



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MICRODISPOSITIVOS  
PARA DIAGNÓSTICO CLÍNICO

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. KENIA CHÁVEZ RAMOS

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, AGOSTO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook
VOCAL	Dra. Ana Lilia Ocampo Flores
VOCAL	Dr. Jannu Ricardo Casanova Moreno
VOCAL	Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille
SECRETARIO	Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén

---

## LUGARES DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO EXPERIMENTAL

- ♦ Laboratorio 228 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F2 perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. María del Pilar Cañizares Macías.
- ♦ Laboratorio 324 “Microfluídica” y 326 “Bio-fisicoquímica” del edificio F2 perteneciente al Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Luis Fernando Olguín Contreras.
- ♦ Laboratorio MC325 “Química Bioanalítica” del edificio de Ingeniería de Materiales y Química perteneciente al Departamento de Biotecnología y Química Macromolecular de la Facultad de Ingeniería, Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón, bajo la asesoría del Dr. Manabu Tokeshi y el apoyo del estudiante de doctorado Keine Nishiyama.

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

- ♦ Chávez-Ramos, K. and Cañizares-Macías, M. del P. Microdevice based on centrifugal effect and bifurcation law for separation of plasma from on-line diluted whole blood. *Anal. Bioanal. Chem.* doi: 10.1007/s00216-021-03512-3 (2021).
- ♦ Chávez-Ramos, K. and Cañizares-Macías, M. del P. Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection. *Talanta* **224**, 121801 (2021).
- ♦ Chávez-Ramos K.; Nishiyama K.; Maeki M.; Ishida A.; Tani H.; Kasama T.; Baba Y. and Tokeshi M. Rapid, sensitive and selective detection of H5 Hemmagglutinin from avian influenza virus using an Immunowall device. *ACS Omega* **4**, 1683-1688 (2019).

## CONGRESOS

- ♦ **Microfluidics 2021 Global Analysis of Microfluidic: Trends and Techniques**  
Webinar 19 de Agosto de 2021  
Título: *Microdevice based on centrifugal effect and bifurcation law for separation of plasma from on-line diluted whole blood*  
Modalidad: Oral
- ♦ **International Conference on Microfluidics & Bio-MEMS 2020**  
Webinar 19 de octubre de 2020  
Título: *Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection*  
Modalidad: Oral
- ♦ **The 10th Chemical Science and Engineering-Ambitious Leader’s Program International Summer School**  
Sapporo, Japón, 13 de Julio de 2019  
Título: *Immunowall device: highly sensitive detection for clinical diagnosis*  
Modalidad: Póster

*Con mucho amor y cariño, los esfuerzos y el producto de esta tesis se los dedico:*

*A mi abuelito **Efrén Ramos Colín**, el ángel que me guía y cuida desde el cielo*

*A mi abuelita **Ana María Concepción Figueroa Rivera***

*A mi mamá **Luz Lorena Ramos Figueroa***

*A mi hermano **Ricardo Chávez Ramos***

*A mi esposo **Víctor García García***

*A **Simba**, quien estuvo acompañándome durante cada palabra escrita*

*“Science, my boy, is made up of mistakes, but they are mistakes which  
it is useful to make, because they lead little by little to the truth.”*

*- Jules Verne*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado (No. de becario 576703, CVU 662463). Así como a la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (Apoyo PAPIIT IT200718: Desarrollo de microdispositivos biológicos) y a la Facultad de Química de Universidad Nacional Autónoma de México (Apoyo No. 5000-9029).

Un especial agradecimiento al Patronato de la Facultad de Química de la UNAM y a la empresa Agilent Technologies por la beca otorgada “Q. Oscar Salvador Yáñez” para la realización de mi estancia de investigación en el laboratorio de Química Bioanalítica de la Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón.

A mi asesora, la Dra. María del Pilar Cañizares Macías, por poner en mí su confianza para el desarrollo de esta tesis, muchas gracias por sus consejos, pláticas, paciencia, amistad brindada y su apoyo incondicional durante todo este tiempo. De verdad que es un placer el poder trabajar con usted.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, gracias por sus consejos para la mejora de este trabajo y las facilidades para la construcción y caracterización de los microdispositivos. Al Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille, por siempre confiar en mi forma de trabajo y avances experimentales y por sus invaluable consejos.

A mi jurado asignado, la Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook, la Dra. Ana Lilia Ocampo Flores, el Dr. Jannu Ricardo Casanova Moreno, el Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille y el Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén, gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, y por sus observaciones y sugerencias tan atinadas para su mejora.

Muchas gracias al Dr. Manabu Tokeshi, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ayudarme en todos los trámites necesarios para instalarme en la bella Ciudad de Sapporo; así como a los Drs. Hirofumi Tani, Akihiko Ishida, y Masatoshi Maeki por hacerme sentir como en casa durante mi estadía en la Universidad de Hokkaido. Al estudiante de doctorado Keine Nishiyama, por ser el primero en recibirme, su apoyo, ideas, paciencia, tiempo y por todos los conocimientos transmitidos durante el tiempo que trabajamos juntos. A Ayano Nakamura y Yuta Fujii por la excelente compañía y amistad brindada. A Donny Nugraha, Yuri Moratelli y Yi Bao, por su apoyo, no sólo dentro del laboratorio, sino fuera de él, extraño ir a cenar con ustedes después de terminar el trabajo y sus pláticas tan graciosas. Seguro nos volveremos a ver.

Al Dr. José Pedraza Chaverri y al M. en C. Omar Medina Campos, por las facilidades brindadas para la medición de los ensayos realizados en microplaca.

Gracias al I.Q Iván Puente Lee, por su ayuda para la adquisición e interpretación de imágenes TEM en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII).

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros del laboratorio 228, en especial a Willmann Jiménez, Jared López, Miguel Olmedo y Eduardo Becerril (aunque seas del laboratorio vecino te adoptamos), gracias por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por las pláticas tan divertidas y por sus consejos para la mejora de este trabajo.

Por último, y no menos importante, a mi esposo Víctor García García, por estar siempre a mi lado escuchando largas pláticas sobre experimentos exitosos o fallidos, a veces sin entender muy bien sobre qué estaba hablando, por su ayuda en el tratamiento de datos y sus ideas para la escritura de esta tesis.

**ABREVIATURAS**

$\alpha$	Pureza de separación
$\beta$	Eficiencia de separación
% HCT	Porcentaje de hematocrito
A	Absorbancia
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
$A_{MM}$	Ancho del microcanal mayor
$A_{MR}$	Ancho del microcanal menor
ANOVA	Análisis de varianza
anti-CCP	Anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos
anti-h-IgG	Anticuerpo contra inmunoglobulina G humana
AR	Artritis reumatoide
CCP	Péptido citrulinado cíclico
CM	Cuadrado medio
$CM_F$	Concentración de la muestra fortificada
$CM_{SF}$	Concentración de la muestra sin fortificar
CV	Coefficiente de variación
DDAO	9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7-il)
De	Número de Dean
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas
GMNPs	Nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro
HA	Hemaglutinina
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
IgG	Inmunoglobulina G
LOC	Lab-on-a-chip
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MNPs-CCP	Nanopartículas magnéticas conjugadas con péptidos citrulinados cíclicos
MNPs-URS	Nanopartículas magnéticas conjugadas con ureasa
PDMS	Polidimetilsiloxano

PEG	Polietilenglicol
POC	Dispositivos de diagnóstico <i>Point-of-care</i>
PS	Poliestireno
$Q_{MM}$	Caudal del microcanal mayor
$Q_{MR}$	Caudal del microcanal menor
$Q_S$	Caudal de entrada de sangre total
$Q_{SAF}$	Caudal de entrada de solución amortiguadora de fosfatos
$Q_{Total}$	Caudal total
RAM	Relación del ancho de los microcanales
RCE	Relación de caudales de entrada ( $Q_{SAF}/Q_S$ )
RCS	Relación de caudales de salida ( $Q_{MM}/Q_{MR}$ )
Re	Número de Reynolds
S	Desviación estándar
$S^2$	Varianza
SA	Estreptavidina
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SC	Suma de cuadrados
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TMB	Tetrametilbencidina
URS	Ureasa
VIA	Virus de la influenza aviar

ÍNDICE

RESUMEN GOBLAL.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN GLOBAL.....	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GLOBAL.....	19
<b>CAPÍTULO I. Marco Teórico.....</b>	<b>20</b>
1.1 Microfluídica.....	20
1.2 Microdispositivos.....	21
1.2.1 Métodos de microfabricación.....	23
1.2.1.1 Fotolitografía.....	23
1.2.1.2 Litografía suave: moldeo de réplica.....	25
1.2.2 Materiales de fabricación.....	26
1.2.2.1 Vidrio y sílice.....	26
1.2.2.2 Polímeros: polidimetilsiloxano (PDMS).....	27
1.2.2.3 Hidrogeles.....	29
1.2.2.4 Papel.....	29
1.3 Microdispositivos para diagnóstico clínico.....	30
1.3.1 Inmunoensayo en microdispositivos.....	30
1.3.1.1 Inmovilización en inmunoensayos heterogéneos.....	34
1.3.1.1.1 Soportes sólidos no magnéticos.....	35
1.3.1.1.2 Soportes sólidos magnéticos.....	36
1.3.2 Microdispositivos para separación de plasma sanguíneo.....	39
1.3.2.1 Ley de la bifurcación.....	41
1.3.2.2 Efecto centrífugo.....	42
1.3.3 Microdispositivos para la cuantificación de urea.....	45
1.3.3.1 Fundamento de la reacción de cuantificación de urea: Método de Berthelot modificado.....	46

<b>CAPÍTULO II. Inmunoensayo en microdispositivo con nanopartículas magnéticas conjugadas para una rápida cuantificación de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP).....</b>	<b>48</b>
2.1 RESUMEN.....	48
2.2 INTRODUCCIÓN.....	49
2.3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
2.4 METODOLOGÍA.....	51
2.4.1 Reactivos.....	51
2.4.2 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos.....	52
2.4.3 Experimentos iniciales.....	53
2.4.3.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de hierro (MNPs) y nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro (GMNPs).....	53
2.4.3.2 Pruebas de retención de GMNPs dentro del microcanal empleando imanes....	54
2.4.4 Toma de muestras de sangre.....	55
2.4.5 Conjugación del péptido citrulinado cíclico (CCP) con las nanopartículas magnéticas (MNPs).....	55
2.4.6 Procedimiento del inmunoensayo en microdispositivo.....	56
2.4.7 Sistema de detección.....	57
2.4.8 Establecimiento de las condiciones de reacción del inmunoensayo.....	58
2.4.8.1 Tiempo de incubación de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP.....	58
2.4.8.2 Cantidad de MNPs-CCP retenida.....	58
2.4.8.3 Tiempo y temperatura de la reacción enzimática.....	59
2.4.9 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	59
2.4.10 Construcción de las curvas de calibración y análisis de muestras.....	59
2.4.11 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	60
2.4.12 Tiempo de vida de los microdispositivos.....	60
2.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	60
2.5.1 Caracterización de los microdispositivos.....	60
2.5.2 Experimentos iniciales.....	61
2.5.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de hierro (MNPs) y nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro (GMNPs).....	61
2.5.2.2 Pruebas de retención de GMNPs dentro del microcanal empleando imanes.....	61
2.5.3 Conjugación del péptido cíclico citrulinado (CCP) con las nanopartículas magnéticas (MNPs).....	63

2.5.4 Establecimiento de las condiciones de reacción del inmunoensayo.....	65
2.5.5 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	68
2.5.6 Detección y cuantificación de anti-CCP en el microdispositivo.....	69
2.5.6.1 Construcción de curvas de calibración.....	69
2.5.6.2 Análisis de muestras reales de plasma y comparación con el método convencional.....	70
2.5.7 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	72
2.5.8 Tiempo de vida de los microdispositivos.....	74
2.6 CONCLUSIONES.....	75
<b>CAPÍTULO III. Microdispositivo basado en el efecto centrífugo y la ley de bifurcación para la separación de plasma de sangre total diluida en línea.....</b>	<b>76</b>
3.1 RESUMEN.....	76
3.2 INTRODUCCIÓN.....	77
3.3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	79
3.4 METODOLOGÍA.....	79
3.4.1 Reactivos.....	79
3.4.2 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos.....	79
3.4.3 Experimentos iniciales.....	80
3.4.3.1 Estudio de la relación de caudal de salida en función de la relación del ancho del microcanal.....	80
3.4.3.2 Observación de la ley de la bifurcación.....	81
3.4.4 Toma de muestras de sangre.....	82
3.4.5 Medición del porcentaje de hematocrito (% HCT) en las muestras de sangre.....	82
3.4.6 Montaje experimental para la dilución de sangre y separación de plasma.....	82
3.4.7 Estudio de la separación de plasma modificando valores de RCE y $Q_{Total}$ .....	83
3.4.8 Variación del % HCT en función de los valores de RCE (dilución en línea).....	83
3.4.9 Medición del caudal de salida de plasma.....	84
3.4.10 Medición de la concentración de plasma separado.....	84
3.4.11 Evaluación del funcionamiento del microdispositivo.....	85
3.4.11.1 Medición de la pureza de separación ( $\alpha$ ).....	85
3.4.11.2 Medición de la eficiencia de separación ( $\beta$ ).....	86
3.4.12 Evaluación de la calidad del plasma diluido y separado en línea.....	86

3.4.13 Procedimiento de limpieza de los microdispositivos.....	87
3.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	87
3.5.1 Experimentos iniciales.....	87
3.5.1.1 Estudio de la relación de caudal de salida en función de la relación del ancho del microcanal.....	87
3.5.1.2 Observación de la ley de la bifurcación.....	88
3.5.2 Características y funcionamiento del microdispositivo.....	88
3.5.3 Estudio de la separación de plasma modificando valores de RCE y $Q_{Total}$ .....	91
3.5.4 Variación del % HCT en función de los valores de RCE (dilución en línea).....	92
3.5.5 Medición del caudal de salida y concentración del plasma separado.....	94
3.5.6 Evaluación del funcionamiento del microdispositivo.....	96
3.5.7 Comparación con otros trabajos reportados.....	99
3.5.8 Evaluación de la calidad del plasma diluido y separado en línea.....	101
3.6 CONCLUSIONES.....	102
<b>CAPÍTULO IV. Detección rápida, sensible y selectiva de H5-Hemaglutitina del virus de la influenza aviar empleando un dispositivo de inmuno-pared.....</b>	<b>103</b>
4.1 RESUMEN.....	103
4.2 INTRODUCCIÓN.....	104
4.3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	106
4.4 METODOLOGÍA.....	106
4.4.1 Reactivos.....	106
4.4.2 Fabricación del dispositivo de inmuno-pared.....	107
4.4.3 Establecimiento de las condiciones para la construcción de la inmuno-pared.....	108
4.4.3.1 Estudio de la intensidad fluorescente en función del tiempo.....	108
4.4.3.2 Variación de la relación AWP:SAF.....	108
4.4.4 Proceso de biotilación del anticuerpo de captura.....	109
4.4.5 Procedimiento del inmunoensayo.....	109
4.4.6 Captura y análisis de imágenes.....	110
4.4.7 Construcción de las curvas de calibración.....	110
4.4.8 Estudio de selectividad.....	111
4.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	111
4.5.1 Establecimiento de las condiciones para la construcción de la inmuno-pared.....	111

4.5.1.1 Estudio de la intensidad fluorescente en función del tiempo.....	111
4.5.1.2 Variación de la relación AWP:SAF.....	113
4.5.2 Proceso de biotilación del anticuerpo de captura.....	114
4.5.3 Captura y análisis de imágenes.....	114
4.5.4 Detección de H5-HA con el anticuerpo marcado con DyLight 650 .....	115
4.5.5 Detección de H5-HA con el anticuerpo marcado con enzima (fosfatasa alcalina).....	116
4.5.6 Comparación del método desarrollado vs. un kit comercial.....	116
4.5.7 Estudio de selectividad.....	118
4.6 CONCLUSIONES.....	118

**CAPÍTULO V. Microdispositivo en flujo continuo con nanopartículas magnéticas para la cuantificación de urea en muestras de orina y plasma.....**

<b>5.1 RESUMEN.....</b>	<b>119</b>
5.2 INTRODUCCIÓN.....	120
5.3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	122
5.4 METODOLOGÍA.....	122
5.4.1 Reactivos.....	122
5.4.2 Experimentos iniciales.....	123
5.4.2.1 Comparación entre el uso de 2-clorofenol y salicilato.....	123
5.4.2.2 Estudio del tiempo de incubación de la reacción urea-ureasa.....	123
5.4.2.3 Adición del catalizador nitroprusiato de sodio.....	124
5.4.2.4 Estudio del tiempo de incubación de la reacción de Berthelot.....	124
5.4.3 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos.....	124
5.4.4 Toma y tratamiento de muestras.....	125
5.4.5 Conjugación de ureasa (URS) con las nanopartículas magnéticas (MNPs).....	125
5.4.6 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	126
5.4.7 Montaje experimental para la cuantificación de urea.....	126
5.4.8 Sistema de detección.....	127
5.4.9 Establecimiento de las condiciones de reacción.....	127
5.4.9.1 Estudio del tiempo de vida de la enzima.....	127
5.4.9.2 Influencia de la temperatura sobre la reacción enzimática.....	128
5.4.9.3 Diseño de experimentos factorial completo 2 <sup>3</sup> con 3 puntos centrales.....	128
5.4.10 Construcción de la curva de calibración.....	128

5.4.11 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	129
5.4.12 Estudios de exactitud: porcentajes de recuperación.....	129
5.4.13 Comparación con una metodología en lote.....	130
5.4.14 Cuantificación de muestras.....	131
5.4.15 Limpieza de los microdispositivos.....	131
<b>5.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>131</b>
5.5.1 Experimentos iniciales.....	131
5.5.1.1 Comparación entre el uso de 2-clorofenol y salicilato.....	131
5.5.1.2 Estudio del tiempo de incubación de la reacción urea-ureasa.....	132
5.5.1.3 Adición del catalizador nitroprusiato de sodio.....	133
5.5.1.4 Estudio del tiempo de incubación de la reacción de Berthelot.....	134
5.5.2 Conjugación de ureasa (URS) con las nanopartículas magnéticas (MNPs).....	134
5.5.3 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	135
5.5.4 Diseño y caracterización de los microdispositivos.....	136
5.5.5 Establecimiento de las condiciones de reacción.....	137
5.5.5.1 Estudio del tiempo de vida de la enzima.....	137
5.5.5.2 Influencia de la temperatura sobre la reacción enzimática.....	138
5.5.5.3 Diseño de experimentos factorial completo $2^3$ con 3 puntos centrales.....	138
5.5.6 Construcción de la curva de calibración.....	140
5.5.7 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	141
5.5.8 Estudios de exactitud: porcentajes de recuperación.....	142
5.5.9 Comparación de metodologías: Microdispositivo vs. lote.....	143
5.5.10 Cuantificación de muestras.....	144
<b>5.6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
 <b>CONCLUSIONES GLOBALES.....</b>	 <b>146</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>156</b>
<b>ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>163</b>

**RESUMEN GLOBAL**

La aplicación de microdispositivos ha demostrado tener un gran potencial para enfrentar los retos en diversos campos de investigación, despertando el interés científico con el propósito de construir sistemas integrados que sea capaces de realizar diversos procedimientos para el análisis en un solo microdispositivo (lab-on-a-chip). Una de las aplicaciones más atractiva de la microfluídica ha sido enfocada hacia el diagnóstico clínico, ya que estos microdispositivos ofrecen muchas ventajas: menor volumen de reactivos y muestras, tiempo de análisis más corto, y la posibilidad de análisis en paralelo. Además, su automatización puede conducir a una rápida y fácil manera de utilizarlos sin la necesidad de alguna capacitación o equipos especializados. Otro aspecto para considerar es el precio teóricamente más bajo comparado con el de procedimientos a escala rutinarios en laboratorios. En este trabajo se diseñaron, fabricaron y evaluaron cuatro microdispositivos para diagnóstico clínico. En dos de ellos se realizó un inmunoensayo empleando soportes sólidos diferentes: nanopartículas magnéticas conjugadas con un antígeno y una estructura polimérica 3D con estreptavidina (inmuno-pared) empleada para inmovilizar un anticuerpo de captura biotinilado, ambos microdispositivos demostraron ser un método más rápido y sensible para la detección de biomarcadores en comparación con métodos convencionales de detección en microplaca. Un tercer microdispositivo con microcanales en espiral se desarrolló para la dilución de muestras de sangre y separación de plasma en línea comprobando la calidad del plasma separado cuantificando un biomarcador para el diagnóstico de artritis reumatoide, mostrando tener un gran potencial de acoplarse con la cuantificación de otro tipo de biomarcadores con una pureza y eficiencia de separación adecuada. Un último microdispositivo se evaluó para la cuantificación espectrofotométrica de urea por medio del método de Berthelot modificado empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con la enzima ureasa y realizando la reacción en flujo continuo; el método desarrollado mostró una excelente precisión y exactitud logrando cuantificar muestras de orina y plasma con concentraciones de urea dentro de los valores normales. Los resultados demostraron la versatilidad de los dispositivos de microfluídica para ser implementados en el área clínica con resultados similares a los obtenidos con técnicas tradicionales de detección y separación.

