otras proteínas o biomoléculas a espacios no ocupados de la superficie durante el ensayo pueden perjudicar la especificidad y sensibilidad del ensayo [41]. Las uniones no específicas a la superficie puede ser minimizadas por la saturación de los sitios de unión no ocupados con un agente bloqueante. El agente bloqueante fue elegido de forma empírica, ya que no existe un procedimiento estandarizado adecuado para todas las aplicaciones. Se analizaron cuatro de ellos: BSA al 3%, Caseína al 2%, Tween-20 al 0.02% y una combinación de caseína al 2% con Tween-20 al 0.02%. Todos los bloqueantes fueron disueltos en buffer PBS.

El procedimiento de bloqueo consistió en colocar 200 µL del agente bloqueante en el pocillo e incubar *overnight* a 4 °C. Antes de comenzar con los ensayos, el agente bloqueante fue retirado por inversión de la placa.

3.9. Magneto biosensor electroquímico para la determinación de linfocitos T CD4⁺

La determinación de linfocitos T CD4⁺ mediante el magneto biosensor electroquímico, se esquematiza en la figura 5. Cada uno de los ensayos fue realizado en un tubo de poliestireno con fondo en U y las reacciones de captura, marcación primaria y secundaria se realizaron de la misma manera que en punto 3.5. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: [antiCD3-MP] = 8.10⁶ mL⁻¹, [antiCD4-biotina] = 60 ng mL⁻¹, y [estrepAv-HRP] = 50 µg mL⁻¹. Una vez realizados los lavados de

la marcación secundaria, las células unidas a las partículas, son resuspendidas en un volumen de 140 μL y son capturadas por el magneto electrodo m-GEC. Para ello se introduce el magneto electrodo m-GEC en posición invertida dentro de los tubos, de modo que las partículas magnéticas son atraídas por el imán que forma el electrodo. De este modo quedan retenidas sobre la superficie del electrodo (figura 5).

Una vez que la muestra se encontró inmovilizada sobre la superficie del magneto electrodo, se realizó la medida amperométrica a través de la determinación de la respuesta enzimática de la HRP aplicando un potencial de trabajo de -0.150 V . La señal se obtiene trabajando en agitación a una concentración de 4.9 mmol L^{-1} de sustrato enzimático (H_2O_2) y 1.8 mmol L^{-1} de hidroquinona (mediador), en la solución tampón PBS2 (figura 5). Esta señal analítica es proporcional a la actividad de la enzima ya que se trabaja en saturación de sustrato, y por tanto, se obtienen valores de intensidad máxima [42-44].

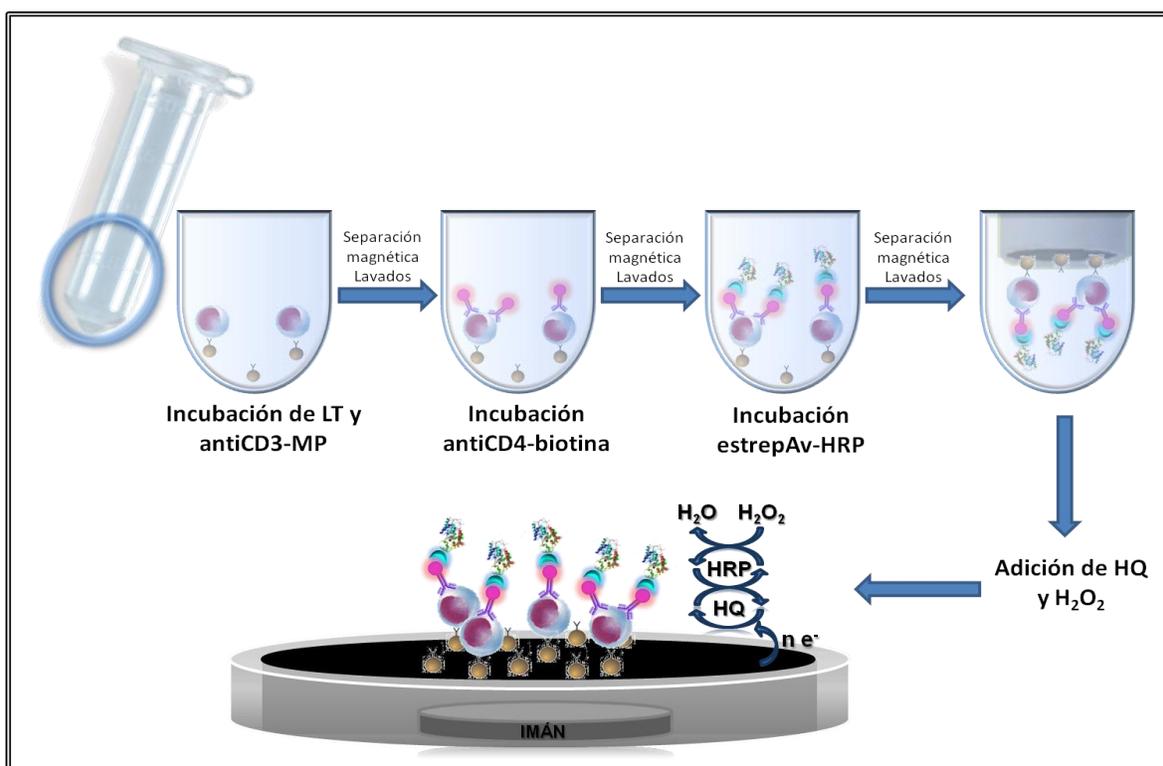


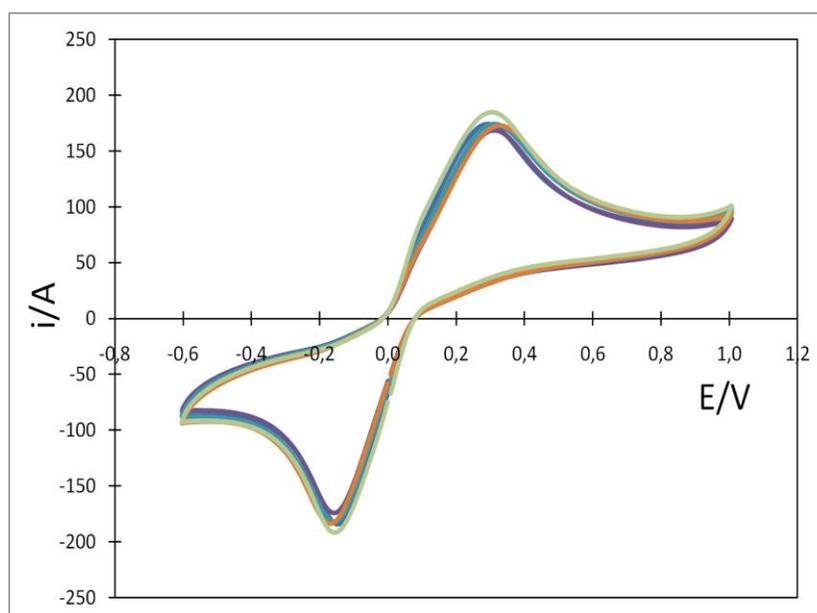
Figura 5. Esquema del procedimiento de detección de linfocitos T CD4⁺ mediante magneto electrodo con detección amperométrica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Construcción y caracterización de los electrodos magnéticos basados en compósitos grafito-epoxi (m-GEC)

La caracterización electroquímica de los transductores se realizó mediante el análisis de los voltamperogramas cíclicos obtenidos utilizando el sistema redox hidroquinona/benzoquinona (figura 6).