**ABSTRACT**

The application of microdevices has shown great potential to face the challenges in various research fields, awakening scientific interest in order to build integrated systems that are capable of performing various procedures for analysis in a single microdevice (lab-on-a-chip). One of the most attractive applications of microfluidics has been focused on clinical diagnostics, since these microdevices offer many advantages: lower volume of reagents and samples, shorter analysis time, and the possibility of parallel analysis. Furthermore, their automation can lead to a quick and easy way to use the microdevice without any specialized training or equipment. Another aspect to consider is the theoretically lower price compared to routine scale procedures in laboratories. In this work, four microdevices for clinical diagnosis were designed, manufactured, and evaluated. In two of them an immunoassay was performed using different solid supports: magnetic nanoparticles conjugated with an antigen and a 3D polymeric structure with streptavidin (immuno-wall) for immobilizing a biotinylated capture antibody, both microdevices proved to be a faster and more sensitive method for biomarkers detection compared to conventional microplate detection methods. A third microdevice with spiral microchannels was developed for the dilution of blood samples and on-line plasma separation, checking the quality of the separated plasma by quantifying a biomarker for the diagnosis of rheumatoid arthritis, showing great potential to be coupled with the quantification of another type of biomarkers with adequate purity and separation efficiency. A last microdevice was evaluated for the spectrophotometric quantification of urea employing the modified Berthelot method using magnetic nanoparticles conjugated with the enzyme urease and performing the reaction in continuous flow. The developed method showed excellent precision and accuracy, achieving the quantification of urea in urine and plasma samples with urea concentrations within normal values. The results demonstrated the versatility of microfluidic devices to be implemented in the clinical area with results similar to those obtained with traditional detection and separation techniques.

## INTRODUCCIÓN GLOBAL

La microfluídica es la ciencia y tecnología de sistemas para procesar o manipular pequeñas cantidades de fluidos dentro de canales cuyas dimensiones abarcan algunas decenas de micrómetros.<sup>1</sup> Para este fin se emplean dispositivos de microfluídica cuyas técnicas de fabricación son diversas siendo las más comunes la fotolitografía (creación del molde por medio de la transferencia del patrón deseado a una oblea de silicio a través de la exposición a luz ultravioleta de una resina fotosensible y una máscara transparente)<sup>2</sup> y litografía suave por moldeo de réplica (creación de réplicas poliméricas del microdispositivo empleando el molde creado).<sup>3,4</sup> Dentro de los materiales empleados para su construcción se encuentran los polímeros, debido a su fácil acceso y bajo costo, en donde el polidimetilsiloxano (PDMS) es el elastómero más usado.<sup>5</sup>

En las últimas décadas, debido al amplio rango de aplicaciones que la microfluídica ofrece,<sup>6</sup> se ha incrementado el interés científico por el desarrollo de dispositivos capaces de realizar análisis clínicos rutinarios a través de la implementación de protocolos de laboratorio tradicionales estandarizados en un dispositivo de microfluídica conocido como lab-on-a-chip (LOC).<sup>7-10</sup> Las ventajas que ofrecen estos microdispositivos son muchas: portabilidad, volúmenes pequeños de muestras y reactivos, bajo costo, integración de múltiples pasos, acoplamiento a diferentes métodos de detección y tiempos cortos de análisis. Siendo estas características lo que los hacen tan llamativos, impulsando el desarrollo y evaluación de nuevos sustratos, técnicas de fabricación y mejores métodos de detección para lograr la construcción de microdispositivos para diagnóstico clínico económicos, robustos, desechables y portátiles.<sup>1,11,12</sup>

Diferentes microdispositivos ya han sido reportados aplicados al diagnóstico clínico, por ejemplo para la realización de inmunoensayos<sup>13,14</sup> empleando diferentes soportes sólidos para mejorar la captura específica del antígeno o anticuerpo. Entre ellos se encuentra una estructura de hidrogel cilíndrica (inmuno-pilar),<sup>15</sup> una estructura de fotopolímero 3D fabricada dentro de un microcanal (inmuno-pared)<sup>16,17</sup> o el uso de nanopartículas magnéticas (MNPs).<sup>18,19</sup> En comparación con el método convencional de placa de microtitulación, estas alternativas han demostrado proporcionar una detección más rápida, fácil y en ocasiones más sensible con detección óptica: colorimetría, fluorescencia o quimioluminiscencia, según la naturaleza de la señal. De igual manera se ha explorado el campo de separación de plasma sanguíneo on-chip<sup>20,21</sup> haciendo uso de diferentes tipos de fuerzas, como las fuerzas eléctricas, magnéticas y acústicas<sup>22</sup>, así como técnicas de separación utilizando fuerzas hidrodinámicas, modificando la geometría de los microcanales y aprovechando efectos biofísicos a microescala.<sup>23-26</sup> La mayoría de los trabajos

reportados en la literatura son capaces de alcanzar valores de eficiencia y pureza de separación de plasma altos, pero requieren una dilución de la muestra de sangre de hasta 100x. Pocos son los trabajos que han logrado reportar la separación de plasma de sangre total humana debido al reto que implica realizar la separación de más de 5 millones de células por microlitro de sangre.<sup>23</sup> Trabajos en donde se realizan reacciones químicas en flujo continuo en microescala para la detección de marcadores metabólicos como urea también han sido reportados,<sup>27-29</sup> estos microdispositivos aprovechan las características de los líquidos al reducir el tamaño de las tuberías a algunos cientos de micrómetros, como número de Reynolds menor a  $10^2$  ( $Re < 10^2$ ) lo que representa una situación en la que el flujo es considerado esencialmente ordenado (flujo laminar) y el mezclado de los reactivos para lograr la reacción química se realiza únicamente por difusión, el tiempo de mezclado será mayor cuanto mayor sea la longitud del canal, por lo que este tiempo se ve disminuido al trabajar con canales pequeños.<sup>30</sup>

En el presente trabajo se construyeron, caracterizaron y evaluaron cuatro diferentes microdispositivos enfocados al diagnóstico clínico. Cada uno de ellos se presenta en capítulos independientes, pero estrechamente relacionados entre sí. El Capítulo I contiene un breve marco teórico que abarca los conceptos más relevantes relacionados a los microdispositivos y su uso en el área clínica. El Capítulo II se enfoca en la detección espectrofotométrica de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP), conocidos por ser biomarcadores específicos para el diagnóstico de artritis reumatoide, por medio de un inmunoensayo indirecto en un microdispositivo empleando como soporte sólido nanopartículas magnéticas conjugadas con el antígeno. En el Capítulo III se describe la implementación de un microdispositivo de PDMS con diseño en espiral para la dilución en línea y separación de plasma sanguíneo. El Capítulo IV muestra la detección de H5-hemaglutinina del virus de la influenza aviar empleando una estructura polimérica 3D dentro de un microcanal conocida como inmuno-pared, la cual sirve como soporte sólido para la realización de un inmunoensayo tipo sándwich con detección fluorescente. Por último, en el Capítulo V se presenta la detección espectrofotométrica de urea en muestras de orina y plasma sanguíneo por medio de la reacción modificada de Berthelot utilizando un microdispositivo para efectuar la reacción en línea y nanopartículas magnéticas conjugadas con la enzima ureasa inmovilizadas dentro del microcanal.

## HIPÓTESIS

Es posible fabricar microdispositivos para la separación de plasma sanguíneo, la detección y cuantificación de diferentes biomarcadores útiles en el diagnóstico clínico optimizando tiempo de análisis, recursos, costos, entre otros, en comparación con técnicas tradicionales o con otros trabajos reportados, pero con resultados equiparables.

## OBJETIVO GLOBAL

Diseñar, construir, caracterizar y evaluar dispositivos de microfluídica para la separación de plasma sanguíneo, la detección y cuantificación de biomarcadores útiles en el diagnóstico clínico con la finalidad de demostrar su viabilidad como herramientas de análisis rutinarias.

Este objetivo global se alcanzará por medio del desarrollo de cuatro microdispositivos distribuidos en capítulos independientes (Capítulo II—V) cada uno con un objetivo general propio:

- ♦ **Objetivo Capítulo II:** Diseñar, fabricar y evaluar microdispositivos de PDMS para la detección y cuantificación espectrofotométrica de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) en un control positivo de plasma humano empleando nanopartículas magnéticas conjugadas a un antígeno.
- ♦ **Objetivo Capítulo III:** Diseñar, fabricar y evaluar el funcionamiento de un microdispositivo en espiral de PDMS para la dilución en línea de sangre total y subsecuente separación de plasma con base en el efecto centrífugo y ley de la bifurcación.
- ♦ **Objetivo Capítulo IV:** Construir un microdispositivo de inmuno-pared para la detección fluorescente y cuantificación de H5-hemaglutinina del virus de la influenza aviar por medio de un inmunoensayo tipo sándwich.
- ♦ **Objetivo Capítulo V:** Diseñar, fabricar y evaluar un microdispositivo de PDMS para la cuantificación en flujo continuo de urea en muestras humanas de orina y plasma empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con ureasa como soporte sólido.

# \* CAPÍTULO I \*

## Marco teórico

### 1.1 Microfluídica

La microfluídica es la ciencia y tecnología de sistemas que procesa o manipula pequeñas cantidades de fluidos, empleando canales con dimensiones de tan sólo algunas docenas de micrómetros.<sup>1</sup> Un fluido se define como una sustancia que cambia su forma continuamente siempre que esté sometida a un esfuerzo cortante, sin importar que tan pequeño sea.<sup>31</sup> Si el fluido es introducido dentro de una tubería se moverá dentro de ella, este movimiento es conocido como flujo, de tal forma que es posible conocer la velocidad de flujo (caudal) determinando el volumen de fluido que pasa por un punto fijo por unidad de tiempo. El flujo resultante puede clasificarse como laminar o turbulento:<sup>32</sup>

- El flujo laminar se describe como un flujo suave, que ocurre cuando un fluido se mueve en capas o láminas paralelas deslizándose una capa sobre otra sin entremezclarse. Para un flujo laminar en un tubo de diámetro uniforme, la velocidad de flujo más rápida tiene lugar en el centro de la corriente, mientras que la velocidad más lenta se produce junto a las paredes debido a las fuerzas de fricción (Figura 1-1(a)). Suele aparecer a caudales relativamente bajos o viscosidades altas.
- El flujo turbulento se describe como rudo y desordenado, se desplaza de manera errática con un intercambio de movimiento violento. Se mueve desordenadamente formando pequeños remolinos aperiódicos (Figura 1-1(b)). Aparece a caudales altos o por la presencia de obstáculos abruptos en el movimiento del fluido.

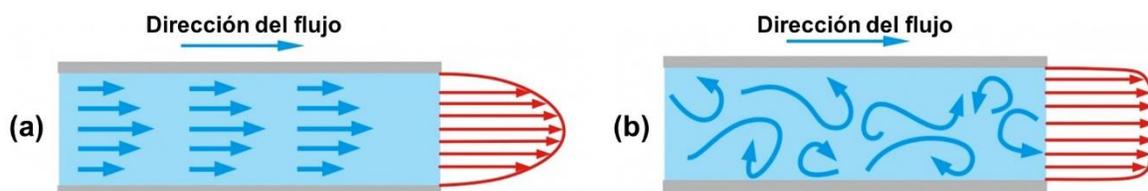


Figura 1-1. Ilustración que representa las principales características del (a) flujo laminar y (b) flujo turbulento.

Es importante enfatizar que la mecánica de los fluidos difiere al trabajar en microescala en comparación con su contraparte en macroescala. Cuando un sistema es reducido en tamaño su relación superficie/volumen aumenta, mejorando la transferencia de masa y dando como resultado el predominio de los efectos de superficie. Por lo tanto, al trabajar a longitudes microscópicas, los efectos de las fuerzas superficiales como las fuerzas viscosas, electrostáticas/electrodinámicas o de tensión superficial, que no son tan importantes en escala macroscópica, juegan un papel decisivo y dominante.<sup>33,34</sup>

Para juzgar la importancia relativa de las diferentes fuerzas/interacciones en microfluídica, diferentes números adimensionales son empleados. Estos números son indicativos de la fuerza relativa de las diversas fuerzas que actúan sobre el sistema. Uno de los más empleados es el número de Reynolds ( $Re$ ), que relaciona las fuerzas de inercia y las fuerzas viscosas y ayuda a predecir el tipo de flujo conociendo cuatro variables: la densidad del fluido ( $\rho$ ), su viscosidad ( $\eta$ ), el diámetro de la tubería ( $D$ ) y la velocidad promedio del flujo ( $v$ ) acorde con la Ecuación 1-1. Para aplicaciones prácticas del flujo en tuberías, si  $Re \leq 2000$ , el flujo será laminar. Por el contrario, si  $Re \geq 4000$ , el flujo será turbulento. En el intervalo de valores de  $Re$  entre 2000 y 4000 es imposible predecir qué flujo existe; por lo tanto, se le denomina región crítica. En la mayoría de los casos, cuando se trabaja con microfluidos,  $Re$  es típicamente menor a 10, por lo que las fuerzas viscosas juegan un papel importante en dictar las características del flujo del fluido.<sup>33,35</sup>

$$Re = \frac{D v \rho}{\eta} \quad \text{Ecuación 1-1}$$

## 1.2 Microdispositivos

Una la aplicación de la microfluídica son los microsistemas de análisis total ( $\mu$ TAS), mejor conocidos hoy en día como microdispositivos, dispositivos de microfluídica o microchips, cuyo principal objetivo es implementar y automatizar protocolos de laboratorio tradicionales para conducir al análisis químico y bioquímico miniaturizado. Estos microdispositivos tienen la ventaja de integrar pasos múltiples, procesar un mayor número de análisis en función del tiempo, emplear volúmenes pequeños de muestras y reactivos, generar pocos residuos, lo que conduce inevitablemente a una disminución de costos, además de brindar un laboratorio “portátil” (lab-on-a-chip (LOC)) buscando una mínima manipulación por parte del usuario.<sup>1,36,37</sup> En la Figura 1-2 se ejemplifica de manera conceptual la función de los dispositivos de microfluídica.

Los componentes requeridos para la implementación de un sistema de microfluídica deben ser tales que permitan realizar funciones estándar de laboratorio como el tratamiento y preparación de la muestra, la correcta mezcla y reacción entre la muestra y los reactivos, procesos de separación (de ser requeridos) y el acoplamiento con un sistema de detección del analito de interés. Con este fin, es posible incorporar diferentes componentes funcionales dentro de un solo microchip con base en los requerimientos del ensayo y la aplicación final.<sup>38</sup> De manera general los microdispositivos cuentan con: (1) un inyector que ayuda a la entrada de la muestra y reactivos controlando el caudal de entrada, dentro de los más empleados se encuentran bombas de jeringa y micropipetas; (2) un reactor donde se realiza, mantiene y controla la formación del producto de reacción, puede ser equipado con calentadores para un control térmico y la longitud del microcanal puede ser tan larga o corta como se requiera; (3) debido al bajo número de Reynolds dentro de los microcanales, en ocasiones es necesaria la adición de un mezclador, el cual debe cumplir la función de generar turbulencia para un mejor y más rápido mezclado de los fluidos, dentro de los mezcladores puede encontrarse el cambio de la velocidad del flujo por medio de la generación de remolinos y vórtices al modificar la forma de los microcanales; y (4) un detector para la transducción de una señal física del analito a una señal eléctrica útil para el análisis, hoy en día existen muchos métodos de detección acoplados a microdispositivos incluyendo ópticos, electroquímicos, fluorescentes, etc.<sup>39</sup>

Debido a las múltiples ventajas y el gran potencial de los microdispositivos, su desarrollo y aplicación ha crecido de manera exponencial en las últimas décadas. Trabajos reportados con fines analíticos aplicados en química, bioquímica y ciencias en general pueden consultarse,<sup>40,41</sup> apreciándose todos los beneficios que la microfluídica ofrece.



**Figura 1-2.** Imagen conceptual de la función de un dispositivo lab-on-a-chip (LOC).

### 1.2.1 Métodos de microfabricación

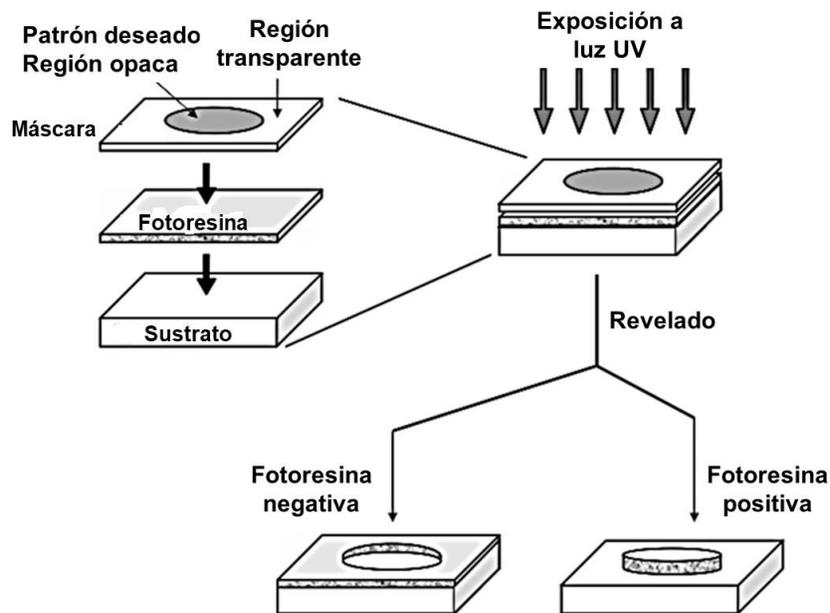
Las técnicas de fabricación de dispositivos a microescala son diversas y amplias, las primeras técnicas empleadas se desarrollaron para aplicaciones en la industria de los semiconductores y, en consecuencia, no son específicas para aplicaciones biológicas o médicas. Sin embargo, la microfabricación ha ofrecido una serie de posibilidades para el diseño de dispositivos sintéticos para el estudio de procesos químicos, biológicos y físicos a escala celular y molecular. Durante el proceso de microfabricación diversas técnicas son utilizadas de forma secuencial para producir la estructura deseada por medio de métodos de micromecanizado a granel y/o de superficie. El micromecanizado a granel define las estructuras grabando selectivamente el interior de un sustrato, mientras que el micromecanizado de superficie utiliza una sucesión de deposición de película delgada y grabado selectivo. Así, mientras que el micromecanizado de superficie crea estructuras sobre un sustrato, micromecanizado a granel produce estructuras dentro de un mismo sustrato. En la mayoría de los casos, se utiliza una combinación de ambas técnicas para la fabricación del sistema deseado.

Las técnicas de microfabricación más importantes son fotolitografía, litografía suave, deposición de película, grabado y unión. De manera general, la fotolitografía es utilizada para transferir un diseño generado por el usuario a un material mediante la exposición selectiva de un polímero sensible a la luz. La litografía suave por moldeo de réplica se basa en la generación y utilización del molde de una microestructura a partir de un polímero como PDMS. La deposición de película consiste en la formación de películas de aproximadamente un micrón de espesor en la superficie de un sustrato. El grabado elimina selectivamente materiales de la superficie del microdispositivo mediante procesos químicos o físicos. Por último, la técnica de unión, como su nombre lo indica, adhiere sustratos con o sin el uso de capas intermedias.<sup>42</sup> En las siguientes secciones se discutirán a detalle las técnicas de fotolitografía y litografía suave por moldeo de réplica.

#### 1.2.1.1 Fotolitografía

El proceso fotolitográfico consta de una serie de pasos en los que se genera un patrón deseado en la superficie de un sustrato mediante la exposición de regiones de un material sensible a la luz ultravioleta (UV). La Figura 1-3 muestra un esquema con los principales pasos seguidos durante el proceso de fotolitografía, éste debe realizarse dentro de un cuarto limpio. Primero, un sustrato (silicio o vidrio) se recubre con una capa de una fotoresina o polímero sensible a la luz. Encima de este sustrato recubierto, se coloca una máscara que contiene el patrón deseado en una región

opaca, ésta debe estar hecha de vidrio u otro material transparente a la región UV. Una vez colocada la máscara, se irradia con luz UV para exponer las secciones de la fotoresina no cubiertas por las regiones opacas de la fotomáscara. Dependiendo del tipo de fotoresina utilizada, ésta sufrirá una de dos posibles transformaciones tras la exposición a la luz. Cuando la luz ilumina una fotoresina positiva, los enlaces de las cadenas poliméricas de las regiones expuestas se rompen y se vuelven más solubles y fáciles de retirar al utilizar algún disolvente orgánico (solución de revelado). Por el contrario, cuando se emplea una fotoresina negativa, la exposición a la luz causa la reticulación entre las cadenas poliméricas de la resina, fortaleciéndola y volviéndola insoluble en la solución de revelado, de esta manera, sólo las zonas no expuestas a la luz serán removidas. Después del proceso de revelado, en donde la fotoresina no polimerizada es removida generalmente por medio de la sonicación con algún disolvente orgánico, se obtiene el diseño del patrón sobre el sustrato, concluyendo así el proceso fotolitográfico.<sup>42,43</sup>



**Figura 1-3.** Esquema del proceso de fotolitografía. Se emplea un sustrato recubierto con una resina fotosensible y una máscara con regiones opacas en el patrón deseado que es expuesto a luz UV. Dependiendo del tipo de fotoresina utilizada, ésta se volverá más soluble (fotoresina positiva) o reticulada (fotoresina negativa) después de la exposición a la luz ultravioleta, generando así el patrón deseado después del proceso de revelado.<sup>42</sup>

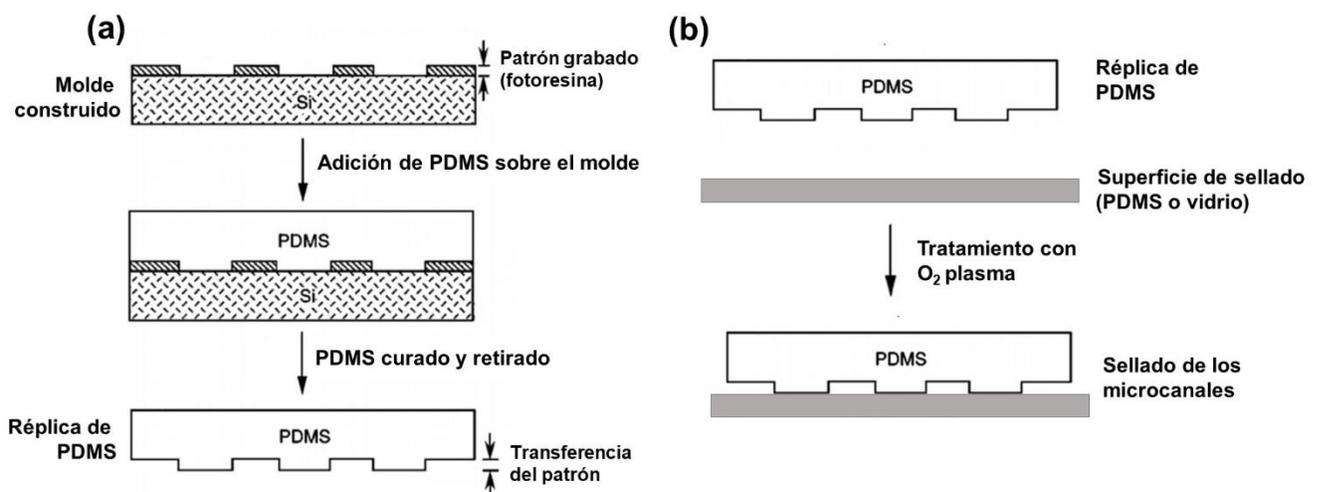
Una de las fotoresinas más utilizadas es SU-8, comercializada por MicroChem Corporation (Newton, MA, USA). Esta fotoresina negativa se reticula tras la exposición a energía UV en el rango de 350 a 400 nm, y se puede revelar con varios disolventes como acetato de monoéter de propilenglicol o acetato de etilo. Una de sus principales ventajas es que permite la generación de estructuras altas, de más de 1000  $\mu\text{m}$  de altura, además de ofrecer gran resolución.<sup>2,3</sup>

### 1.2.1.2 Litografía suave: moldeo de réplica

La litografía suave es un método utilizado para transferir un patrón a una superficie. Una de las técnicas de la litografía suave más empleadas para la construcción de microdispositivos es el moldeo de réplica o *replica molding* (REM), en este caso, se obtiene la réplica de una microestructura a través de la adición de un pre-polímero de un elastómero, como PDMS, sobre un molde o “*master*” reutilizable (fabricado mediante otras técnicas de microfabricación como la fotolitografía) que al ser reticulado y despegado del molde toma su forma, como se ejemplifica en la Figura 1-4.<sup>42</sup>

El proceso de reticulación puede llevarse a temperatura ambiente, pero suele acelerarse térmicamente empleando temperaturas entre 40 y 120 °C.<sup>44</sup> Posterior a la fabricación de la réplica, se requiere de un proceso de sellado para formar una estructura cerrada del microcanal construido. Por ejemplo, para formar un sellado permanente con PDMS, se emplea la oxidación por plasma de superficies; el tratamiento con plasma elimina los grupos metilo ( $\text{Si}-\text{CH}_3$ ) sobre la superficie del PDMS e introduce al grupo hidrofílico silanol ( $\text{Si}-\text{OH}$ ), que posteriormente forma fuertes enlaces covalentes ( $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ ) cuando se junta con otra película de PDMS u otros materiales como vidrio, silicio, polietileno, poliestireno, carbono vítreo, entre otros.<sup>4</sup>

La principal ventaja del proceso REM es que, una vez que se tiene el molde, ninguno de los otros pasos requiere manipulación en cuarto limpio. Como resultado, es una técnica menos costosa que proporciona una gran resolución a través de un proceso más simple logrando realizar gran número de réplicas en poco tiempo.<sup>42,43</sup>



**Figura 1-4.** Ilustración esquemática del procedimiento de litografía suave por moldeo. (a) Fabricación de réplicas de PDMS a partir de un molde construido por fotolitografía que tiene estructuras en relieve en su superficie.<sup>4</sup> (b) Ejemplo del sellado de los microcanales empleando tratamiento de plasma.

### 1.2.2 Materiales de fabricación

Cuando se trabaja a microescala, las propiedades de superficie del material con que está construido el dispositivo se ven extremadamente amplificadas, lo que puede conducir a la realización de funciones únicas dentro del microdispositivo o guiar a problemas que probablemente no se presentarían a macroescala. Así, la elección del material determina en gran parte la función del microdispositivo.<sup>5</sup> Otro aspecto que considerar es el costo del material, ya que este juega un papel importante si lo que se desea es una producción del microdispositivo a gran escala, ya que, para una misma área de material y transparencia óptica, un sustrato de vidrio puede costar de 10 a 100 veces más que un sustrato de polímero. Además del costo, existe una amplia gama de polímeros con diferente química de superficie. Por lo tanto, la elección del material se puede adaptar a la aplicación buscada.<sup>38</sup> En las últimas dos décadas, diversos materiales han sido introducidos, estos pueden dividirse de manera general en materiales inorgánicos, plásticos y elastómeros, hidrogeles, y papel.<sup>5</sup> En la Figura 1-5 se muestra un ejemplo de microdispositivos construidos con diferentes materiales.

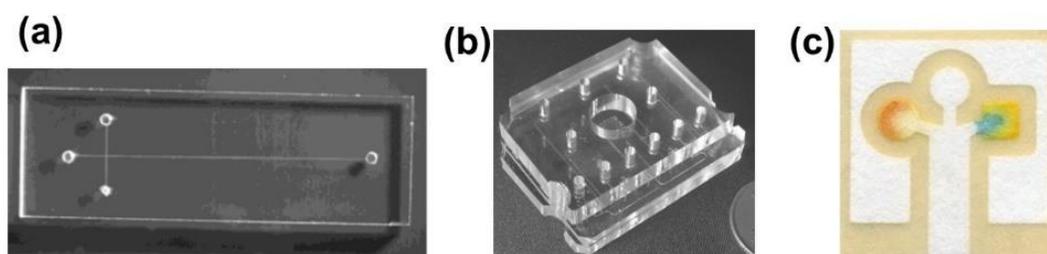


Figura 1-5. Ejemplo de microdispositivos construidos empleando (a) vidrio,<sup>45</sup> (b) elastómero PDMS,<sup>46</sup> y (c) papel.<sup>47</sup>

#### 1.2.2.1 Vidrio y sílice

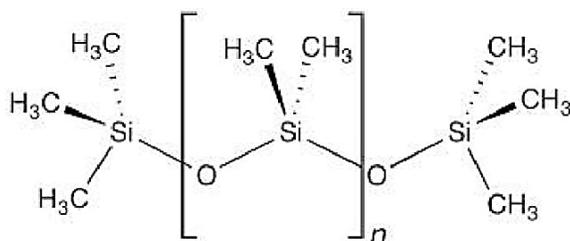
La primera generación de microdispositivos se fabricó empleando materiales inorgánicos como sílice o vidrio.<sup>48</sup> El vidrio es ópticamente transparente, no permeable a gases y eléctricamente aislante; los canales de vidrio grabado tienen paredes laterales redondeadas, a menos que se utilicen técnicas especiales de grabado.<sup>49</sup> Por el contrario, la sílice es opaca y las paredes de los canales verticales se crean en silicio cristalino. Debido a su compatibilidad con disolventes orgánicos, termoestabilidad, termoconductividad, facilidad para depositar metales y movilidad electrosmótica estable, los microdispositivos de sílice y vidrio son ampliamente empleados en la aplicación de electroforesis capilar.<sup>50</sup> Otras aplicaciones importantes incluyen reacciones químicas y síntesis de materiales micro y nanoestructurados.<sup>51,52</sup> Sin embargo, su principal desventaja es su elevado costo de fabricación y su baja compatibilidad con aplicaciones biológicas como cultivo celular.<sup>5</sup>

### 1.2.2.2 Polímeros: polidimetilsiloxano (PDMS)

Los microdispositivos a base de polímeros fueron introducidos muchos años después de los dispositivos de sílice/vidrio. En comparación con los materiales inorgánicos, existen una amplia variedad de polímeros haciéndolos de fácil acceso y más económicos y, por lo tanto, se han convertido en los materiales más utilizados. De acuerdo con sus propiedades físicas, los polímeros se pueden clasificar en tres grupos: elastómeros, termoestables y termoplásticos.<sup>5</sup> Los materiales elastoméricos tienen cadenas poliméricas débilmente reticuladas. Estas cadenas de polímero se pueden estirar bajo tensión externa, pero recuperan su estado original si se elimina la tensión. Los elastómeros son utilizados para realizar el proceso de litografía suave por moldeo de réplica, debido a que poseen un adecuado contacto con la superficie y pueden ser fácilmente removidos de las superficies rígidas y complejas que moldean debido a su elasticidad. El elastómero más popular dentro de la microfabricación es el PDMS, cuyas propiedades se describen a detalle en la siguiente sección.<sup>4,38</sup> A diferencia de los elastómeros, los termoestables tienen fuertes cadenas de polímeros reticulados, son materiales duros pero quebradizos, estables a altas temperaturas, resistentes a la mayoría de los disolventes orgánicos y ópticamente transparentes; los termoestables más empleados son la fotoresina SU-8 y la poliimida. Por último, los materiales termoplásticos constan de cadenas poliméricas débilmente unidas, estos materiales se ablandan y procesan a temperaturas entre el punto de transición vítrea y el punto de descomposición, además, una vez curados pueden volver a remodelarse múltiples veces calentándolos, otorgando una gran ventaja durante el proceso de microfabricación. Dentro de los termoplásticos típicos para microdispositivos se encuentran el polimetilmetacrilato (PMMA), el policarbonato (PC), el poliestireno (PS), el tereftalato de polietileno (PET), el cloruro de polivinilo (PVC) y el copolímero de olefina cíclica (COC).<sup>5,38</sup> La mayor ventaja de los microdispositivos construidos con polímeros es su elevada biocompatibilidad para aplicaciones bioquímicas.

El elastómero con mayor uso para la fabricación de microdispositivos por litografía suave por moldeo de réplica es el polidimetilsiloxano, mejor conocido como PDMS, un polímero lineal perteneciente a la familia de las siliconas de fórmula  $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ , en donde  $n$  corresponde al número de unidades monoméricas de  $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]$ , como se muestra en la Figura 1-6. Uno de los elastómeros de PDMS comercialmente disponible es Sylgard™ 184 de Dow Corning. Éste consiste en un kit que contiene dos partes: una base de silicona líquida (PDMS terminado en vinilo) y un catalizador o agente de curado (un complejo de platino y copolímeros de metilhidrosiloxano y dimetilsiloxano). La mezcla entre la base y el catalizador se vierte sobre el molde para realizar el proceso de litografía suave por moldeo de réplica; para remover las

burbujas presentes en el PDMS en estado líquido, el molde es sometido a una cámara de vacío. Posteriormente el PDMS se cura a temperatura ambiente (aproximadamente 2 días) o bajo una temperatura entre 40 – 120 °C (un par de horas). Así, La mezcla líquida se convierte en un elastómero sólido reticulado mediante la reacción de hidrosilación entre los grupos vinilo ( $\text{SiCH}=\text{CH}_2$ ) y los grupos hidrosilano ( $\text{SiH}$ ).<sup>4,53</sup>



**Figura 1-6.** Estructura química del elastómero de poldimetilsiloxano (PDMS), en donde  $n$  corresponde al número de unidades monoméricas de  $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$ .

Varias características hacen del PDMS un material llamativo para la fabricación de microdispositivos relacionados a la investigación en cultivo celular y ensayos bioquímicos, algunas de estas propiedades son: facilidad de manejo y fabricación, su baja tensión superficial facilita el desmontaje de moldes con patrones complejos después de ser curado, además de que los microcanales de los microdispositivos de PDMS pueden ser sellados reversiblemente a vidrio u otra pieza de PDMS por simple contacto entre ellos, o bien, irreversiblemente a través de la oxidación de la superficie del PDMS con plasma o usando una capa delgada de PDMS como pegamento, es químicamente inerte, biocompatible, elástico, transparente en las regiones del ultravioleta y visible, permeable a gases (lo que lo hace un material para el cultivo celular), posee buena estabilidad térmica, baja polaridad (compatible con disolventes polares y reacciones en medio acuoso), y su costo de fabricación es relativamente bajo en comparación con el de otro tipo de materiales como vidrio.

A pesar de las múltiples ventajas que el PDMS ofrece, es claro que no se trata de un material universal. Debido a su elevada hidrofobicidad, puede provocar la formación de burbujas dentro de microcanales que contienen soluciones acuosas y dificultar el llenado de reservorios, además se hincha en contacto con disolventes orgánicos y puede adsorber pequeñas moléculas hidrofóbicas.<sup>53,54</sup> Con el objetivo de modificar la superficie inerte de PDMS se han desarrollado diversos métodos, siendo el más usado el tratamiento con plasma. El plasma está compuesto por oxígeno ionizado a alta energía y se implementa para cambiar la polaridad de la superficie de

PDMS de hidrofóbica a hidrofílica a través de su oxidación, así, los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) son transformados a grupos silanol ( $\text{Si}-\text{OH}$ ); la naturaleza hidrofílica obtenida posee baja estabilidad, manteniéndose por menos de tres horas en presencia de soluciones acuosas o disolventes polares, sin embargo, la superficie de PDMS puede modificarse permanentemente mediante el proceso de silanización. Éste consiste en un recubrimiento covalente eficaz para modificar la superficie del PDMS una vez que se encuentra activa con grupos  $\text{Si}-\text{OH}$  por medio del uso de agentes de acoplamiento de silano, los cuales reaccionan fácilmente con la superficie hidroxilada introduciendo grupos activos como aminas o carboxilos. Entre los agentes de acoplamiento de silano más empleados se encuentra el (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES).<sup>55</sup>

### 1.2.2.3 Hidrogeles

Los hidrogeles son geles poliméricos hidrofílicos formados por una red tridimensional que tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder su forma, más del 99 % de su contenido puede ser agua, son muy porosos con tamaños de poro controlables, lo que permite que pequeñas moléculas o incluso biopartículas se difundan a través de él. Este material se ha utilizado ampliamente en el campo de la investigación biomédica debido a su característica favorable para ser utilizados como vehículos de liberación controlable.<sup>56</sup> Así, construyendo microcanales con hidrogeles se puede lograr el suministro de soluciones, células y otras sustancias; válvulas, sensores de flujo, reguladores de pH, bombas, mezcladores, sistemas de administración de fármacos y dispositivos de refrigeración fluidica son otras de las funciones de los hidrogeles.<sup>57</sup> Debido a la combinación de su naturaleza acuosa, alta permeabilidad y biocompatibilidad, los hidrogeles son perfectos para cultivo celular 3D. Algunos ejemplos de hidrogeles empleados son Matrigel y colágeno de origen animal, alginato y agarosa de origen vegetal, así como polietilenglicol (PEG) y poliacrilamida (PAM) de origen sintético.<sup>5</sup>

### 1.2.2.4 Papel

Los dispositivos de microfluídica construidos en papel poseen un alto potencial para ser empleados en análisis portátiles a un muy bajo costo. El papel, una matriz altamente porosa hecha de celulosa, es excelente para la absorción de líquidos. Para la formación de microcanales determinadas áreas del papel son modificadas hidrófobamente, así, la solución acuosa aplicada sobre el papel será guiada con precisión a través de la región hidrófila por efecto capilar. La fabricación de microdispositivos de papel es relativamente simple, de manera general, cualquier método que genere un patrón hidrofóbico sobre el papel es factible, como es el caso de la

fotolitografía o métodos de impresión con cera o cortado.<sup>58</sup> Los microdispositivos de papel presentan múltiples ventajas: no requieren de bombas o componentes externos ya que el microcanal actúa como una bomba dosificadora pasiva, los canales se pueden usar para almacenar reactivos simplemente secando el área empapada, además el papel es uno de los materiales más baratos para fabricación. Sin embargo, los métodos de detección en este tipo de dispositivos son relativamente limitados y presentan baja sensibilidad; dentro de las estrategias de detección se encuentra la colorimetría, luminiscencia y detección electroquímica, siendo la colorimetría la más empleada debido a su simplicidad por medio de la captura de imágenes en la zona de detección.<sup>5</sup>