Con la información obtenida mediante los voltamperogramas se determinó el potencial de reducción de la benzoquinona que fue posteriormente utilizado para los biosensores electroquímicos en la determinación de los linfocitos T basados en el magneto electrodo m-GEC. El potencial de reducción medio de la benzoquinona fue de -0.14 V y el de oxidación de $+0.3$. El potencial elegido para las medidas amperométricas fue, por tanto, de -0.15 V.



Gráfica 6. Voltamperogramas cíclicos utilizando como electrodo de trabajo los electrodos magnéticos m-GEC, empleando una solución de hidroquinona 1.8 mmolL^{-1} en tampón PBS2.

Los resultados obtenidos mediante los voltamperogramas muestran una buena reproducibilidad en la construcción, de modo que es posible utilizar indistintamente cualquiera de estos electrodos m-GEC para hacer replicados.

Los resultados obtenidos de la caracterización demuestran que los magneto electrodos de grafito-epoxi presentan características electroquímicas apropiadas, constituyendo de tal manera magneto electrodos robustos para su posterior aplicación a técnicas amperométricas para la determinación, en este caso, del número de linfocitos T CD4^+ en muestras de sangre.

4.2. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por microscopía electrónica de barrido y óptica

La microscopía óptica fue utilizada para evaluar y caracterizar los complejos celulares de linfocitos T formados con las partículas magnéticas a diferentes relaciones de cantidades, mediante la captación inmunomagnética de linfocitos T ($CD4^+$) por las partículas magnéticas modificadas con anticuerpos específicos anti-CD3 (antiCD3-MP). La figura 7 muestra la efectividad de la captación de linfocitos T de las distintas relaciones LT/MP. En concreto las relaciones estudiadas fueron de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/40, y las imágenes fueron tomadas a una resolución de 40X.

En las imágenes se puede observar que a concentraciones bajas de partículas magnéticas, las células tienden a unirse, en su mayoría, en una relación LT/MP de 1/1, 1/2 y 1/3, mientras que a concentraciones más altas de partículas magnéticas, se favorece la formación de agregados, en donde las células son rodeadas casi completamente por las partículas magnéticas.

La captación de células es mayor a medida que se trabaja a concentraciones más elevadas de partículas magnéticas, observándose que algunas células no llegan a ser captadas cuando la relación LT/MP se acerca a 1/1.

En conclusión, cuánto mayor es la relación LT/MP, mayores serán los niveles de captación de linfocitos T.

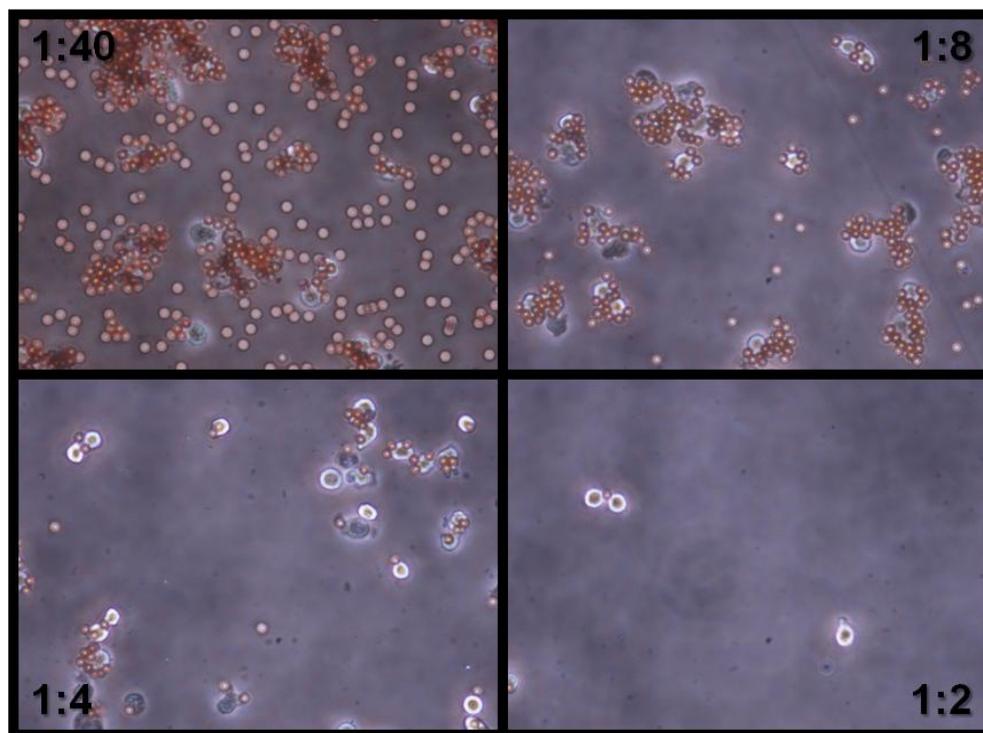


Figura 7. Imágenes de la inmunoseparación de linfocitos T mediante partículas magnéticas anti-CD3 a diferentes relaciones LT/MP, obtenidas por microscopía óptica a 40X.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) fue utilizada para caracterizar los complejos formados entre los linfocitos T y las partículas magnéticas durante la inmunoseparación magnética basada en la interacción inmunológica de los receptores CD3 de linfocitos T con anticuerpos específicos anti-CD3 de las partículas magnéticas, a una relación de LT/MP de 1/8, es decir, en presencia de exceso de partículas magnéticas.

La figura 8 muestra la efectividad de la captación en imágenes tomadas a resoluciones de 5, 10 y 15 μm . De las imágenes de las microfotografías electrónicas puede concluirse los tipos de agregados que se forman entre las partículas magnéticas, de un tamaño medio de 4.5 μm , y los linfocitos T, de un tamaño de 7-15 μm . Como puede observarse, los linfocitos T son captados por la interacción de al menos una partícula magnética a través de distintos puntos unión con la membrana celular, usándose por tanto más de un determinante antigénico de la superficie celular del linfocito.