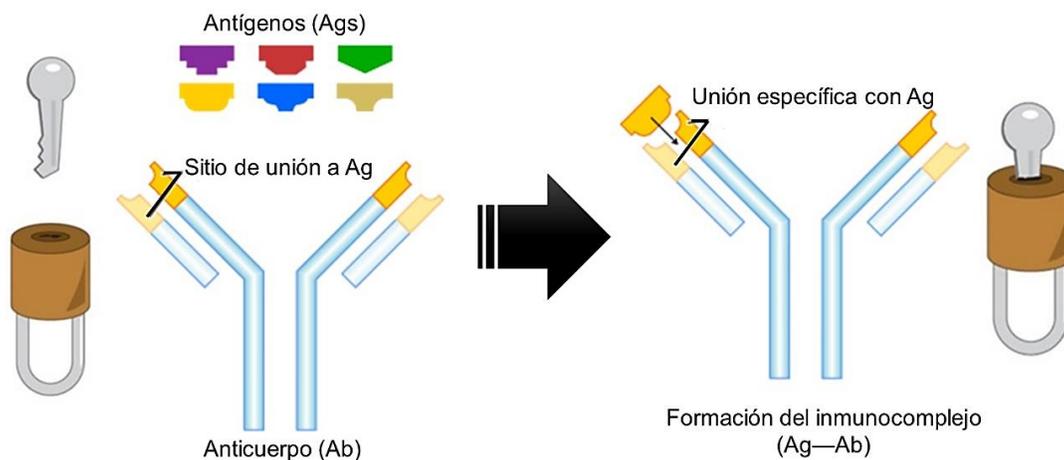
### 1.3 Microdispositivos para diagnóstico clínico

Debido a las múltiples ventajas que ofrecen, los microdispositivos se han convertido en plataformas cada vez más atractivas para aplicaciones en el área de diagnóstico clínico, ya que no sólo disminuyen drásticamente el volumen requerido para el ensayo, sino que también aceleran el procesamiento y lectura de muestras.<sup>7</sup> La creciente necesidad de llevar diagnósticos adecuados y oportunos a países/comunidades con niveles de pobreza extrema, así como brindar tratamientos oportunos a enfermedades, son algunas de las razones por las que se ha potencializado el uso de sistemas microfluídicos para crear dispositivos portátiles de diagnóstico, también conocidos como dispositivos de diagnóstico *point-of-care* (POC);<sup>9</sup> centralizando esfuerzos e invirtiendo recursos para el desarrollo y la evaluación de nuevos sustratos, técnicas de microfabricación y métodos de detección para lograr la creación de dispositivos POC portátiles, robustos y asequibles.<sup>11,12,59</sup>

#### 1.3.1 Inmunoensayos en microdispositivos

Un inmunoensayo es una valiosa técnica analítica basada en el reconocimiento molecular entre un anticuerpo (Ab) y un antígeno (Ag), dando como resultado la formación de un inmunocomplejo. Los anticuerpos son un tipo de proteínas denominadas inmunoglobulinas producidas en animales y en el cuerpo humano como una respuesta inmunológica a la presencia de sustancias ajenas o extrañas al organismo mejor conocidas como antígenos. Cada anticuerpo tiene una estructura única que es capaz de reconocer un antígeno en específico con una alta especificidad y afinidad a través de un mecanismo de llave-cerradura, es decir, poseen una estructura complementaria (Figura 1-7). Los inmunoensayos pueden emplearse para detectar tanto anticuerpos como antígenos, aprovechando la sensibilidad y especificidad de la interacción del inmunocomplejo formada Ag—Ab. Por lo tanto, han sido ampliamente utilizados para la

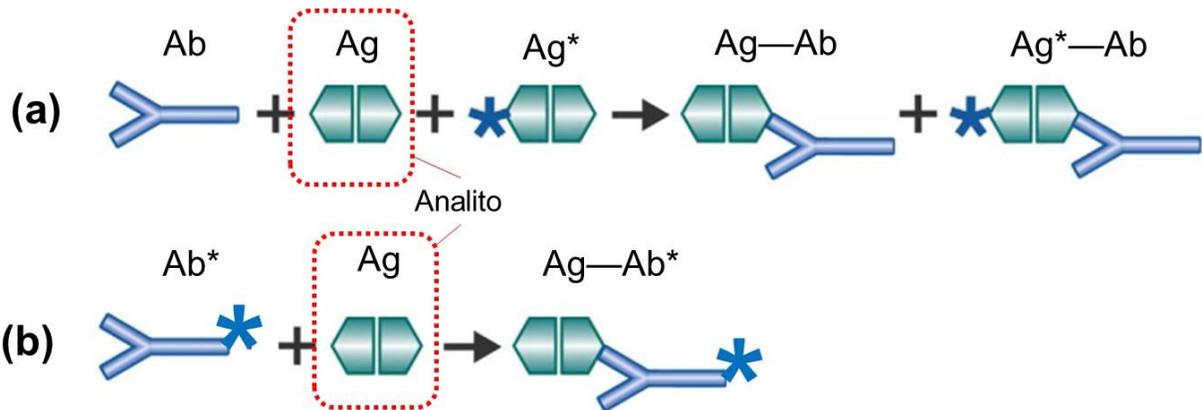
cuantificación de moléculas diana (*target*) en gran variedad de aplicaciones como lo es: diagnóstico clínico, proteómica, análisis farmacéutico, pruebas ambientales, seguridad alimentaria e investigaciones científicas básicas.<sup>13,14,60</sup>



**Figura 1-7.** Esquema representativo de un modelo llave-cerradura para la unión de un anticuerpo (Ab) a un antígeno (Ag) específico durante un inmunoensayo formando un inmunocomplejo (Ag—Ab).

Para llevar a cabo la detección del analito, los inmunoensayos requieren del uso de un anticuerpo o antígeno marcado ( $Ab^*$  o  $Ag^*$ ), este marcaje suele realizarse empleando enzimas que provocan un cambio en el color de la solución o un marcador fluorescente. De acuerdo con el método de medición, los inmunoensayos se clasifican en competitivos y no competitivos. En el formato competitivo, un antígeno (analito) compite con un antígeno marcado ( $Ag^*$ ) por un número limitado de sitios de unión a un anticuerpo, de tal forma que al aumentar la cantidad de antígenos no marcados en la muestra, la cantidad de  $Ag^*$  unidos a los anticuerpos disminuye, lo que da como resultado una disminución en la señal al detectar la unión  $Ag^* - Ab$ , por lo que, en un inmunoensayo competitivo, la concentración del antígeno marcado  $Ag^*$  es inversamente proporcional a la concentración del analito (Ag) (Figura 1-8(a)). Mientras que, en un inmunoensayo no competitivo, los antígenos son conjugados con una cantidad en exceso de anticuerpos marcados ( $Ab^*$ ) para formar un complejo  $Ag - Ab^*$ , aquí, la señal analítica es directamente proporcional a la cantidad de antígenos presentes en la muestra (Figura 1-8(b)).<sup>14</sup> Otra clasificación de los inmunoensayos se realiza con base en el medio en donde se lleva a cabo la medición, dividiéndose en homogéneos y heterogéneos. En un inmunoensayo homogéneo, la medición de la señal analítica generada por la formación del inmunocomplejo se realiza directamente en el mismo medio en donde la unión de  $Ag - Ab$  se llevó a cabo. Por su parte,

cuando se realiza un inmunoensayo heterogéneo, los anticuerpos o antígenos son inmovilizados sobre un soporte sólido en donde ocurre la formación del complejo, en este tipo de ensayo la señal generada se mide en un medio diferente al utilizado para la unión del inmunocomplejo, lo que implica una etapa intermedia de lavado para eliminar interferencias.<sup>14</sup>



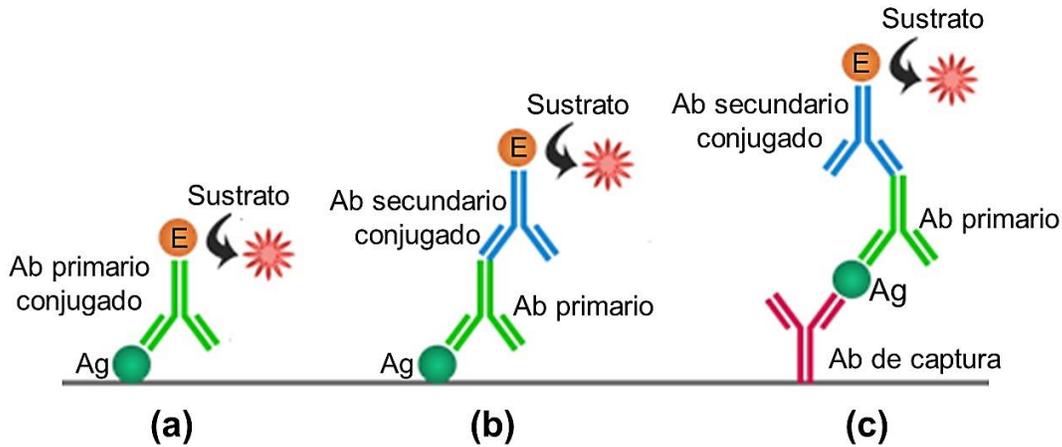
**Figura 1-8.** Representación de un inmunoensayo (a) competitivo y (b) no competitivo, en donde se cuantifica al analito Ag empleando anticuerpos o antígenos marcados (Ab\* o Ag\*).

Dentro de los inmunoensayos, aquellos que emplean un marcador enzimático que se conjuga covalentemente con un ligando son de los más utilizados. Este ligando puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno o un anticuerpo para el anticuerpo primario. A este tipo de ensayo se le da el nombre de “ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas” mejor conocido como ELISA por sus siglas en inglés (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Casi todas estas pruebas son ensayos en fase sólida en donde se adsorbe un antígeno o anticuerpo sobre un soporte sólido; existen muchas variaciones de este método, pero en todas ellas se requiere de un paso de lavado para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado, así como la adición de un sustrato enzimático para medir la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato.<sup>61</sup> Los tipos de ELISA más comunes se muestran en la Figura 1-9, entre ellos se encuentran:

- (a) ELISA directo: es el ensayo más sencillo y rápido de todos, en donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se une directamente al antígeno de interés permitiendo su detección después de la adición de un sustrato.
- (b) ELISA indirecto: es parecido al ensayo ELISA directo, pero este requiere de un paso extra, amplificando así la señal obtenida. En este caso se emplean dos anticuerpos, uno primario

y otro secundario, éste último se encuentra marcado con una enzima que reacciona con el sustrato adicionado.

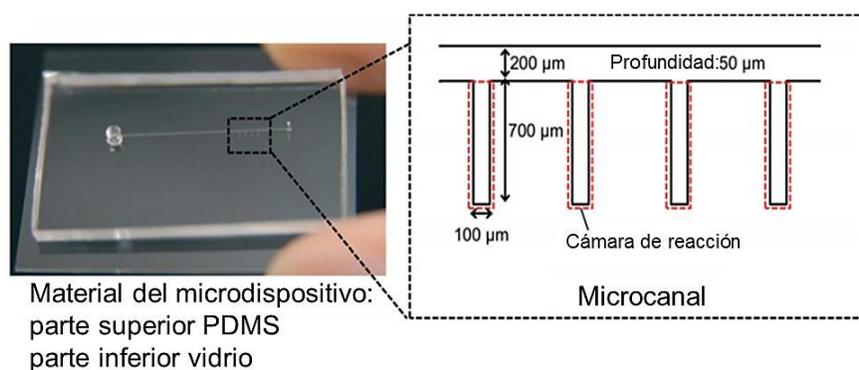
- (c) ELISA tipo sándwich: en este ensayo el antígeno queda inmobilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección (Ab primario), conocidos como pares de anticuerpos, los cuales se unen en diferentes sitios a un mismo antígeno. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se une al anticuerpo de detección.



**Figura 1-9.** Tipos de pruebas ELISA más utilizadas. (a) ELISA directo, (b) ELISA indirecto, y (c) ELISA tipo sándwich. En donde E representa a una enzima conjugada, Ab un anticuerpo y Ag un antígeno.

De manera general, los inmunoensayos requieren de una serie de pasos de lavado, mezclado e incubación, que suelen ser laboriosos y consumir bastante tiempo, tomando algunas horas para su realización, estos se realizan empleando microplacas de titulación los cuales poseen múltiples pocillos en donde se lleva a cabo la reacción. La mayoría del tiempo requerido para efectuar un inmunoensayo se debe a los largos tiempos de incubación atribuidos a la ineficiencia en el transporte de masa de los reactivos de la solución hasta la superficie en donde ocurre la conjugación.<sup>62</sup> Considerando que los reactivos requeridos para un inmunoensayo son relativamente caros, su consumo puede disminuirse en gran medida si se trabaja con sistemas microfluídicos. Los microdispositivos no sólo disminuyen el consumo de reactivos o muestra, sino también simplifican el procedimiento reduciendo el tiempo de ensayo y mejorando la eficiencia de la reacción. Debido a sus múltiples ventajas, en los años recientes se han reportado extensas investigaciones empleando microdispositivos para el desarrollo de inmunoensayos tanto del tipo homogéneo como heterogéneo con diferentes métodos de detección.<sup>14</sup> Los inmunoensayos heterogéneos son los más empleados, en donde uno de los pasos primordiales es la inmovilización del antígeno o anticuerpo sobre el mismo microcanal o empleando algún soporte sólido, los cuales serán discutidos a detalle en la siguiente sección.

Algunos de los trabajos reportados para la implementación de inmunoensayos en microdispositivos incluyen la cuantificación de fármacos,<sup>60,63,64</sup> cuantificación de proteínas en general,<sup>65,66</sup> hormonas,<sup>67</sup> biomarcadores,<sup>17,68-70</sup> toxinas en matrices alimenticias,<sup>15,71</sup> entre otra gran variedad de aplicaciones. Hoy en día, pueden consultarse diferentes artículos de revisión que incluyen algunos de los trabajos más representativos en esta área.<sup>13,14,72,73</sup> De manera general, estos trabajos han demostrado que los inmunoensayos en microdispositivos poseen al menos tres ventajas sobre los métodos convencionales de detección: (1) incrementan la relación área superficial/volumen acelerando así la velocidad de conjugación anticuerpo-antígeno; (2) menores dimensiones reducen el consumo de reactivos costosos y el precio de las muestras; y (3) un manejo automático o semiautomático del fluido puede mejorar la reproducibilidad y rendimiento.<sup>72</sup> En la Figura 1-10 se muestra un ejemplo de un microdispositivo empleado para la realización de un inmunoensayo homogéneo para la cuantificación del fármaco teofilina en muestras de sangre total.



**Figura 1-10.** Ejemplificación del diseño de un microdispositivo de PDMS y vidrio para la realización de un inmunoensayo homogéneo para la detección de teofilina.<sup>63</sup>

### 1.3.1.1 Inmovilización en inmunoensayos heterogéneos

La inmovilización del antígeno o anticuerpo es el paso primordial para la realización de un inmunoensayo heterogéneo, ya que influye directamente sobre la especificidad y sensibilidad del método. De manera general, los inmunoensayos heterogéneos en microdispositivos pueden clasificarse en dos grupos: (1) los que están basados en la modificación de la superficie del microcanal para la posterior inmovilización de las proteínas y (2) los que emplean la inmovilización sobre microesferas o algún otro tipo de soporte sólido. El procedimiento para la inmovilización sobre la superficie del microcanal requiere de pasos adicionales durante el proceso de microfabricación y puede conducir a una reproducibilidad y repetibilidad baja. En cambio, la inmovilización empleando microesferas o algún otro tipo de soporte sólidos puede efectuarse

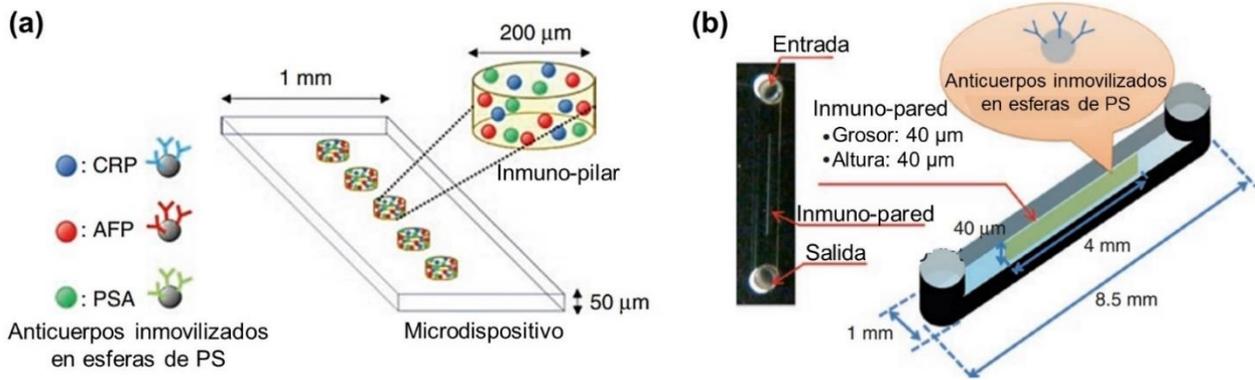
fuera del microdispositivo y esto ofrece significativamente una mayor área de superficie para la inmovilización, mejorando así el funcionamiento del inmunoensayo por la aceleración de la cinética de reacción.<sup>74,75</sup> Los soportes sólidos, pueden clasificarse en no magnéticos y magnéticos, los cuales serán descritos a detalle en las siguientes secciones.

#### 1.3.1.1.1 Soportes sólidos no magnéticos

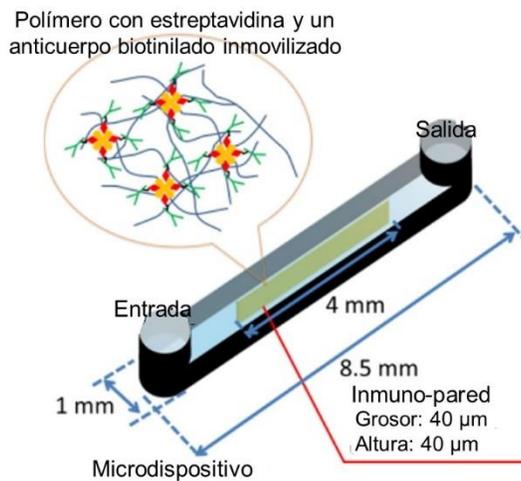
Dentro de los soportes sólidos no magnéticos los materiales más empleados son microesferas de poliestireno (PS) y vidrio debido a sus características ampliamente estudiadas y conocidas; generalmente estas microesferas son funcionalizadas con estreptavidina para después poder ser conjugadas con un anticuerpo o antígeno biotinilado por medio de la interacción estreptavidina-biotina. Además, la mayoría de estas microesferas no magnéticas requieren de la fabricación de microestructuras para lograr la retención de éstas dentro de los microcanales para la realización de la inmunoreacción.<sup>76,77</sup>

Otros soportes sólidos no magnéticos son los inmuno-pilares, reportados en el año 2010 por Ikami *et al.*,<sup>70</sup> estos consisten de una estructura de hidrogel en forma de pilares fabricada dentro del microcanal, este pilar contiene inmovilizados anticuerpos sobre microesferas de poliestireno de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro para la detección de tres diferentes biomarcadores: proteína-C reactiva (CRP),  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) y antígeno prostático específico (PSA) (Figura 1-11(a)). Una variación de este soporte sólido son los microdispositivos de inmuno-pared (Kasama *et al.*<sup>78</sup>), en ellos el hidrogel, que contiene anticuerpos inmovilizados en microesferas de poliestireno, se extiende como una estructura larga y delgada dentro del microcanal (Figura 1-11(b)). En contraste con los inmuno-pilares, la inmuno-pared ofrece un lavado más eficiente de reactivos y anticuerpos marcados no enlazados, además de un método de detección más rápido.<sup>73</sup> Otra modificación propuesta para mejorar las inmuno-paredes es su fabricación por medio de un polímero fotosensible soluble en agua, BIOSURFINE®-AWP (Toyo Gosei Co., Ltd.). Para su construcción, estreptavidina en solución amortiguadora de fosfatos (10 mg/mL) se mezcla en una relación 1:1 con BIOSURFINE®-AWP en un microtubo. La mezcla se introduce al microcanal y se irradia durante 5 s con luz UV (320 nm, 20 mW) a través de una fotomáscara que cubre el microcanal. De esta forma el polímero se reticula al mismo tiempo que se inmovilizan moléculas de estreptavidina. Después de la exposición a luz UV, el polímero sin curar se succiona con un aspirador y el microcanal es lavado, formándose así la inmuno-pared en el centro del microcanal (Figura 1-12). Este tipo de inmuno-pared inmoviliza anticuerpos biotinilados, tan sólo basta con introducir al microcanal al anticuerpo e incubarlo a temperatura ambiente durante 60 min.<sup>73,79</sup> Una aplicación

de este tipo de soporte sólido fue reportada por Nishiyama *et al.*,<sup>17</sup> en dónde se emplea un inmunoensayo heterogéneo tipo sándwich con detección fluorescente para la cuantificación de proteína-C reactiva, un biomarcador de inflamación en el cuerpo humano.



**Figura 1-11.** Representación de dos diferentes soportes sólidos no magnéticos: (a) Inmuno-pilar para la detección de proteína-C reactiva (CRP),  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) y antígeno prostático específico (PSA); (b) Inmuno-pared. Adaptados de las referencias Ikami *et al.*<sup>70</sup> y Kasama *et al.*<sup>78</sup> respectivamente.



**Figura 1-12.** Representación de un dispositivo de inmuno-pared construido a partir de BIOSURFINE®-AWP, un polímero fotosensible soluble en agua, y estreptavidina. La inmuno-pared resultante posee estreptavidina inmovilizada que puede conjugarse con un anticuerpo biotinilado. Adaptada de la referencia (Kasama *et al.*<sup>79</sup>)

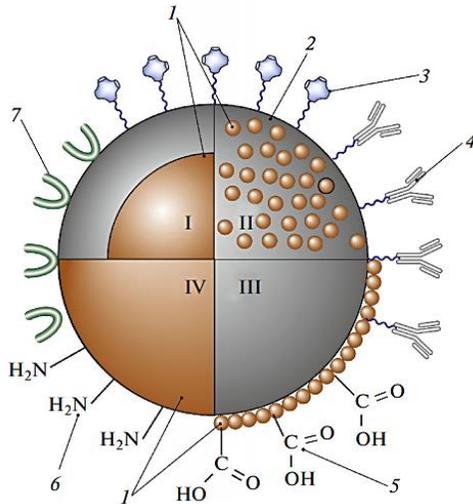
### 1.3.1.1.2 Soportes sólidos magnéticos

El uso de microesferas magnéticas para la realización de inmunoensayos en microdispositivos se ha aplicado para aumentar el área de superficie disponible para la formación del

inmunocomplejo, además de que elimina la necesidad de requerir microestructuras para su retención física dentro del microcanal. En este tipo de inmunoensayos, las microesferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo/antígeno son inmovilizadas en el área deseada por medio de la manipulación de un campo magnético, ya sea a través del uso de un imán o un campo electromagnético, permitiendo una rápida separación del analito de interés del resto de la mezcla de reacción.<sup>14,72</sup>

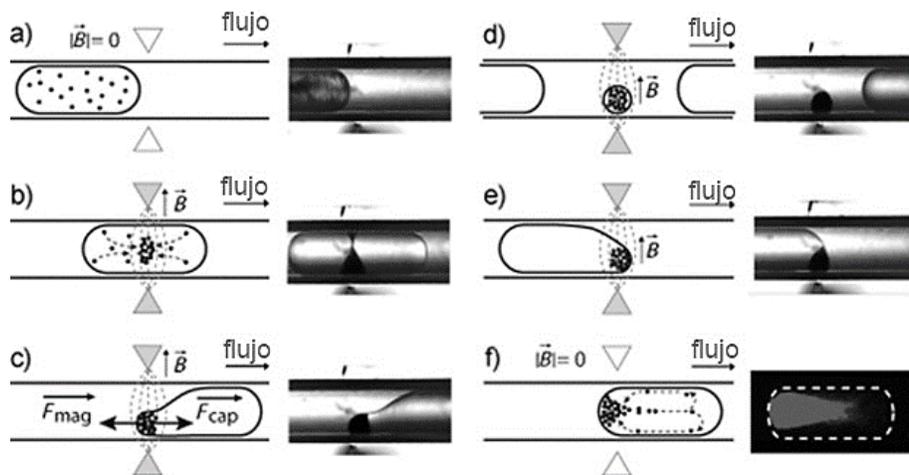
Dentro de este tipo de soportes sólidos, las nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de hierro como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y su forma oxidada hematita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sintetizadas por el método de co-precipitación química a partir de las sales de Fe(II) y Fe(III) en un medio básico,<sup>80</sup> son de gran interés para aplicaciones biomédicas como los inmunoensayos debido principalmente a que su comportamiento paramagnético y tamaño pequeño (1 a 100 nm) les confiere una fácil manipulación dentro de un microcanal. Además, la aplicación de un campo magnético facilita su concentración para ser transferidas de una solución a otra. Así, una reacción homogénea se combina eficientemente con una separación heterogénea.<sup>81</sup> Sin embargo, una de las limitaciones durante su síntesis es realizar un correcto recubrimiento que le otorgue estabilidad a la nanopartícula, para ello se ha estudiado el uso de oro como un revestimiento favorable debido a su simple procedimiento sintético (reducción de  $\text{Au}^{3+}$  en la superficie de la nanopartícula con hidroxilamina) y sus propiedades fisicoquímicas.<sup>82,83</sup> Estas nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro (GMNPs) presentan una excelente estabilidad y buena biocompatibilidad, por lo que en las últimas décadas se han realizado estudios para su funcionalización con la finalidad de tener una aplicación bioquímica específica.<sup>83,84</sup> Una de las funcionalizaciones más común es a través de la unión covalente de la superficie de la nanopartícula con estreptavidina empleando glutaraldehído y cisteamina para su posterior conjugación con un anticuerpo biotinilado.<sup>85</sup> También pueden ser fácilmente recubiertas empleando moléculas orgánicas anfifílicas, como ácido láurico, surfactantes, carboxilatos, etc. Asimismo, el recubrimiento con aminoácidos brinda la oportunidad de incluir diversos grupos funcionales como el grupo amino, carboxílico, guanidina, tiol, fenólico e hidroxilo, para modificaciones posteriores. Otro tipo de recubrimiento muy común es a través del uso de polímeros como polietilenglicol (PEG).<sup>86</sup> Hoy en día también se cuenta con kits comerciales de MNPs de diferente tamaño que facilitan su funcionalización con péptidos y proteínas para su posterior aplicación.

La Figura 1-13 muestra un ejemplo de las posibles estructuras y modificaciones que pueden realizarse a las MNPs.



**Figura 1-13.** Representación de diferentes estructuras de MNPs. (I) MNP recubierta por un polímero (*core-shell*); (II) Nanopartícula de polímero con una matriz de MNPs incrustada; (III) Nanopartícula con núcleo de polímero y un recubrimiento de MNPs; (IV) MNP sin recubrimiento. (1) Partículas magnéticas de óxidos metálicos (Fe, Ni, Co); (2) revestimiento (polímeros, carbono, óxido de aluminio, oro); (3) estreptavidina; (4) anticuerpos; (5) grupos carboxilo; (6) grupos amino; (7) proteínas.<sup>81</sup>

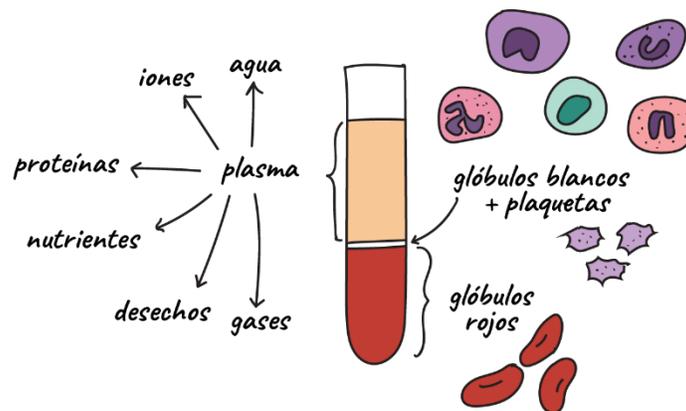
El trabajo publicado por el grupo de investigación de Malaquin *et al.*<sup>87</sup> muestra algunas de las ventajas del uso de MNPs en inmunoensayos; éste reporta el desarrollo de un microdispositivo que procesa gotas con volumen menor a 100 nL en donde se encuentran suspendidas MNPs conjugadas con un anticuerpo para la realización de un inmunoensayo heterogéneo rápido. La manipulación de las MNPs se realiza a través del uso de pinzas magnéticas que permiten efectuar los pasos de captura, extracción, mezclado y lavado que implica un inmunoensayo, logrando así la retención de las nanopartículas magnéticas y su posterior resuspensión mientras un tren de gotas de reactivos fluye a través del microcanal (Figura 1-14). El método desarrollado fue probado por medio de un inmunoensayo para el diagnóstico de hipotiroidismo congénito neonatal, detectando la hormona tirotrópica (THS).



**Figura 1-14.** Diagrama de pasos para la manipulación de MNPs con pinzas magnéticas: a) partículas suspendidas en una gota, b) confinamiento de partículas, c) deformación de la gota, d) extracción MNPs, e) MNPs se fusionan en una nueva gota, f) resuspensión de partículas. Los triángulos que representan las pinzas magnéticas son grises cuando están activadas y blancos cuando están inactivas.<sup>87</sup>

### 1.3.2 Microdispositivos para separación de plasma sanguíneo

La sangre es considerada como uno de los fluidos más importantes para diagnóstico clínico. Los exámenes sanguíneos brindan la oportunidad para lograr entender el correcto funcionamiento del cuerpo humano y conocer posibles estados fisiológicos y bioquímicos para un diagnóstico oportuno.<sup>88,89</sup> La sangre total está compuesta de eritrocitos (glóbulos rojos), linfocitos (glóbulos blancos), plaquetas y plasma (Figura 1-15).<sup>26</sup> En humanos adultos, los eritrocitos ocupan aproximadamente el 45 % del volumen total de sangre total, lo que se conoce como porcentaje de hematocrito (% HCT).<sup>23</sup> El plasma, que representa alrededor del 55 % de la sangre total, está compuesto por más de 95 % de agua en donde se encuentran varios biomarcadores, ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos.<sup>90</sup> Debido a que la detección de anticuerpos y antígenos presentes en plasma sanguíneo permiten el diagnóstico de enfermedades, la correcta cuantificación de estos biomarcadores depende en gran medida a la correcta toma y preparación de la muestra, siendo la separación de plasma un paso crucial para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades debido a que las pruebas bioquímicas en sangre se realizan en plasma sin la presencia de células sanguíneas que pudieran interferir en los resultados.<sup>91</sup>

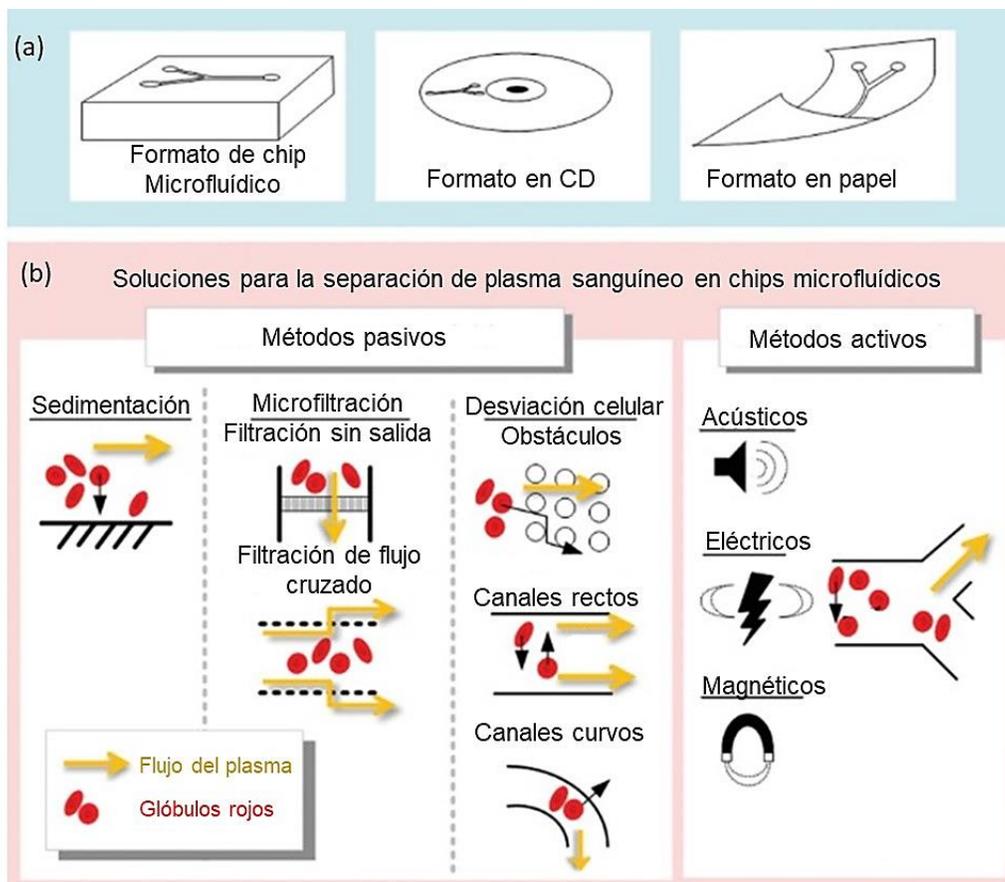


**Figura 1-15.** Representación de la composición química de una muestra de sangre total.

La centrifugación es la técnica convencional más utilizada para la separación de plasma sanguíneo en laboratorios clínicos, sin embargo, posee algunas limitaciones: puede provocar daño celular si no se emplea adecuadamente (hemólisis de eritrocitos), además de consumir tiempo y ser relativamente caro.<sup>91-93</sup> Es por ello que se ha investigado el uso de microdispositivos como un método alternativo para la separación de plasma, aprovechando las grandes ventajas que ofrecen, entre ellas la manipulación de volúmenes muy pequeños de muestra. Las principales

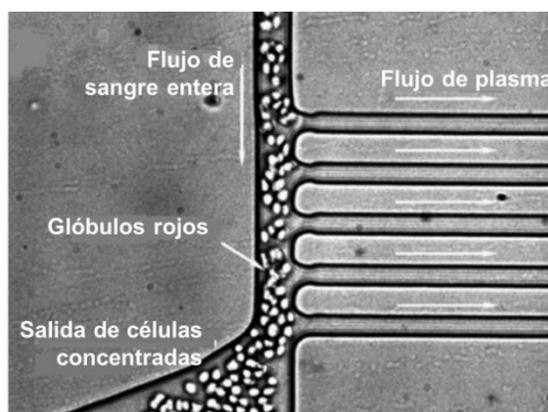
características que debe reunir un microdispositivo para tener una correcta separación de plasma son una alta eficiencia y pureza de separación, así como daño celular mínimo para evitar su contaminación. Sin embargo, uno de los mayores retos a enfrentar para lograr la separación microfluídica de plasma sanguíneo se debe a la complejidad de la matriz de la sangre total.<sup>20,90</sup>

En los últimos años, se han estudiado diferentes soluciones para lograr la separación de plasma empleando tres formatos diferentes de dispositivos: chip microfluídico, formato en CD y en papel (Figura 1-16(a)); la mayoría de los trabajos reportados se han realizado haciendo uso de chip microfluídicos con separación pasiva o activa.<sup>90</sup> La separación pasiva se lleva a cabo por medio de fuerzas hidrodinámicas y físicas en donde las células sanguíneas son separadas exclusivamente por sus propiedades mecánicas, capacidad de deformación, tamaño y forma, debido al uso de microestructuras o cambios en la geometría de los microcanales.<sup>94</sup> Por su parte, una separación activa requiere del uso adicional de un campo externo, ya sea acústico, eléctrico o magnético<sup>90</sup> (Figura 1-16(b)).