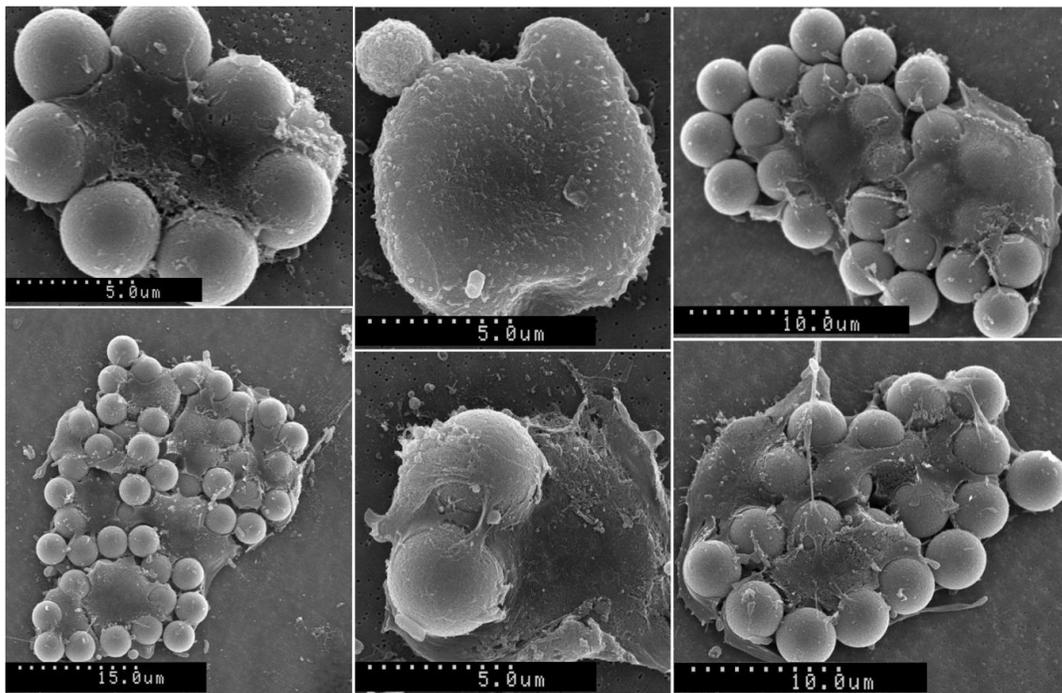


Figura 8. Imágenes de las partículas magnéticas unidas a células de linfocitos T CD4^+ obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Potencial de aceleración de 15KV y resolución de 5 μm , 10 μm , y 15 μm .

4.3. Estudio de la efectividad de la captura inmunomagnética por citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo permitieron evaluar distintos parámetros de captación de linfocitos T en función de las diferentes relaciones de concentración LT/MP, en concreto de 1/8, 1/4 y de 1/2.

La citometría permite diferenciar las distintas entidades formadas durante la inmunocaptura de las células con las partículas magnéticas. Las entidades que se pueden estudiar son las partículas

magnéticas y los linfocitos T no unidos, así como los complejos LT-MP. Cuando se utiliza el colorante adecuado se puede diferenciar, además, las células viables de las muertas. En la figura 9 se muestra un diagrama típico obtenido en los análisis por citometría. Para diferenciar las distintas entidades, al mismo tiempo se usó el marcador fluorescente ioduro de propidio para diferenciar células muertas de vivas.

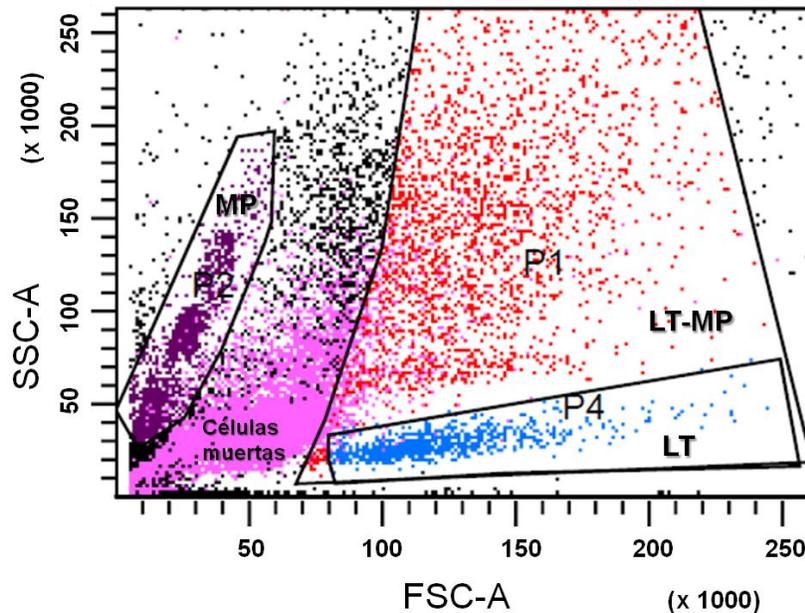


Figura 9. Gráfico de FSC (dispersión frontal de la luz) vs SSC (dispersión lateral de la luz) de un ensayo de inmunocaptación de $8 \cdot 10^5$ MP y 10^5 LT. En la figura se pueden identificar los distintos grupos de entidades que se sitúan en diferentes áreas debido a diferencias en tamaño. En este gráfico se señalan las siguientes entidades: partículas magnéticas, linfocitos T viables y muertos, y complejos LT-MP, discriminados según su tamaño y complejidad.

4.3.1. Eficiencia de captación de los linfocitos T

Este parámetro fue estimado mediante el cálculo del porcentaje de unión. Para ello se comparó la cantidad de células contadas por minuto de una solución estándar de 10^5 células de LT respecto al número de células individuales que aparecen en la solución una vez realizada la captación. Este valor representa el porcentaje (%) de células que no fueron captadas, por tanto,

$$\begin{aligned} \text{\% de captación} &= 100 - \text{\% células no captadas} \\ &= 100\% - \frac{(\text{número de LT libres}) \times 100\%}{\text{Número de LT totales}} \end{aligned}$$

En la figura 10 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las relaciones LT/MP. Como puede observarse, a medida que se incrementa el exceso de partículas magnéticas respecto al número de linfocitos T, el porcentaje de captación aumenta.