**Figura 1-16.** Soluciones reportadas para la separación de plasma a microescala. (a) Formatos empleados para la separación de plasma. (b) Formas de separación en formato de chip microfluídico; técnicas de separación pasivas y activas.<sup>90</sup>

Muchos son los trabajos que han reportado la separación microfluídica de plasma sanguíneo. La mayoría de ellos son capaces de alcanzar valores altos de pureza de separación, pero requieren de una dilución previa de la muestra de sangre de hasta 100 veces. Pocos han conseguido alcanzar la separación de plasma de sangre humana entera debido al reto que implica lograr la separación de más de cinco millones de células por microlitro de sangre.<sup>23</sup> La mayoría de los métodos reportados están basados en mecanismos de desviación celular como: la incorporación de obstáculos<sup>95</sup> y fuerzas hidrodinámicas,<sup>96,97</sup> siendo el efecto centrífugo<sup>25</sup> y el efecto Zweifach-Fung (ley de la bifurcación)<sup>24,98,99</sup> unos de los más empleados; dichos efectos serán explicados a detalle en las siguientes secciones. En la Figura 1-17 se muestra un ejemplo del funcionamiento de un microdispositivo que emplea la ley de la bifurcación para la separación de plasma sanguíneo reportado por Yang *et al.*<sup>24</sup>

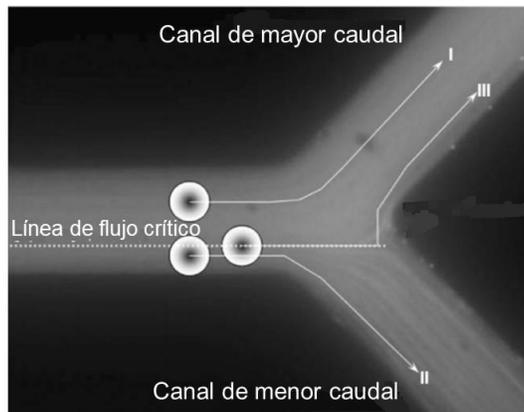


**Figura 1-17.** Imagen del funcionamiento de un microdispositivo basado en la ley de la bifurcación para la separación de plasma empleando una muestra de sangre de oveja (36 % HCT) y un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .<sup>24</sup>

### 1.3.2.1 Ley de la bifurcación

Cuando una suspensión de partículas alcanza microcanales divididos en dos canales de caudales diferentes, tienden a viajar hacia el microcanal de caudal más alto, dejando sólo unas pocas partículas fluyendo hacia el microcanal de caudal más bajo. Este comportamiento es conocido como efecto Zweifach-Fung o ley de la bifurcación. Para aumentar el número de partículas viajando hacia el microcanal de caudal más alto y alcanzar la máxima eficiencia de separación, diferentes parámetros pueden ser modificados como el ángulo entre los dos microcanales, y el ancho de los mismos.<sup>100</sup> Este fenómeno puede observarse en la microcirculación, cuando los eritrocitos (considerados como partículas) fluyen a través de una región de bifurcación dentro de los vasos sanguíneos capilares. La razón de este comportamiento se atribuye al gradiente de presión más alto al que están sujetas las células en el canal de mayor caudal, además de la distribución asimétrica de las fuerzas de corte sobre la superficie de la célula,

lo que produce un esfuerzo de torsión sobre la misma, empujándola hacia el canal de mayor caudal. Dentro del canal, antes de llegar a la bifurcación, se cuenta con una línea de flujo crítico; si el centroide de la célula se ubica lejos del área del caudal menor y por encima de la línea de flujo crítico, fluirá hacia el canal de caudal más alto. Por lo tanto, cuanto mayor sea la diferencia entre el caudal de los dos canales, la línea de flujo crítico se formará más cerca del canal de caudal bajo, como se muestra en la línea discontinua en la Figura 1-18.<sup>24</sup>



**Figura 1-18.** Representación esquemática del efecto Zweifach-Fung (ley de la bifurcación). Una partícula (I) cuyo centroide está por encima de la línea de flujo crítico fluirá hacia el canal de mayor caudal. Una partícula (II) cuyo centroide está debajo de la línea de flujo crítico viajará al canal de caudal menor. Una partícula (III) cuyo centroide está sobre la línea de flujo crítico fluirá hacia el canal de mayor caudal debido al efecto Zweifach-Fung.<sup>24</sup>

### 1.3.2.2 Efecto centrífugo

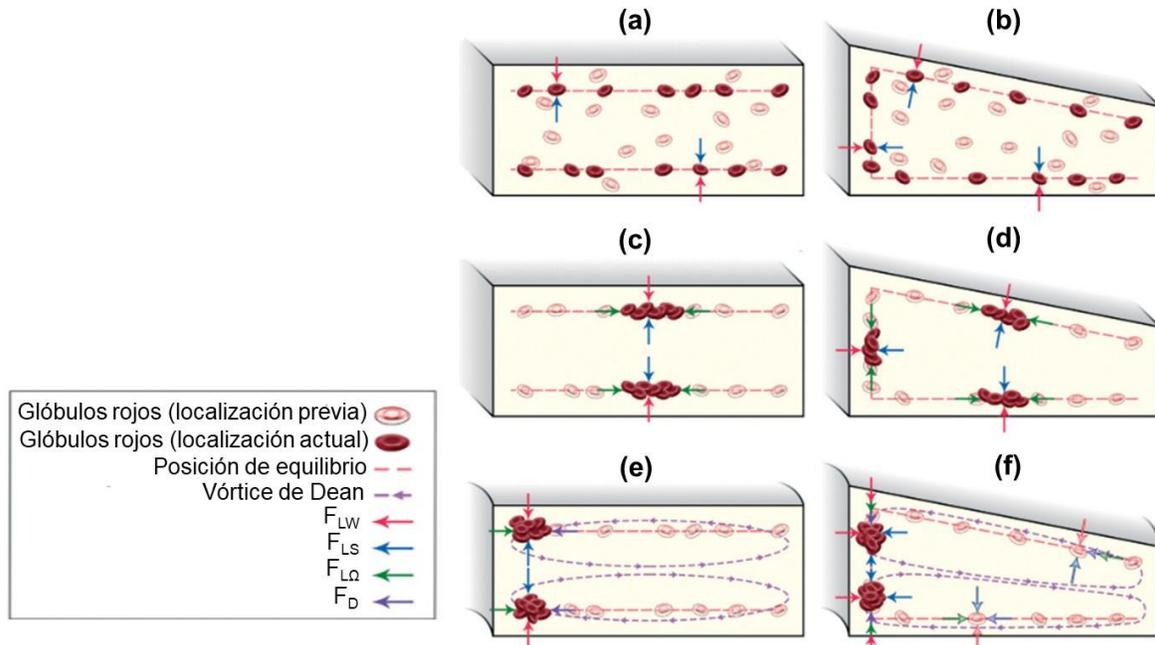
Cuando un fluido viaja a través de un canal curvilíneo, la velocidad del flujo cerca de la pared exterior del microcanal es mucho mayor que el de la pared interior (aceleración centrífuga). Este comportamiento se atribuye al hecho de que el fluido debe recorrer una mayor distancia para mantenerse en la pared externa del canal. Esta diferencia de velocidades da lugar a una aceleración radial que guía al fluido desde la pared interior hacia la pared exterior conduciendo a la formación de dos vórtices en la mitad superior e inferior del microcanal, conocidos como vórtices de Dean.<sup>25,101,102</sup>

La magnitud de este flujo secundario formado, llamado flujo de Dean, es cuantificable por medio del cálculo del número de Dean ( $De$ ), de acuerdo con la Ecuación 1-2; en donde  $R$  es el radio de la curvatura del canal,  $Re$  es el número de Reynolds, y  $D_h$  es el diámetro hidráulico del microcanal.

$$De = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}} \quad \text{Ecuación 1-2}$$

Dentro de los microcanales curvos, el valor de  $De$  aumenta al trabajar con una curvatura mayor (valor de  $R$  más pequeño), un mayor diámetro hidráulico ( $D_h$ ) y un mayor caudal ( $Re$  mayor). Así, si el valor de  $De$  aumenta, el flujo secundario formado dentro del microcanal también lo hace.<sup>103</sup> Esto afecta directamente al movimiento y distribución de las partículas que fluyen dentro de un canal curvilíneo, moviéndose a lo largo de los vórtices de Dean hacia la pared interna o externa del microcanal dependiendo de su tamaño, este fenómeno es conocido como fuerza de arrastre de Dean ( $F_D$ ). El movimiento de las partículas también está influenciado por el fenómeno de migración inercial, en el cual las partículas migran lateralmente de manera aleatoria adoptando diversas posiciones de equilibrio dentro de la sección transversal del microcanal.<sup>104,105</sup> Esta migración inercial se caracteriza por la aparición de dos efectos: la fuerza de elevación de corte ( $F_{LS}$ ) que aleja las partículas del centro del microcanal y la fuerza de elevación de pared ( $F_{LW}$ ) que repele las partículas lejos de la pared.

Cuando se trabaja con microcanales rectos con sección transversal rectangular o trapezoidal, la migración inercial de las partículas se realiza en dos pasos. En el primer paso las partículas son afectadas por  $F_{LS}$  y  $F_{LW}$  en donde estas dos fuerzas de elevación inercial están en equilibrio, como se muestra en la Figura 1-19(a,b). Durante el segundo paso, una vez que las partículas ya se han concentrado en una primera línea de equilibrio, lentamente comienzan a concentrarse alrededor del centro de las paredes del microcanal debido a la influencia de la fuerza de elevación de Saffman ( $F_{L\Omega}$ ) como resultado del gradiente en el perfil de velocidad del fluido<sup>106</sup> (Figura 1-19(c,d)). Cuando se agrega curvatura al microcanal, y debido a la aparición del flujo secundario de Dean, la concentración de las partículas puede ser modificada. Así, dependiendo del caudal, la fuerza de arrastre de Dean puede ser más fuerte o débil que la fuerza de elevación de Saffman o las fuerzas de elevación inercial. Como se puede ver en la Figura 1-19(e,f), cuando la fuerza de arrastre de Dean es más débil que las fuerzas de elevación inercial, pero más fuerte que la fuerza de elevación de Saffman ( $F_{LS}$  y  $F_{LW} > F_D > F_{L\Omega}$ ), las partículas suspendidas siguen los vórtices de Dean a lo largo de las líneas de equilibrio hasta que alcanzan un área cercana a la pared interna del microcanal en donde ya no pueden seguir los vórtices.<sup>107</sup> Como consecuencia, las partículas se concentran cerca de la pared interna del microcanal limitando sus posiciones de equilibrio sólo a esta región, lo cual es ideal para el propósito de separación.



**Figura 1-19.** Representación de la concentración de partículas en microcanales rectos y curvos con sección transversal rectangular o trapezoidal. (a,b) En un microcanal recto, las partículas dispersas de manera aleatoria se concentran en las líneas de equilibrio dadas por las fuerzas de elevación inercial, en donde  $F_{LS}$  y  $F_{LW}$  están en equilibrio. (c,d) Como un segundo paso, las partículas se concentran en el medio de las paredes del canal sobre las líneas de equilibrio previamente formadas debido a la fuerza de elevación de Saffman ( $F_{L\Omega}$ ). (e,f) En un microcanal curvo, la fuerza centrífuga actúa sobre el fluido hacia la pared exterior induciendo la creación de vórtices de Dean a lo largo de la sección transversal. Estos vórtices reubican las posiciones de equilibrio comúnmente hacia la pared interna del canal donde las partículas pueden permanecer concentradas debido a la fuerza de arrastre de Dean ( $F_D$ ). Adaptada de la referencia Rafeie *et al.*<sup>25</sup>

Empleando la migración inercial y la fuerza de arrastre de Dean dentro de microcanales curvos con sección transversal rectangular o trapezoidal se ha logrado la separación de partículas de diferentes tamaños en sistemas microfluídicos.<sup>101,108</sup> Este mismo principio ha sido aplicado en diferentes trabajos para la separación de células sanguíneas. Por ejemplo, Wu *et al.*<sup>109</sup> reportó el desarrollo de un novedoso microdispositivo con diseño en espiral y sección transversal trapezoidal para la separación y recuperación de leucocitos de sangre humana diluida (1–2 % HCT) con una alta eficiencia (> 80 %). También se ha estudiado la separación de plasma sanguíneo en microdispositivos con microcanales en forma de espiral; Rafeie *et al.*<sup>25</sup> reportó la construcción de un sistema microfluídico de ocho espirales conectados con sección transversal trapezoidal para una separación rápida de plasma empleando sangre humana diluida (0.5–1 % HCT) alcanzando un caudal máximo de 24 mL/min con alta eficiencia de separación.

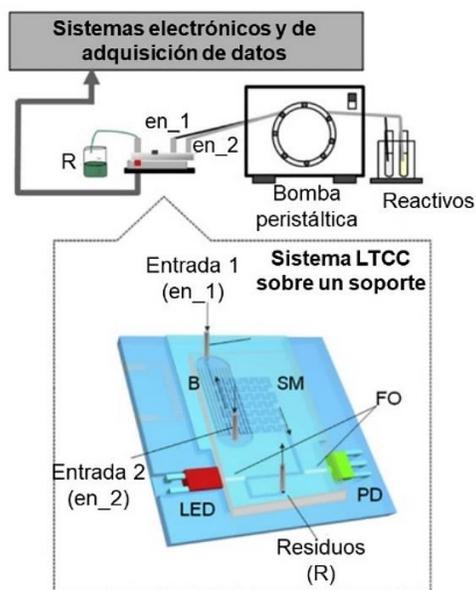
### 1.3.3 Microdispositivos para la cuantificación de urea

La urea (carbamida o carbonildiamida), de fórmula  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , es el metabolito final predominante de los compuestos nitrogenados en mamíferos, y representa del 80 al 90 % de la excreción de nitrógeno en los seres humanos. Ésta se forma exclusivamente en el hígado y se transporta principalmente por el torrente sanguíneo hacia los riñones donde se excreta en la orina.<sup>110</sup> La urea se encuentra normalmente en plasma o suero en concentraciones entre 15 a 45 mg/dL, y hasta 50 veces más concentrada en muestras de orina.<sup>111</sup> Como un indicador de la función del hígado y riñón, la determinación de urea en este tipo de muestras, es una prueba requerida frecuentemente en análisis clínicos.<sup>27</sup> Un incremento en los niveles de urea en sangre y orina puede ser provocado por insuficiencia renal, la obstrucción del tracto urinario, y deshidratación, mientras que la disminución de la concentración de urea es un indicativo de insuficiencia hepática o dietas bajas en proteínas y altas en carbohidratos.<sup>112</sup> La cuantificación de urea no sólo es de gran importancia para el diagnóstico clínico, sino también hay una creciente demanda para la implementación de métodos de cuantificación robustos para su aplicación en otras áreas como la ciencia de alimentos y monitoreo ambiental.<sup>110</sup>

Los métodos de cuantificación de urea se clasifican en dos grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos. Los métodos no enzimáticos o métodos directos son aquellos que dan como resultado un producto colorido sin una previa degradación de la urea.<sup>110</sup> Los métodos enzimáticos, en cambio, emplean la reacción de hidrólisis de urea catalizada por la enzima ureasa (URS), la cual degrada selectivamente a la urea en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Así, la urea se determina indirectamente por medio de la cuantificación de los iones amonio en solución.<sup>29</sup> Para este tipo de detección, el método de Berthelot es frecuentemente aplicado, éste consiste en la reacción entre iones  $\text{NH}_4^+$  y fenol bajo condiciones de oxidación para la formación de un indofenol colorido con absorción entre 630 y 720 nm.<sup>113,114</sup> Asimismo, se han reportado modificaciones al método de Berthelot empleando diferentes sustitutos de fenol como o-fenilfenol,<sup>115</sup> 1-naftol,<sup>116</sup> o-ftalaldehído<sup>117</sup> y timol junto con el uso de catalizadores como nitroprusiato de sodio.<sup>118</sup>

Muchas de las metodologías reportadas para la detección de urea en dispositivos de microfluídica se basan en biosensores empleando métodos electroanalíticos, en donde la construcción de electrodos dentro de microdispositivos es uno de los pasos claves para lograr una detección adecuada.<sup>27,28,112,119</sup> Por ejemplo, Limbut *et al.*<sup>119</sup> reportó el desarrollo de un biorreactor conductimétrico empleando la inmovilización de la enzima ureasa sobre las paredes de los microcanales de PDMS con una estabilidad de 30 días; para la detección se emplearon electrodos de oro y un transductor conductimétrico construido para monitorear el incremento

en la conductividad de la solución debido a los cambios en las cargas generadas por la reacción catalítica enzima-sustrato. El microdispositivo fue probado con muestras de suero humano. También se han reportado adecuaciones del método de Berthelot en sistemas de microfluídica con detección espectrofotométrica, por medio del acoplamiento de fibras ópticas.<sup>29,120,121</sup> Remiszewska *et al.*<sup>29</sup> reportó un sistema microanalítico con ureasa inmovilizada sobre la superficie del microreactor empleando la tecnología de baja temperatura para cerámica cocida (LTCC) para la detección de iones amonio, como producto de la reacción de hidrólisis de urea, por medio del método de Berthelot modificado, optimizando las condiciones de reacción como temperatura, caudal, concentraciones y pH; en la Figura 1-20 se muestra un esquema de este microdispositivo. De manera general, la cuantificación de urea en microdispositivos ha mostrado tener algunas de las ventajas que este tipo de sistemas ofrece, como bajo consumo de reactivos, aumento en la cinética de reacción y gran procesamiento de muestras.



**Figura 1-20.** Esquema del microdispositivo para la detección de urea desarrollado por Remiszewska *et al.*<sup>29</sup> Los reactivos y muestra se ingresan por medio de una bomba peristáltica. B: microreactor con enzima inmovilizada. SM: mezclador en forma de serpentín, FO: fibra óptica, LED: luz de emisión, PD: fotodetector.

### 1.3.3.1 Fundamento de la reacción de cuantificación de urea: Método de Berthelot modificado

La urea puede cuantificarse indirectamente midiendo la cantidad de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) producido a través de la reacción enzimática de hidrólisis catalizada por la enzima ureasa (URS):

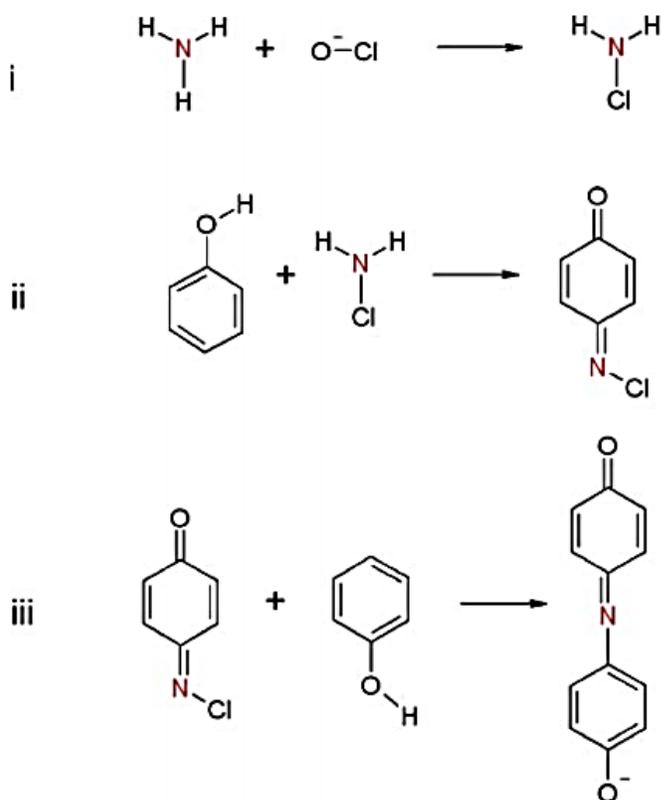


La reacción de Berthelot para la cuantificación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), descrita por primera vez en 1859, involucra la formación de un indofenol azul en medio alcalino debido a la reacción con hipoclorito de sodio y fenol. Los pasos generales de la reacción (Figura 1-21) incluyen: <sup>114,122</sup>

(i) Reacción entre amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) en medio básico para formar una monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ). En este punto es importante considerar que debe mantenerse una relación  $\text{ClO}^-/\text{NH}_3$  igual o menor a 1 para la formación de  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , de lo contrario el cloro en exceso seguirá reaccionando hasta la formación de dicloraminas ( $\text{NHCl}_2$ ) y tricloraminas ( $\text{NCl}_3$ ). Eventualmente, si se continúa agregando cloro, se alcanza la oxidación total de los compuestos, transformando las cloraminas en nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y cloruros ( $\text{Cl}^-$ ).<sup>123</sup>

(ii) Reacción entre la monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) y el fenol para formar una quinona de cloramina.

(iii) Condensación entre la quinona de cloramina y fenol para la formación de indofenol azul, en donde la intensidad del color formado es directamente proporcional a la concentración



**Figura 1-21.** Mecanismo de reacción general para la cuantificación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por método de Berthelot. (i) Reacción entre amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) en medio básico para formar monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ). (ii) Reacción entre cloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) y fenol para la formación de una quinona de cloramina. (iii) Condensación entre la quinona de cloramina y fenol para la formación de indofenol azul.

Esta reacción ha sido extensamente estudiada empleando una gran variedad de derivados fenólicos como es el caso de salicilato y modificando diversos parámetros,<sup>113</sup> además de incluir la adición de catalizadores como nitroprusiato de sodio, llevando así a la aplicación del método de Berthelot modificado.<sup>124</sup>

## \* CAPÍTULO II \*

### **Inmunoensayo en microdispositivo con nanopartículas magnéticas conjugadas para una rápida cuantificación de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP)**

#### **2.1 RESUMEN**

Los anticuerpos IgG anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) se producen como una respuesta inmune en presencia de péptidos modificados postraduccionales conocidos como péptidos cíclico citrulinados (CCP). Los anti-CCP se han considerado como biomarcadores específicos para el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR), y debido a su alta especificidad, es posible realizar un diagnóstico diferencial de otras enfermedades reumáticas. Estos autoanticuerpos pueden detectarse en las primeras etapas de la AR e incluso hasta 10 años antes de presentar los primeros síntomas de la enfermedad abriendo una ventana de oportunidad para un tratamiento oportuno. En este trabajo, se desarrolló un microdispositivo simple de canal recto y nanopartículas magnéticas conjugadas con el antígeno (MNPs-CCP) como soporte sólido para cuantificar anti-CCP por medio de un ensayo inmuno-absorbente ligado enzimas (ELISA) indirecto. Se utilizó un microdispositivo adicional con un diseño en Z como celda de flujo acoplado con fibras ópticas para realizar la detección espectrofotométrica. El intervalo de cuantificación se determinó entre 0.70 y 2000 U/mL con un límite de detección de 0.70 U/mL. El inmunoensayo en microdispositivo se probó usando un control positivo y un control negativo de plasma humano requiriendo únicamente 6  $\mu$ L de muestras y reactivos con un tiempo de análisis de 12 min. Los resultados mostraron que el microdispositivo propuesto fue casi nueve veces más rápido que un kit ELISA anti-CCP comercial obteniendo resultados equivalentes y siendo 16 veces más sensible. El inmunoensayo en microdispositivo con MNPs-CCP demostró ser un método, más rápido, simple, barato, y sensible que un kit ELISA para la cuantificación de estos biomarcadores.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR), clasificada en 1983 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) como una enfermedad difusa del tejido conectivo.<sup>125</sup> Es una enfermedad sistémica crónica que afecta las articulaciones, los tejidos conectivos, los músculos, los tendones y el tejido fibroso. Tiende a aparecer durante la etapa más productiva de la edad adulta, entre los 20 y los 40 años, siendo una enfermedad incapacitante que a menudo causa dolor, destrucción y deformidad.<sup>126</sup> Además, se sabe que la AR puede afectar a otros sistemas y órganos importantes.<sup>127,128</sup> La prevalencia mundial puede variar entre el 0.3 % y el 1 %, siendo más común en mujeres que en hombres con una relación 3:1 en países desarrollados.<sup>129</sup>

De acuerdo con los criterios de clasificación de la AR de 2010, establecidos por la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) en conjunto con el ACR, el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos contra los péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) tienen un papel central en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.<sup>130</sup> Aunque el FR puede detectarse en la mayoría de los pacientes con AR, no es un biomarcador específico (sensibilidad 75—85 % y especificidad 80—90 %) estando presente en muchas enfermedades inflamatorias y en individuos sanos (principalmente ancianos). Por el contrario, los biomarcadores anti-CCP presentan un mejor resultado en especificidad (sensibilidad 70—80 % y especificidad 95—98 %), así, la alta especificidad de los anti-CCP les confiere un gran valor en el diagnóstico diferencial de la AR de diversas enfermedades artríticas.<sup>131–133</sup> Los anti-CCP son autoanticuerpos IgG dirigidos contra péptidos citrulinados cíclicos (CCP). Estos péptidos se producen mediante la modificación postraduccional de residuos de arginina a citrulina (proceso de citrulinación) catalizada por la enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  peptidil arginina deiminasa (PAD). Esta modificación da lugar a una pérdida de carga neta positiva de los péptidos, lo que provoca cambios bioquímicos significativos que conducen a su no reconocimiento y, posteriormente, inducen una respuesta inmunitaria.<sup>134</sup> El proceso de citrulinación está relacionado con la inflamación en general, pero el desarrollo de anticuerpos patógenos que reconocen las proteínas citrulinadas es un proceso específico de la AR.<sup>135</sup> Además, los anti-PCC están presentes en al menos el 55% de los pacientes con AR temprana y pueden detectarse en promedio 10 años antes de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, lo que podría abrir una ventana de oportunidad para un tratamiento oportuno.<sup>136</sup>

El método más utilizado para la detección y cuantificación de anti-CCP es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Hoy en día se han desarrollado y comercializado diferentes kits de ELISA anti-CCP cuantitativos con la ventaja de poseer alta sensibilidad, pero requiriendo largo tiempo de detección (90 — 180 min).<sup>137</sup> De esta manera, los microdispositivos ofrecen varias

herramientas útiles para su aplicación en el desarrollo de inmunoensayos como: la capacidad de utilizar cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos, portabilidad, bajo costo y menor tiempo de análisis.<sup>37,138</sup>

En los últimos años, se ha explorado la realización de inmunoensayos en microdispositivos utilizando diferentes soportes sólidos para mejorar la captura específica del antígeno o anticuerpo como por ejemplo: una estructura de fotopolímero 3D fabricada dentro de un microcanal (dispositivo de inmuno-pared)<sup>17,139</sup> o nanopartículas magnéticas (MNPs).<sup>18,140</sup> Los resultados obtenidos por los autores sugieren una mejora en la sensibilidad del inmunoensayo, así como una disminución significativa en el tiempo de análisis, además de un bajo consumo de reactivos.

En cuanto a la detección de biomarcadores anti-CCP, se han reportado varios métodos incluido un inmunoensayo turbidimétrico mejorado con partículas modificadas (PETIA) para facilitar la detección de anticuerpos anti-CCP en suero humano,<sup>141</sup> un análisis por quimioluminiscencia,<sup>142,143</sup> así como el uso de sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR)<sup>144</sup> y, más recientemente, un biosensor electroquímico que involucra microperlas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilos o neutravidina y electrodos de carbono serigrafados duales para la determinación simultánea de RF y anti-CCP.<sup>145</sup> Además, en 2015, Chon et al. reportó la detección de anti-CCP utilizando un inmunoensayo basado en la dispersión Raman de superficie mejorada (SERS) con alta sensibilidad.<sup>146</sup> La mayoría de ellos demuestran resultados comparables con un kit ELISA anti-CCP comercial y en general un tiempo de análisis más corto. Sin embargo, dichos trabajos no utilizan técnicas basadas en microdispositivos, ya que, hasta la fecha, la detección de biomarcadores anti-CCP en esta área ha sido poco estudiada. En comparación con los métodos ya reportados, se espera que el inmunoensayo en microdispositivos para la detección y cuantificación de anti-CCP sea más rápido, más fácil y sensible, considerando los resultados al cuantificar otro tipo de biomarcadores.<sup>17,139</sup>

En este capítulo, se realizó la detección y cuantificación de anti-CCP utilizando un microdispositivo y MNPs conjugadas como soporte sólido para inmovilizar péptidos citrulinados cíclicos (CCP). Se evaluaron parámetros como el tiempo de incubación de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP, la cantidad de MNPs-CCP retenidas, la temperatura y tiempo de la reacción enzimática para disminuir el tiempo de análisis. El correcto funcionamiento del inmunoensayo en microdispositivo se corroboró empleando muestras de plasma diluido como control negativo y positivo, y se compararon los resultados con un kit ELISA anti-CCP convencional.

## 2.3 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, fabricar y evaluar microdispositivos de PDMS para la detección y cuantificación espectrofotométrica de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) en un control positivo de plasma humano empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con un antígeno.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Emplear las técnicas de fotolitografía y litografía suave por moldeo de réplica para la fabricación de microdispositivos de PDMS y su posterior caracterización.
- Evaluar la retención GMNPs sintetizadas dentro de los microcanales empleando imanes.
- Conjuguar las MNPS con el antígeno (péptido citrulinado cíclico) empleando un kit de funcionalización y determinar la cantidad conjugada por medio del ensayo de Lowry.
- Optimizar en un microdispositivo la cuantificación de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) mediante un inmunoensayo con MNPs conjugadas como soporte sólido, modificando parámetros como: tiempo de incubación, cantidad de MNPs, temperatura y tiempo de reacción enzimática.
- Realizar un análisis de microscopía electrónica de transmitancia (TEM) para evaluar la conjugación del antígeno y anticuerpos con las MNPs.
- Integrar la detección espectrofotométrica empleando fibras ópticas en un microdispositivo.
- Construir la curva de calibración y determinar el límite de detección, precisión y tiempo de vida de los microdispositivos.
- Cuantificar anti-CCP en una muestra de sangre de una persona sana (control negativo) y, un paciente diagnosticado con AR (control positivo) y comparar el resultado empleando un kit comercial ELISA.

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Reactivos

El kit LinkAmine MAGNETIC 200 nm se adquirió de Nanoimmunotech. El péptido citrulinado cíclico (CCP), con secuencia HQCHQEST—Citrulina—GRSRGRCGRSGS (pureza 95.21%), fue sintetizado por Peptido 2.0 Inc. Los estándares de anticuerpos monoclonales de péptido citrulinado cíclico anti-IgG (anti-CCP) de 1—2000 U/mL (expresado en unidades relativas arbitrarias con un factor 1:12 en comparación con el estándar de referencia de la OMS W1066

para la artritis reumatoide)<sup>147</sup>, el anticuerpo policlonal de oveja anti-humano-IgG conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante (anti-h-IgG-HRP), la solución cromogénica 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.26 g/L) y el kit anti-CCP ELISA GWB-521226 fueron proporcionados por GenWay Biotech Inc. La solución amortiguadora de fosfato (SAF; 0.01 mol/L; pH 7.4), albúmina de suero bovino (BSA), Tween 80, 2-propanol, acetato de propilenglicol monometil éter, las sales de hierro FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, la sal de oro HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, el clorhidrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH·HCl) y polietilenglicol (PEG-6000) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El hidróxido de amonio (NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) se adquirió de J.T. Baker. La resina fotosensible SU-8 3035 se adquirió de Microchem Inc. El kit de polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 se adquirió de Dow Corning Corporation.

#### 2.4.2 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos

El diseño del microcanal se realizó con el programa *Adobe Illustrator CS6* dentro de una circunferencia de 70 mm y se imprimió en negativo (máscara óptica) para la construcción del molde mediante fotolitografía y las réplicas del microdispositivo en PDMS mediante litografía suave por moldeo de réplica.<sup>2,3</sup> La metodología se describe a continuación: se colocó una oblea de silicio, diámetro 75 mm y profundidad 381 ± 25 μm (Silicon Valley Microelectronics), sobre el spin-coater (WS-650MZ-23NPPB, Laurell Technologies Corp.) y se agregaron aproximadamente 3 mL de fotorresina SU-8 3035. Se aplicó un programa de 500 rpm durante 10 s (aceleración 100 rpm/s) seguido por 1000 rpm durante 30 s (aceleración 300 rpm/s). Enseguida, la oblea de silicio se calentó a 105 °C durante 30 minutos en una parrilla de calentamiento (Thermo Scientific Cimarec); la adición y calentamiento de la fotorresina se realizó una vez más para obtener una capa final de alrededor de 200 μm. Posteriormente, se colocó la máscara óptica sobre la oblea de silicio y se transfirió el patrón deseado exponiéndolo a luz ultravioleta (B-100AP, UVP Blak Ray) durante 45 s. A continuación, se retiró la máscara y la oblea de silicio se calentó a 75 °C durante 1 minuto y a 105 °C durante 5 minutos. Como paso final, se sumergió en un recipiente que contenía acetato de propilenglicol monometil éter para eliminar la fotorresina no polimerizada, se lavó con 2-propanol y se colocó dentro de una caja de Petri. Se vertió en el molde una mezcla de PDMS y agente curante (relación 10:0.9), y después de la desgasificación al vacío, se polimerizó a 65 °C (incubadora de calentamiento DHP-9032, Prolab) durante dos horas. Se cortaron las réplicas de los microdispositivos de PDMS y las entradas y salidas se realizaron con un perforador de 1.5 mm de diámetro interno. Finalmente, los microcanales se sellaron sobre una capa delgada de PDMS empleando tratamiento corona (BD-20AC, Electro-Technic Products). Los microdispositivos se caracterizaron utilizando una retícula para microscopio de 5 mm (0.05 x 100

mm, The Microscope Depot) como referencia. Se realizaron diversos cortes al microcanal y se tomaron imágenes de la sección transversal al microscopio (DM750, Leica Microsystems) con un objetivo 4x. El ancho y la profundidad del microcanal se midió en el programa Leica LAS EZ.

### 2.4.3 Experimentos iniciales

Los primeros experimentos se enfocaron en investigar la correcta retención (formación de aglomerados 3D) de las nanopartículas magnéticas dentro de los microcanales empleando imanes. Los detalles de los experimentos realizados se describen en las siguientes secciones.

#### 2.4.3.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de hierro (MNPs) y nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro (GMNPs)

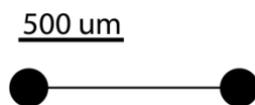
Para la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro se siguieron las recomendaciones reportadas en la literatura para el método de coprecipitación química con algunas modificaciones.<sup>80,148</sup> Se prepararon 10 mL de una solución de iones de hierro Fe(II) y Fe(III) a partir de las sales de hierro  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  con una relación molar Fe(II)/Fe(III) = 0.5, a dicha solución se le adicionaron 3 mL de polietilenglicol (PEG-6000) a una concentración 0.025 mol/L (precursor 1). En un vaso de precipitados se colocaron 10 mL de  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  28-30 % más 3 mL de PEG-6000 0.025 mol/L (precursor 2). Se añadió gota a gota y con agitación constante a temperatura ambiente la solución del precursor 1 al precursor 2, inmediatamente se observó un cambio de coloración en la solución de translúcido a negro, lo que indica la formación de las nanopartículas magnéticas de hierro (MNPs) de la forma  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . La agitación se mantuvo durante un tiempo de 60 min para permitir la máxima formación de nanopartículas. Posteriormente, las nanopartículas sintetizadas se filtraron a vacío realizando repetidos lavados con agua destilada hasta un valor de pH neutro. Para el revestimiento con oro se preparó una mezcla de Au(III): $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en una relación 3:1, la cual se colocó en baño de ultrasonido por 15 min, posteriormente se adicionó 1 mL de una solución de  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  0.08 mol/L y se mantuvo en baño de ultrasonido durante 1 h.<sup>84</sup> Las nanopartículas revestidas se atraparon y concentraron con un imán, se lavaron con una solución de HCl 0.1 mol/L y agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Por último, 100 mg de las nanopartículas resultantes se resuspendieron en 10 mL de una solución de PEG-6000 0.025 mol/L en un baño de ultrasonido por 30 min, obteniendo así una concentración de GMNPs de 10 mg/mL. Asimismo, se preparó una suspensión de nanopartículas magnéticas de hierro sin recubrimiento (MNPs) en 10 mL de PEG 0.025 mol/L con una concentración de 10 mg/mL.

### 2.4.3.2 Pruebas de retención de GMNPs dentro del microcanal empleando imanes

Para realizar las primeras pruebas de retención de GMNPs, se empleó un microdispositivo de canal sencillo con las siguientes medidas: longitud 1 cm; ancho  $94 \pm 12 \mu\text{m}$  y profundidad  $207 \pm 13 \mu\text{m}$  (Figura 2-1). Por medio de una micropipeta (Finnpipette F1, Thermo Scientific) o empleando bombas de jeringa (NE-300, New Era Pump Systems) se ingresaron al microdispositivo las GMNPs, colorantes y agua destilada en diferente orden para simular los siete pasos requeridos para realizar un ELISA como se muestra a continuación:

1. Paso de retención:  $1 \mu\text{L}$  de GMNPs  $10 \text{ mg/mL}$
2. Paso de limpieza:  $5 \mu\text{L}$  de colorante amarillo (se repitió 3 veces)
3. Paso de adición de "plasma":  $5 \mu\text{L}$  de agua destilada
4. Paso de limpieza:  $5 \mu\text{L}$  de colorante amarillo (se repitió 3 veces)
5. Paso de adición del "anticuerpo conjugado":  $5 \mu\text{L}$  de colorante azul
6. Paso de limpieza:  $5 \mu\text{L}$  de colorante amarillo (se repitió 3 veces)
7. Paso de adición del "cromóforo":  $5 \mu\text{L}$  de colorante rojo

Este ensayo se realizó con tres variantes: (1) empleando bombas de jeringa con un caudal programado a  $5 \mu\text{L/min}$  y colocando un imán de  $2 \times 2 \text{ mm}$  en la parte superior del microcanal, (2) utilizando una micropipeta y colocando un sólo imán de  $2 \times 2 \text{ mm}$  en la parte superior junto al microcanal, y (3) bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el punto 2, con la modificación de colocar dos imanes de  $2 \times 2 \text{ mm}$ , uno en la parte superior y otro más en la parte inferior. Se tomaron imágenes bajo el microscopio con un objetivo  $4\times$  (DM750, Leica Microsystems) después de cada uno de los pasos y se observó el comportamiento de las GMNPs retenidas, buscando mantenerlas intactas pese al número de pasos realizados.



**Figura 2-1.** Diseño del microdispositivo de canal sencillo empleado en los experimentos iniciales.

Posteriormente, se analizaron las imágenes tomadas después de cada paso del ensayo tipo ELISA empleando el programa *ImageJ* y se determinó por triplicado el % área que ocupan las GMNPs dentro del microcanal al realizar el experimento con dos imanes y empleando una micropipeta para el ingreso de los diferentes colorantes.

#### 2.4.4 Toma de muestras de sangre

Usando un tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA K2, se tomaron dos muestras de sangre diferentes: de un paciente diagnosticado con AR desde hace seis años (control positivo) y de una persona sana (control negativo). Se separó el plasma del resto de la sangre mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 2.4.5 Conjugación del péptido citrulinado cíclico (CCP) con las nanopartículas magnéticas (MNPs)

El antígeno CCP se inmovilizó covalentemente a los grupos carboxilo en la superficie de las MNPs siguiendo el procedimiento descrito en el kit LinkAmine MAGNETIC con modificaciones menores.<sup>149</sup> Primero, se activaron 5 mg de MNPs añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de una solución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (reactivo A) y N-hidroxisuccinimida (reactivo B) e incubando durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación suave (HCM-100pro, DLab). Después de tres pasos de lavado, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución de CCP 1 mg/mL y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h con agitación suave. A continuación, las MNPs conjugadas al antígeno se separaron y el sobrenadante obtenido (sobrenadante de inmovilización) se almacenó para la posterior cuantificación de la cantidad de péptido unido a la nanopartícula a través del ensayo de Lowry. Después de tres pasos de lavado, los grupos carboxilo activos residuales en la superficie de las MNPs se bloquearon agregando 500  $\mu\text{L}$  de una solución de albúmina de suero bovino e incubando durante 2 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación suave. Las MNPs-CCP resultantes se lavaron, se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora (SAF) y se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para cuantificar la cantidad de CCP conjugada con las MNPs se empleó el ensayo de Lowry, preparando los siguientes reactivos:

- Reactivo A: carbonato de sodio 0.2 mol/L + hidróxido de sodio 0.1 mol/L
- Reactivo B: sulfato de cobre (II) 0.02 mol/L + tartrato de sodio 0.05 mol/L
- Reactivo C: reactivo A + reactivo B en una proporción 100:1 v/v
- Reactivo D: reactivo de Folin-Ciocalteu dilución 1:1 v/v

Se empleó una solución madre de CCP de concentración 1 mg/mL con la cual se realizaron las diluciones necesarias para preparar ocho estándares con concentraciones entre 2.5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , empleando el reactivo C y D como se muestra en la Tabla 2-1. Después de la adición del reactivo C la mezcla se agitó durante 30 s permitiendo la reacción a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se adicionó el reactivo D agitando durante 30 s y se llevó al aforo con agua destilada hasta un volumen de 2 mL dejando transcurrir la reacción por 45 min

en oscuridad. Se midió la absorbancia por triplicado para cada estándar a  $\lambda = 730$  nm (Cary 1 UV-Vis spectrophotometer). La curva de calibración se realizó por triplicado y con los valores de las tres curvas se obtuvo una sola curva de calibración.

Se cuantificó la concentración de CCP en la solución antes y después de realizar la conjugación con las MNPs. Para ello, se prepararon por triplicado soluciones de CCP inicial (empleando un estándar de CCP 1 mg/mL) y final (empleando el sobrenadante de inmovilización), realizando las diluciones pertinentes para que la absorbancia registrada estuviera en la parte central de la curva de calibración. La diferencia entre ambas concentraciones corresponde a la cantidad de péptido inmovilizado.

**Tabla 2-1.** Construcción de la curva de calibración para la cuantificación de CCP por el ensayo de Lowry. Todos los estándares se aforaron a un volumen final de 2 mL con agua destilada.