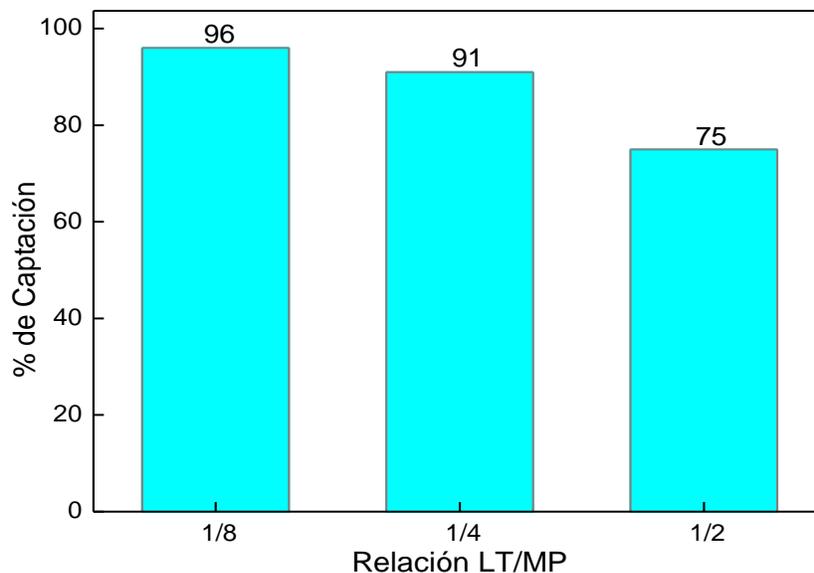


Figura 10. Porcentaje de captación de linfocitos T en función de tres proporciones distintas de LT/MP: 1/8, 1/4 y 1/2.

Cabe aclarar que el objetivo de este trabajo es la detección de linfocitos T a niveles de concentración bajos debido a la inmunodeficiencia. Por lo tanto, la elección de una relación de LT/MP que produzca un % de captación elevado garantiza que la variación en el porcentaje de captación en función de la concentración de células sea el menor posible. Por esto, la relación LT/MP utilizada en los ensayos magneto-ELISA y en los biosensores electroquímicos basados en magneto electrodos fue de 1/8 o superior.

Debido a que el porcentaje de captación de linfocitos logrado con la relación 1/2 de LT/MP es inadecuado, esta proporción fue desestimada para los ensayos posteriores.

4.3.2. Estudio de la viabilidad de los linfocitos T

Para caracterizar si los linfocitos captados o libres son células viables o muertas, se adicionó luego del proceso de inmunocaptación magnética yoduro de propidio, el cual se incorpora en las células muertas emitiendo fluorescencia. El porcentaje de mortandad fue calculado como,

$$\% \text{ de mortandad} = \frac{\text{Número de LT muertos} \times 100\%}{\text{Número de LT totales}}$$

El cálculo de la mortandad se realizó sobre dos tipos de soluciones, la primera consistía en una solución de linfocitos T CD4⁺ incubados con partículas magnéticas, mientras que la segunda consistía en una solución de linfocitos T CD4⁺ incubados con partículas magnéticas a la que se le realizaron tres lavados con tampón de lavado para eliminar los linfocitos no captados de forma efectiva. La figura 11 muestra los resultados obtenidos para cada una de las proporciones LT/MP.

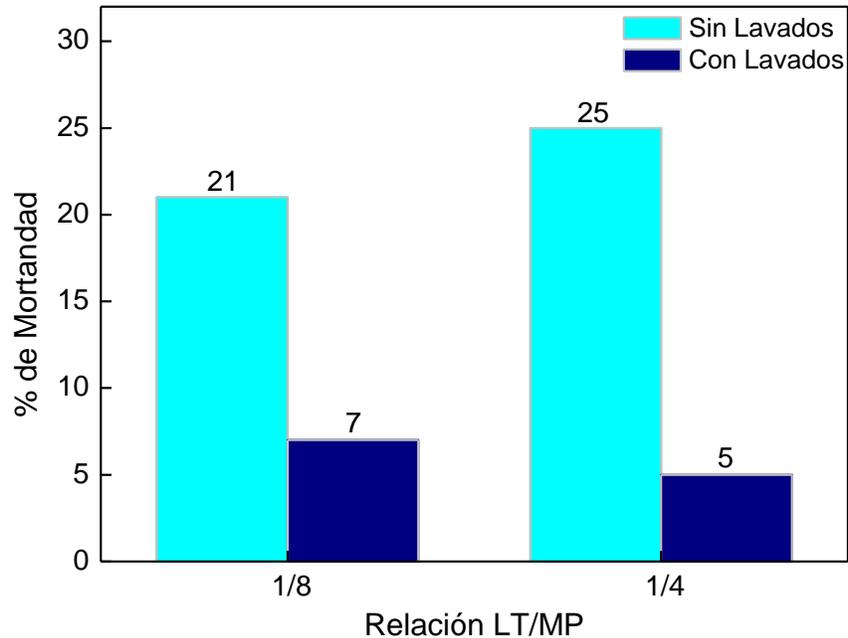


Figura 11. Porcentaje de mortandad de linfocitos T durante el proceso de captación para las proporciones LT/MP de 1/8 y 1/4.

Los resultados muestran que entre un 20 y un 30% de los linfocitos T utilizados en la captura inmunomagnética mueren durante el proceso de captación. Sin embargo, la mayor parte de estas células no viables son removidas durante el proceso de lavado. En conclusión, se podría suponer que las células muertas son eliminadas a través de los distintos pasos de lavados y que el método desarrollado principalmente detecta células viables.

4.3.3. Estudio de la liberación de linfocitos del complejo LT-MP durante el procedimiento de lavado

Teniendo en cuenta la consideración que los lavados son eficientes y suficientes (esto es, que con ellos se logra eliminar todas aquellas células que no interaccionaron con las partículas), las células libres que aparecen en los análisis de citometría luego de los lavados, corresponden a células que se desprendieron de las partículas que las habían captado. Por lo tanto, se puede estimar el % de liberación de la siguiente manera:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{\text{Número de LT libres}}{\text{Número de LT totales}} \times 100 \%$$

LT/MP	% Liberación
1/8	1.3 %
1/4	0.3 %

Los linfocitos que se separan de las partículas magnéticas son eliminados en los lavados posteriores, lo cual implica una merma de los mismos. Sin embargo, como puede observarse en la tabla anterior, el porcentaje de liberación ronda el 1% y por lo tanto, puede considerarse que la liberación de linfocitos durante los lavados tienen un efecto insignificante sobre el ensayo.

4.4. Ensayo magneto-ELISA para la determinación de linfocitos T CD4⁺

4.4.1. Optimización de la concentración de anticuerpo antiCD4-biotina y del conjugado estrepAv-HRP

La figura 12 muestra la optimización de las concentraciones de anticuerpo antiCD4-biotina y del conjugado enzimático estrepAv-HRP a ser utilizadas en el ensayo magneto-ELISA con detección óptica. Como puede observarse, todas las curvas presentan una forma hiperbólica, típica de un sistema de saturación. A concentraciones mayores de 36 ng/mL de anticuerpo antiCD4-biotina, los receptores de CD4 presentes en los linfocitos se encuentran saturados. La cantidad de este reactivo es tan elevada que es suficiente para interaccionar con todos los receptores de membrana presentes. Este valor de concentración fue elegido como el óptimo para dicho reactivo.

En el caso de la marcación secundaria con el conjugado enzimático estrepAv-HRP, se observa un aumento de la señal óptica a medida que aumenta la concentración del reactivo. Como se mencionó anteriormente, el valor óptimo es aquel que permite obtener una absorbancia lo suficientemente alta para garantizar la detección de niveles de células más bajos que los ensayados, pero no muy elevada como para producir errores fotométricos. Cumpliendo con el requisito anterior, el valor óptimo elegido fue de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de conjugado enzimático estrepAv-HRP.

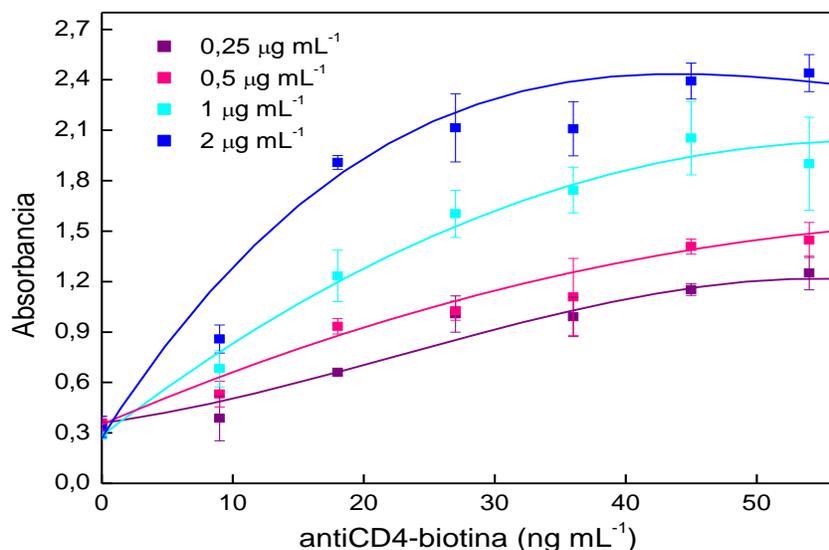


Figura 12. Optimización de la marcación primaria (antiCD4-biotina) y secundaria (estrepAv-HRP). $[\text{antiCD3-MP}] = 8 \cdot 10^6 \text{ MP mL}^{-1}$, $[\text{LT CD4}^+] = 10^6 \text{ mL}^{-1}$, $n=3$.

4.4.2. Optimización del bloqueo de la superficie de las microplacas de poliestireno

La elección del agente bloqueante de la microplaca de poliestireno se evaluó de dos maneras. En un primer lugar se realizaron ensayos con controles negativos, es decir, ensayos en los cuales no se adicionaron los linfocitos T. En la figura 13 se presentan los resultados obtenidos con los diferentes agentes bloqueantes ensayados, en concreto BSA 3%, caseína 2%, Tween-20 0.02%, y caseína 2% + Tween-20 0.02%, y se puede observar que todos ellos son efectivos en la disminución de la adsorción no específica sobre la microplaca. Si bien la media no es igual en todos los casos, no existen diferencias significativas en la adsorción no específica para justificar la elección de un agente sobre otro.

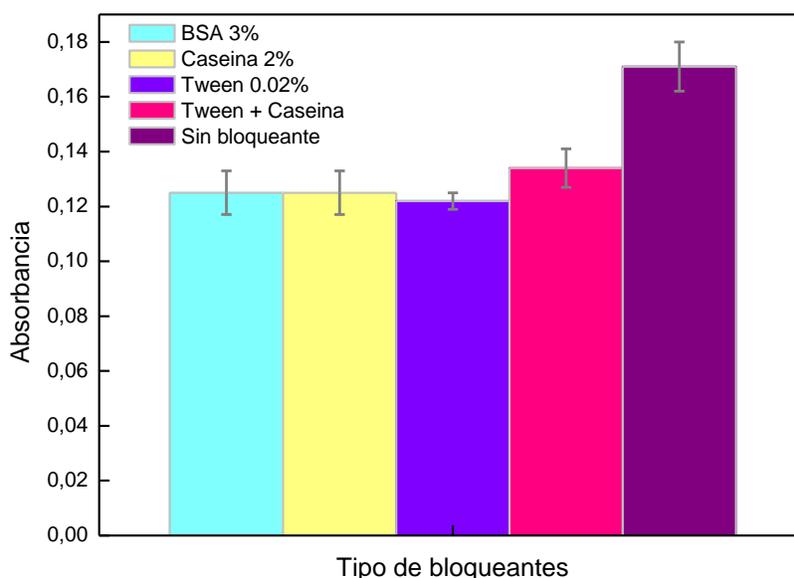


Figura 13. Comparación de diferentes agentes bloqueantes: BSA al 3%, caseína al 2%, Tween-20 al 0.02%, y caseína al 2% + Tween-20 al 0.02%. [antiCD3-MP] = $8 \cdot 10^6$ MP mL⁻¹, [LT CD4⁺] = 10^6 mL⁻¹, [antiCD4-biotina] = 36 ng mL⁻¹, [estrepAv-HRP] = 1 µg mL⁻¹, n= 3.

Además de los controles negativos, se realizó una curva con distintas concentraciones de linfocitos T CD4⁺ para elegir aquel que otorgue mayor sensibilidad. En la figura 14 se muestran la respuesta obtenida con cada uno de ellos. Así, la solución tampón con 2% de caseína y 0.02% de Tween-20 resultan la más adecuada.

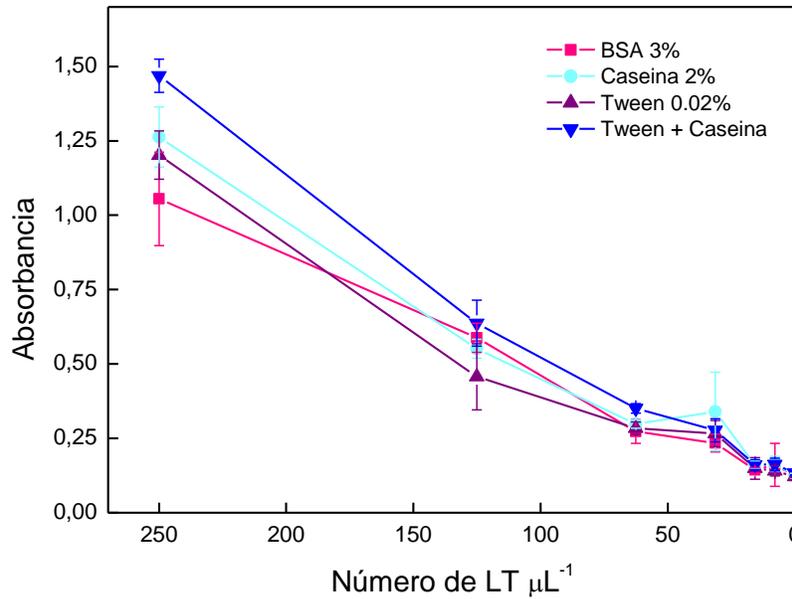


Figura 14. Efecto de diferentes agentes bloqueantes sobre la sensibilidad del sistema de detección: BSA al 3%, caseína al 2%, Tween-20 al 0.02%, y caseína al 2% + Tween-20 al 0.02%. [antiCD3-MP] = $8 \cdot 10^6$ MP mL⁻¹, [LT CD4⁺] = 10^6 mL⁻¹, [antiCD4-biotina] = 36 ng mL⁻¹, [estrepAv-HRP] = 1 μg mL⁻¹, n=3.

4.4.3 Detección de linfocitos T CD4⁺ mediante un ensayo magneto-ELISA

Se realizaron ensayos magneto-ELISA con detección óptica a diferentes concentraciones de linfocitos T, manteniendo constante la concentración de partículas magnéticas antiCD3-MP, de anticuerpo antiCD4-biotina y conjugado enzimático estrepAv-HRP, y los resultados se muestran en la figura 15.

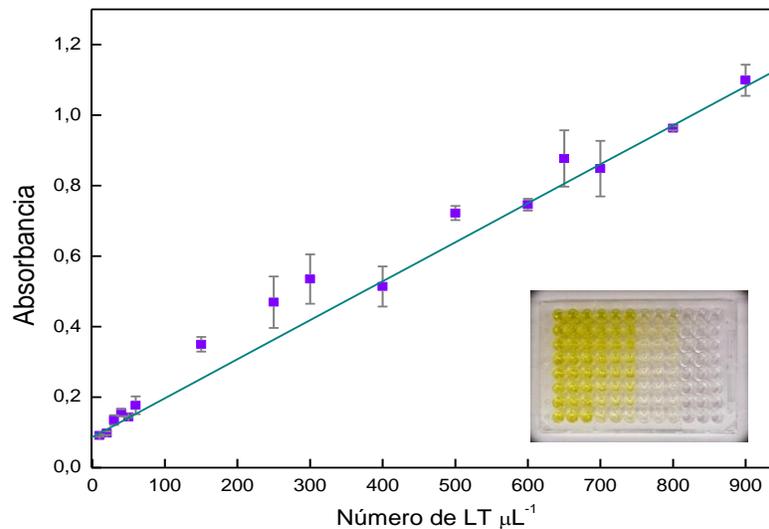


Figura 15. Detección de linfocitos T CD4⁺ empleando un ensayo magneto-ELISA. [antiCD3-MP] = $8 \cdot 10^6$ MP mL⁻¹, [LT CD4⁺] = 10^6 mL⁻¹, [antiCD4-biotina] = 36 ng mL⁻¹, [estrepAv-HRP] = 1 μg mL⁻¹, n=3.

Tal como puede observarse, el método es capaz de discriminar diferentes concentraciones de linfocitos T CD4⁺ (dentro del rango de interés médico) presentes en una muestra y por lo tanto, resulta adecuado para el diagnóstico y seguimiento de infecciones por VIH e inmunodeficiencias.

Los resultados demuestran que existe una correlación lineal ($R^2 = 0.9867$) para el rango de linfocitos T CD4⁺ relevantes utilizadas en el diagnóstico de VIH (en el intervalo de 0 a 500 LT CD4⁺ μL^{-1} sangre).

4.5. Magneto biosensor electroquímico para la determinación de linfocitos T CD4⁺

El sistema biosensor electroquímico que se muestra esquemáticamente en la figura 5, se basa en la captura inmunomagnética de linfocitos T CD3⁺ y en la detección amperométrica de linfocitos T CD4⁺ mediante el uso de magneto electrodos, y fue evaluada en el valor umbral para recibir o no tratamiento antiviral de 200 LT CD4⁺ μL^{-1} sangre.

La figura 16 muestra la potencial capacidad de discriminación que presenta el método desarrollado para determinar cuándo una persona infectada con el VIH debería comenzar con tratamiento antiviral. Ambos ensayos fueron realizados por triplicado.

Si bien no se ha llegado a evaluar la respuesta del magneto biosensor electroquímico frente a muestras que contienen diferentes concentraciones de células, estos resultados resultan muy prometedores para los objetivos planteados.

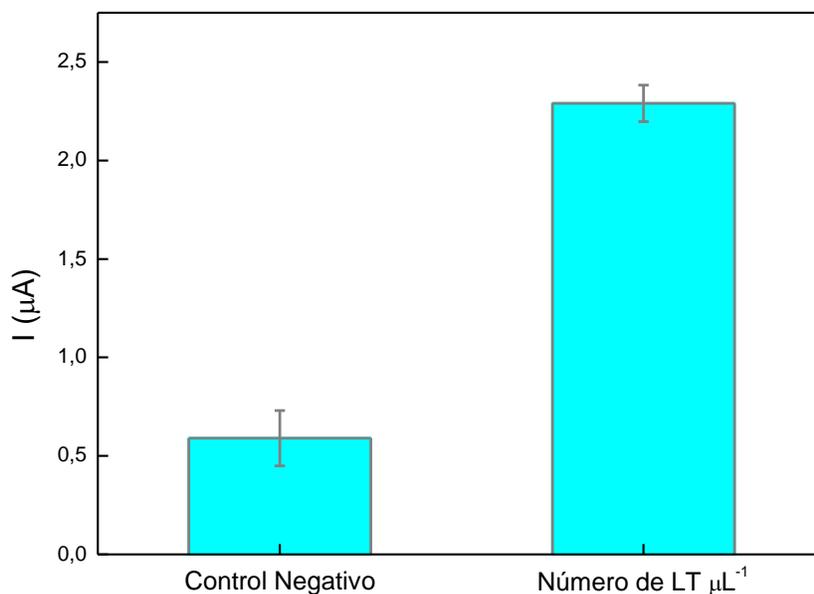


Figura 16. Magneto biosensor electroquímico para el recuento de linfocitos T CD4⁺ basados en magneto electrodos m-GEC. [antiCD3-MP] = 8.10^6 mL^{-1} , [antiCD4-biotina] = 60 ng mL^{-1} , y [estrepAv-HRP] = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=3.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación, que consta del diseño de una nueva estrategia de detección de linfocitos T CD4⁺ basado en la captura inmunomagnética de estas células mediante partículas magnéticas modificadas con anticuerpos específicos y la posterior determinación óptica u electroquímica, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El comportamiento electroquímico de los magneto electrodos m-GEC (basados en compósitos grafito-epoxi) muestra una buena reproducibilidad entre magneto electrodos de un mismo lote, preparados en las mismas condiciones.

- El potencial de trabajo a utilizar en las medidas amperométricas cuando se utilice como mediador el sistema hidroquinona/benzoquinona, determinado por voltamperometría cíclica, es -0.15 V.

- La captura inmumagnética de linfocitos T CD4⁺ mediante partículas magnéticas modificadas con anticuerpos específicos es efectiva (% de captación superior al 96%) y ha sido demostrado mediante imágenes de microscopía óptica, SEM y por citometría de flujo.

- La proporción LT/MP debe ser igual o superior a 1/8 para conseguir una alta proporción de captura de linfocitos T

- El método magneto-ELISA desarrollado resulta útil para el diagnóstico y seguimiento de infecciones por VIH ya que es capaz de discriminar diferentes concentraciones de linfocitos T CD4⁺ dentro del rango de interés médico.

- Resultados preliminares mediante el magneto biosensor electroquímico presenta una capacidad potencial de detección de linfocitos T CD4⁺ de forma descentralizada y utilizando instrumental sencillo y portátil

- Se ha conseguido desarrollar un método de detección de linfocitos T CD4⁺ que requiere un tiempo de análisis corto y considerablemente más económico respecto a otros métodos clásicos de recuento de linfocitos T CD4⁺.

En términos generales, se puede concluir que la metodología desarrollada con detección electroquímica pueden considerarse herramienta ideal para formar parte de los programas de prevención y diagnóstico, ya que pueden ser útiles para el seguimiento de pacientes con SIDA y el diagnóstico de terapia antirretroviral de manera rápida, y económica en entornos de escasos recursos económicos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

En el presente trabajo, se muestran resultados preliminares para el recuento rápido y económico de linfocitos T CD4⁺ para su uso en el diagnóstico de inmunodeficiencia y de SIDA.

En el caso de los ensayos magneto-ELISA, el trabajo futuro se dirigirá a la optimización del método y tendrá como objetivo prioritario la realización de ensayos de detección sobre muestras reales (de sangre) y la evaluación del efecto matriz a través de estudios de recuperación. El objetivo final es la validación del método magneto-ELISA mediante la confrontación de datos obtenidos con citometría de flujo (método estándar).

En el caso del magneto biosensor electroquímico, la línea de investigación futura está orientada a la optimización de dicha estrategia, ya sea a través de la evaluación de los reactivos empleados en la captación, en la marcación primaria y en la secundaria, así como también del transductor utilizado, la determinación de la capacidad de detección de linfocitos T CD4⁺ en muestras reales, y su validación con citometría de flujo.

La utilización de otro tipo de electrodos como ser los serigrafiados, o la preparación de materiales transductores de características electroquímicas mejoradas con la inclusión de nanomateriales, así como la explotación de nuevos nanomarcadores metálicos para la detección electroquímica del evento biológico son también perspectivas futuras interesantes para el ámbito de la detección de linfocitos T en sangre mediante los magneto electrodos.

Se propone, además, la comparación de los dos métodos desarrollados para seleccionar aquel que presente las características más idóneas para ser utilizado como método *screening* en países con alto índice de pacientes VIH positivos y de bajos recursos económicos. En ambos casos se propone la determinación de los valores de corte en muestras negativas, y la evaluación de su potencial aplicación como método *screening* en pacientes VIH positivos a través de la determinación de los valores falsos positivos y negativos que arroja el método.

Por último se propone el diseño de un kit diagnóstico para la detección de linfocitos T que otorgue la posibilidad de ser realizado en cualquier lugar, con un mínimo requerimiento de equipo de laboratorio y con personal técnico con poca experiencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 WHO/UNAIDS/UNICEF. *Epidemiological Fact Sheet on HIV and AIDS. Core data on epidemiology and response*. Spain, 2008 Update.
- 2 WHO/UNAIDS/UNICEF. *Towards universal access: Scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector*. Progress report 2010.
- 3 Organización Panamericana de la Salud (PAHO). *Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH en adultos y adolescentes en latinoamérica y el Caribe: en la ruta hacia el acceso universal. Recomendaciones para un enfoque de salud pública*. PAHO, 2008.
- 4 A. Pascual, J. L. Corral, *La Infección por el VIH. Guía Práctica*. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2º Edición. 2003. Capítulo 1.
- 5 T. E. Mertens, D. Low-Beer, *Pan Am J Public Health*. **1997**, 1,220-228.
- 6 P. Rivas, Á. Holguín, E. Ramírez de Arellano, C. Muñoz-Almagro, Rafael Delgado, R. Ortiz de Lejarazu, V. Soriano. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. **2006**, 24, 29-33.
- 7 J. P. Llaño, B.V. Bestard, P. García López. *La Infección por el VIH. Guía Práctica*. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2º Edición. 2003. Capítulo 3.
- 8 American Cancer Society. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002296-pdf.pdf> . Ultima consulta: 3/7/2011.
- 9 Center for Disease Control and Prevention (CDC). *1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults*. MMWR. 1992, 41 (RR-17).
- 10 M. R. Iglesias, A. Terrón Pernia, *La Infección por el VIH. Guía Práctica*. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2º Edición. 2003. Capítulo 6.
- 11 J. C. López-Bernaldo de Quirós, R. Delgado, F. García, J. M. Eiros, R. Ortiz de Lejarazu. *EIMC*. **2007**, 25, 632-638.
- 12 Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*. Department of Health and Human Services. 2011, 1–166. <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Ultima consulta 24/08/2011.
- 13 HRSA HIV/AIDS Bureau. CD4 and Viral Load Monitoring. Guide for HIV/AIDS Clinical Care. 2011. http://www.aidsetc.org/aidsetc?page=cg-206_cd4_monitoring. Ultima consulta: 29/08/2011.
- 14 WHO/UNAIDS. *CD4⁺ T-Cell Enumeration Technologies. Technical Information*. 2007. http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/cd4_is_draft.pdf. Ultima consulta: 29/08/2011
- 15 K. Pattanapanyasat, K. Sukapirom, L. Kowawisatsut, C. Thepthai, *Cytometry B Clin Cytom*. **2008**, 74, S98-106.
- 16 M. Fryland, P. Chaillet, L. Bonte, A. Barnaba, R. Teck, D. Odiambo, R. Zachariah, 15th International Conference on AIDS: Bangkok, 2004; abstract no. TuOrB1149.
- 17 P. Balakrishnan, S. Solomon, J. Mohanakrishnan, A. J. Cecelia, N. Kumarasamy, K. G. Murugavel, B. Venkatakrishnan, S. S. Solomon, S. M. Crowe, A.K. Ganesh, S. P. Thyagarajan, T. Flanigan, K.H. Mayer, *J Acquir Immune Defic Syndr*. **2006**, 43, 23-26.
- 18 I. Jani, N. Siteo, J. Quevedo, J. Lehe, T. Peter. Sixth International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention: Rome, 2011; abstract MOAD0101.
- 19 B. Larson, K. Bistline, B. Ndibongo, T. Xulu, A. Brennan, L. Long, S. Rosen, M. Fox. Sixth International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention: Rome, 2011; abstract MOAD0103.
- 20 P. Balakrishnan, M. Dunne, N. Kumarasamy, S. Crowe, G. Subbulakshmi, A. K. Ganesh, A. J. Cecelia, P.

- Roth, K. H. Mayer, MD, S. P. Thyagarajan, S. Solomon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, 36, 1006-1010.
- 21 S. Thorslund, R. Larsson, F. Nikolajeff, J. Bergquist, J. Sanchez. *Sens. Actuator B.* **2007**, 123, 847–855.
- 22 G. Stybayeva, M. Kairova, E. Ramanculov, A. L. Simonian, A. Revzin. *Colloids Surf. B.* **2010**, 80, 251–255.
- 23 X. Jiang, M. G. Spencer. *Biosens Bioelectron.* **2010**, 25, 1622-8.
- 24 X. Cheng, Y. S. Liu, D. Irimia, U. Demirci, L. Yang, L. Zamir, W. R. Rodríguez, M. Toner, R. Bashir. *Lab Chip.* **2007**, 7, 746-55.
- 25 N. N. Mishra, S. Retterer, T. J. Zieziulewicz, M. Isaacson, D. Szarowski, D. E. Mousseau, D. A. Lawrence, J. N. Turner. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 696–704.
- 26 W. R. Rodriguez, N. Christodoulides, P. N. Floriano, S. Graham, S. Mohanty, M. Dixon, M. Hsiang, T. Peter, S. Zavahir, I. Thior, D. Romanovicz, B. Bernard, A. P. Goodey, B. D. Walker, J. T. McDevitt. *Plos Med.* **2005**, 2, 663–672.
- 27 L. Ristic, *Sensor technology and devices*, Artech House. 1° edición. 1994.
- 28 F. Céspedes, S. Alegret. *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 276-285.
- 29 J. M. Cooper, A.E.G. Cass. *Biosensors*, Oxford University. 2° edición. 2006.
- 30 J. Wang. *Analytical electrochemistry*. Wiley -VCH Editorial. 3° edición. 2006.
- 31 D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson. *Biosen. Bioelectron.* **2001**, 16, 121-131.
- 32 G. A. Mabbott. *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 697-701.
- 33 F. Céspedes, E. Martínez Fàbregas, S. Alegret. *Trends Anal. Chem.* **1996**, 15, 296-304.
- 34 M. I. Pividori, S. Alegret. *Anal. Lett.* **2005**, 38, 2541-2565.
- 35 E. Zacco, M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, and M.-P. Marco. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1789-1788.
- 36 M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret. *Analyst.* **2001**, 126, 1551-1557.
- 37 P. C. Pandey, S. Upadhyay, B. Upadhyay. *Anal. Biochem.* **1997**, 252, 136-142.
- 38 S. Liébana, A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M. I. Pividori. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5812–5820.
- 39 S. Prasad, V. Cody, J. K. Saucier-Sawyer, W. Mark Saltzman, C. T. Sasaki, R. L. Edelson, M. A. Birchall, D. J. Hanlon. *Nanomedicine: NBM.* **2011**, 7, 1–10.
- 40 M. de Souza Castilho, T. Laube, H. Yamanaka, S. Alegret, M. I. Pividori. *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 5570–5577.
- 41 Gibbs J: *Effective blocking procedures*. ELISA Technical Bulletin No. 3, Corning Costar Corp., 2001.
- 42 T. Laube, S. V. kergaravat, S. N. Fabiano, S. R. Hernández, M. I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 27, 46-52.
- 43 S. Liébana, A. Lermo, S. Campoy, M. P. Cortés, S. Alegret, M. I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 510-513.
- 44 E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M. I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2184-2191.

Tratamiento de muestras biológicas para obtención de imágenes por SEM

Los pasos realizados sobre cada una de las muestras, luego de la captación de las células, se describen a continuación:

1. Filtración con jeringa en filtros *Nucleopore* (tamaño de poro 0.2 μm). Las células captadas por las partículas magnéticas son resuspendidas en 5 mL de agua milli-Q para que la distribución sobre el filtro sea homogénea.

2. Fijación de la muestra. Los filtros son sumergidos en placas que contienen 3 mL de una solución de glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato (0.1 M, pH 7.4) y se mantienen a la temperatura de 4 °C durante 2 horas.

3. Lavados. Se realizan 4 lavados con tampón fosfato, con cambios de 10 minutos.

4. Post-fijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.4). El filtro con la muestra es sumergido en la solución de OsO_4 a 4°C durante 2 horas.

5. Lavados. Se realizan 4 lavados con tampón fosfato, con cambios de 10 minutos.

6. Deshidratación con etanol. Las muestras son deshidratadas en gradiente de etanol según las siguientes condiciones:

- Etanol al 30 % durante 15 minutos.

- Etanol al 50 % durante 30 minutos.

- Acetato de uranilo al 2 % disuelto en etanol al 70 %, durante 12 horas a 4 °C. Para ello se disolvió el acetato de uranilo en 30 mL de agua y a continuación se añadió a 70 mL de etanol.

- Etanol al 90 % durante 30 minutos.

- Etanol al 100 % durante 30 minutos, dos veces.

7. Eliminación de restos de etanol mediante desecador para punto crítico, con CO_2 líquido.

8. Acoplamiento de las muestras al soporte circular donde se realiza la toma de imágenes.

9. Metalizado con oro para favorecer la conductividad eléctrica y la emisión de electrones (actúa como "tinte" para la microscopía electrónica).