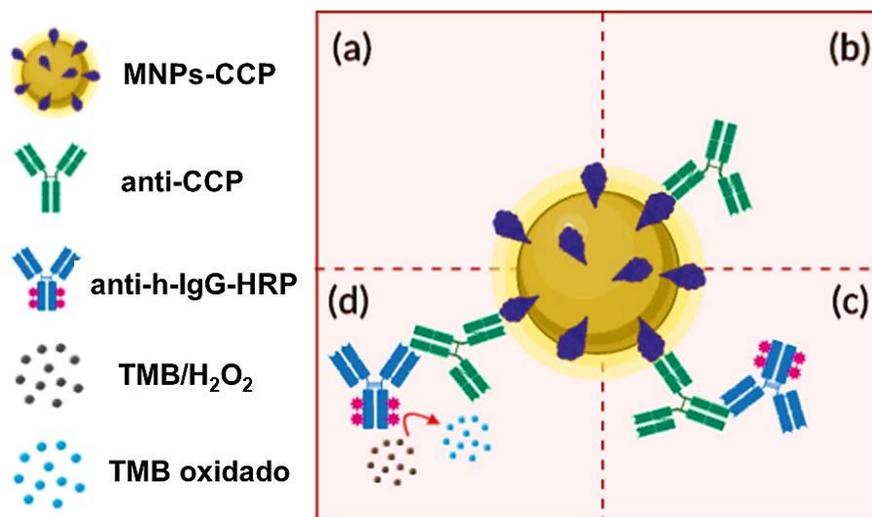
Estándar	[CCP] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen CCP* ( $\mu\text{L}$ )	Volumen reactivo C (mL)	Volumen reactivo D ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	--	--		
1	2.5	5		
2	5.0	10		
3	12.5	25		
4	20.0	40	1	100
5	25.0	50		
6	32.5	65		
7	40.0	80		
8	50.0	100		

\*A partir de una solución de CCP de 1 mg/mL

#### 2.4.6 Procedimiento del inmunoensayo en microdispositivo

La Figura 2-2 muestra la representación esquemática del inmunoensayo. Primero, los microdispositivos se colocaron sobre una torre de imanes y se adicionó un volumen adecuado con ayuda de una micropipeta (Finnpipette F1, Thermo Scientific) de MNPs-CCP (concentración 10 mg/mL;  $70.9 \pm 5.4$   $\mu\text{g}$  CCP/mg MNPs) previamente sonicadas durante 30 s, reteniendo las nanopartículas magnéticas conjugadas con el antígeno dentro del microcanal. Los siguientes pasos requirieron un volumen de 6  $\mu\text{L}$  de cada solución. Se adicionó al microcanal una solución de SAF (blanco), estándar anti-CCP (1-2000 U/mL) o muestra de plasma diluida 1:100 en SAF con un tiempo de incubación apropiado. Posteriormente, el anticuerpo policlonal anti-h-IgG-HRP se introdujo y se incubó durante un tiempo adecuado. Después de cada incubación a temperatura ambiente, las MNPs conjugadas se lavaron 5 veces con solución de lavado (SAF que contenía

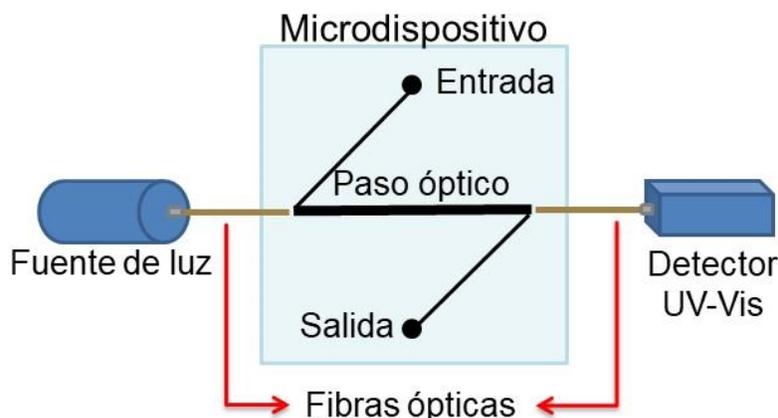
Tween 80 al 0.5% y BSA al 0.5%). Finalmente, se inyectó el sustrato cromogénico (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la reacción enzimática se llevó a cabo en oscuridad a temperatura controlada de 22 °C y 37 °C empleando un controlador de temperatura para microdispositivos (Meros TCU-125, dolomite) durante un tiempo de reacción enzimática adecuado. El producto de reacción se recolectó inmediatamente en puntas de micropipeta para su posterior medición.



**Figura 2-2.** Ilustración esquemática del procedimiento para la realización del inmunoensayo en el microdispositivo. (a) Inmovilización de MNPs conjugadas con el antígeno CCP; (b) unión selectiva de los anticuerpos anti-CCP; (c) adición del anticuerpo conjugado anti-h-IgG-HRP; y (d) reacción enzimática al adicionar la solución cromogénica TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y desarrollo del producto colorido por el proceso de oxidación de TMB.

### 2.4.7 Sistema de detección

La absorbancia se midió espectrofotométricamente a  $\lambda = 650$  nm ajustando el blanco con agua destilada por medio de un microdispositivo de PDMS como microcelda de flujo con un diseño en Z. El esquema del sistema de detección se muestra en la Figura 2-3. Éste consiste en un microcanal con un paso óptico de 1 cm,  $362 \pm 7$   $\mu\text{m}$  de ancho y  $96 \pm 6$   $\mu\text{m}$  de profundidad (volumen total 0.35  $\mu\text{L}$ ), acoplado con fibras ópticas de 200  $\mu\text{m}$  (FIBER 200-UV, Ocean Optics), una fuente de luz multi-LED (BluLoop, Ocean Optics) y un detector UV-Vis (USB4000, Ocean Optics). El producto de reacción recolectado se ingresó al paso óptico con una micropipeta y la señal se registró y midió a través del programa *SpectraSuite*. Este sistema de detección se seleccionó después de probar la detección por medio de análisis de imágenes cuyas características se pueden consultar en el Anexo 1.



**Figura 2-3.** Ilustración del sistema de detección. El microdispositivo cuenta con un microcanal con diseño en Z simulando una celda de flujo con paso óptico de 1 cm,  $362 \pm 7 \mu\text{m}$  de ancho y  $96 \pm 6 \mu\text{m}$  de profundidad (volumen total  $0.35 \mu\text{L}$ ) acoplado a una fuente de luz multi-LED y un detector UV-Vis. Absorbancia medida a  $\lambda = 650 \text{ nm}$ .

#### 2.4.8 Establecimiento de las condiciones de reacción del inmunoensayo

Se seleccionaron y estudiaron tres diferentes parámetros con la finalidad de mejorar el funcionamiento del inmunoensayo en el microdispositivo: (1) tiempo de incubación de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP, (2) la cantidad de las MNPs-CCP retenida en el microcanal y (3) el tiempo y la temperatura de la reacción enzimática. Cuyo procedimiento se describe a detalle a continuación.

##### 2.4.8.1 Tiempo de incubación de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP

Para disminuir el tiempo total del inmunoensayo manteniendo una señal de absorbancia alta, se decidió emplear un blanco (SAF) y un estándar de anti-CCP 20 U/mL para realizar seis inmunoensayos con condiciones experimentales diferentes por triplicado. Los tiempos de incubación iniciales seleccionados fueron los recomendados por el kit ELISA (tiempo de incubación de anti-CCP 60 min y tiempo de incubación anti-h-IgG-HRP 30 min), posteriormente éstos se fueron disminuyendo a la mitad para los siguientes experimentos. Así, los tiempos de incubación estudiados para anti-CCP fueron 60 min, 30 min, 15 min, 7 min, 3 min y 1.5 min, mientras que para anti-h-IgG-HRP fueron 30 min, 15 min, 7 min, 3 min, 1 min y 30 s. En todos los casos el tiempo de reacción enzimática fue de 15 min a  $22^\circ\text{C}$ .

##### 2.4.8.2 Cantidad de MNPs-CCP retenida

Dos diferentes volúmenes de nanopartículas: (1)  $1 \mu\text{L}$  de MNPs-CCP (equivalente a  $0.01 \text{ mg}$  de MNPs =  $0.71 \mu\text{g}$  de CCP), y (2)  $5 \mu\text{L}$  de MNPs-CCP (equivalente a  $0.05 \text{ mg}$  de MNPs =  $3.55 \mu\text{g}$  de CCP), fueron seleccionados para realizar el inmunoensayo en el microdispositivo, por triplicado,

empleando un blanco (SAF) y dos estándares de anti-CCP de 20 U/mL y 400 U/mL. En todos los casos, el tiempo de incubación para anti-CCP y anti-h-IgG-HRP fueron 1.5 min y 30 s, respectivamente, con un tiempo de reacción enzimática de 15 min a 22 °C.

#### **2.4.8.3 Tiempo y temperatura de la reacción enzimática**

Se realizaron por triplicado inmunoensayos en el microdispositivo a 22 y 37 °C empleando un blanco (SAF) y estándares de anti-CCP de 20 y 400 U/mL. El tiempo de incubación para anti-CCP fue 1.5 min y para anti-h-IgG-HRP de 30 s con un tiempo de reacción enzimática de 15 min. Posteriormente, tres tiempos de reacción enzimática (5, 10 y 15 min) fueron estudiados con el propósito de disminuir el tiempo total del ensayo a una temperatura de 37 °C.

#### **2.4.9 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Las MNPs antes y después de la conjugación con CCP, así como una muestra de nanopartículas magnéticas una vez finalizado el inmunoensayo, se analizaron mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras se prepararon de la siguiente manera: 0.6 µL de las nanopartículas magnéticas se diluyeron en 2 mL de isopropanol y se dispersaron durante 5 min en un baño ultrasónico. Después, se añadieron 5 µL de la dispersión a 2 mL de isopropanol más 0.3 µL de Tween-80. Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-2010) con un voltaje de aceleración de 200 kV y una cámara digital de alta velocidad (Gatan Orius SC200). Las imágenes resultantes se analizaron más tarde con el programa *Gatan Microscopy Suite*.

#### **2.4.10 Construcción de las curvas de calibración y análisis de muestras**

Empleando el tiempo de incubación establecido para el inmunoensayo en el microdispositivo (anti-CCP 1.5 min y anti-h-IgG-HRP 30 s) se construyeron cuatro curvas de calibración con un intervalo de concentración de anti-CCP entre 1 y 2000 U/mL. Dos de ellas a 22 °C con tiempos de reacción enzimática de 15 y 30 min, y las últimas dos a 37 °C con tiempo de reacción enzimática de 15 y 10 min. Las muestras de plasma (control positivo y negativo) se diluyeron en una relación 1:100 en SAF antes de su análisis en el microdispositivo. Para comparar la cuantificación de anti-CCP en el método desarrollado, se empleó un método convencional en microplaca (anti-CCP ELISA kit)<sup>150</sup> como referencia cuyo procedimiento se muestra en el Anexo 2.

#### 2.4.11 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Se empleó el estándar de anti-CCP de 20 U/mL para medir la absorbancia por duplicado diariamente durante siete días. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para determinar la precisión de la metodología en términos de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

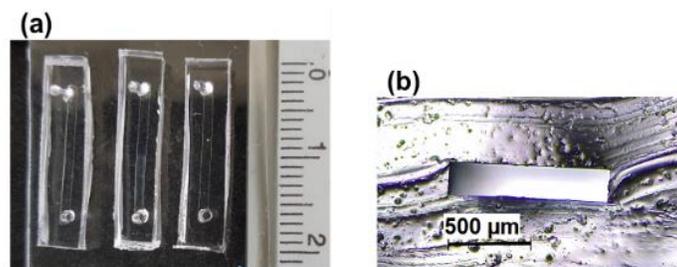
#### 2.4.12 Tiempo de vida de los microdispositivos

Se emplearon tres microdispositivos para realizar el inmunoensayo midiendo la señal del blanco (solución de SAF). Posteriormente, las MNPs-CCP se retiraron y los microcanales se lavaron con agua destilada en baño de ultrasonido durante 15 minutos y se secaron con aire a presión. Empleando los mismos tres microdispositivos, se realizó el inmunoensayo con el control positivo de plasma sin diluir y se registró el valor de absorbancia, enseguida las MNPs-CCP se retiraron y los microcanales se lavaron como se mencionó anteriormente. El procedimiento descrito se repitió cinco veces durante un día y se compararon las mediciones de blanco y control positivo, empleando siempre entre cada medición un volumen nuevo de MNPs-CCP.

### 2.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 2.5.1 Caracterización de los microdispositivos

El diseño de los microdispositivos consiste en un microcanal lineal simple con las siguientes dimensiones: longitud 1 cm; ancho  $94 \pm 12 \mu\text{m}$  y profundidad  $207 \pm 13 \mu\text{m}$  para el microchip empleado durante los experimentos iniciales; longitud 1.5 cm, profundidad  $225 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$ , ancho  $967 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$  y volumen total  $3.2 \mu\text{L} \pm 0.4 \mu\text{L}$ , para el microdispositivo utilizado durante los inmunoensayos. En la Figura 2-4 se muestra una fotografía de este último microdispositivo y una vista de su sección transversal.

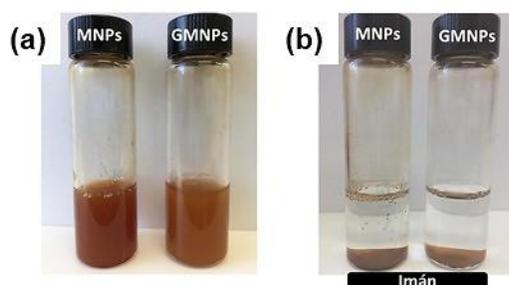


**Figura 2-4.** Imagen del microdispositivos construido para la realización del inmunoensayo. (a) Fotografía de tres microdispositivos de PDMS fabricados, (b) vista al microscopio de la sección transversal del microcanal una vez sellado, objetivo 10x.

## 2.5.2 Experimentos iniciales

### 2.5.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de hierro (MNPs) y nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con oro (GMNPs)

Para los experimentos iniciales se decidió emplear MNPs y GMNPs sintetizadas en el laboratorio para hacer múltiples pruebas sin comprometer el kit de nanopartículas magnéticas que se emplearía para la inmovilización del antígeno. En la Figura 2-5(a) se muestra la suspensión de MNPs y GMNPs en PEG-6000 0.025 mol/L. Ambas son ligeramente diferentes entre sí debido a un cambio de color; las GMNPs presentaron una coloración un poco más clara debido a la presencia del recubrimiento con oro. En la Figura 2-5(b) se puede observar el efecto de un imán al colocarlo en la parte inferior de la suspensión de las nanopartículas magnéticas.

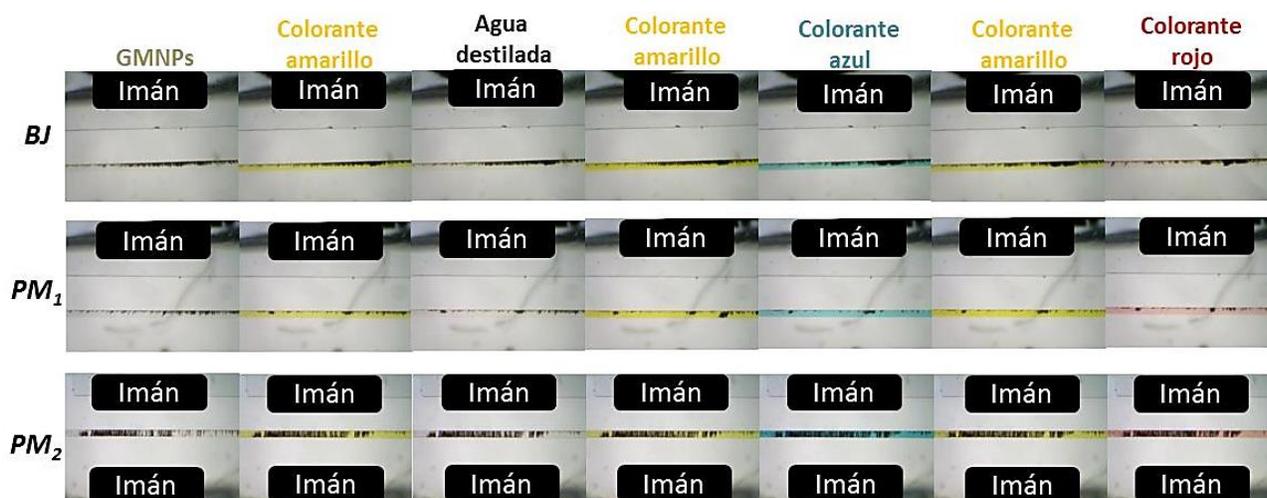


**Figura 2-5.** Suspensión de nanopartículas magnéticas de hierro de concentración de 10 mg/mL. (a) sin recubrimiento con oro (MNPs) y con recubrimiento con oro (GMNPs); (b) Retención en la parte inferior del frasco al colocar un imán.

### 2.5.2.2 Pruebas de retención de GMNPs dentro del microcanal empleando imanes

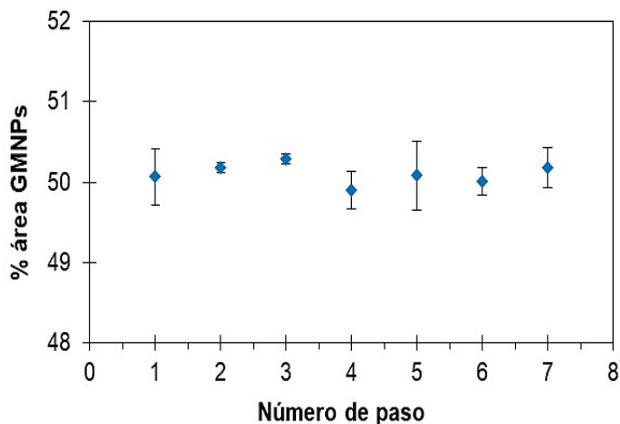
Para esta serie de experimentos se decidió emplear la suspensión de GMNPs ya que el recubrimiento con oro les otorgó una mayor estabilidad en comparación con las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. En la Figura 2-6 se muestran las imágenes tomadas tras cada paso de la simulación de ELISA empleando bombas de jeringa con un solo imán (BJ), puntas de micropipeta con un solo imán (PM<sub>1</sub>) y puntas de micropipeta con dos imanes (PM<sub>2</sub>). Como se aprecia en la imagen, el uso de bombas de jeringa perturba ligeramente la presión dentro de los microcanales, por lo que las nanopartículas magnéticas se mueven mínimamente con la presencia de un único imán. Sin embargo, cuando se recrean las condiciones ingresando los “reactivos” con puntas de micropipeta con un solo imán, las GMNPs no son retenidas con la suficiente fuerza y su posición se modifica cada vez que se ingresa un nuevo colorante debido a los cambios de presión generados al quitar y poner tanto la punta de micropipeta, además de que, al introducirse manualmente, el caudal de entrada es mucho mayor, lo que desplaza poco a poco a las GMNPs

de su posición inicial. El problema descrito anteriormente se solucionó al colocar un doble imán en la zona de retención de GMNPs (en la parte superior e inferior del microcanal); al haber un mayor campo magnético se confiere una mayor estabilidad a las nanopartículas retenidas manteniéndolas prácticamente en su posición inicial con muy ligeros cambios pese a las perturbaciones que pudiera provocar el poner y retirar la punta de micropipeta y el alto caudal de entrada durante el número de pasos del ensayo tipo ELISA realizado. Lo anterior se corroboró al calcular el porcentaje de área que ocupan las nanopartículas dentro del microcanal después de cada uno de los siete pasos de la simulación del ELISA. La Figura 2-7 muestra los porcentajes de área promedio de las GMNPs, los cuales permanecen constantes con un valor promedio de alrededor de 50 % a través del número de pasos realizados, lo que rectifica que el empleo de al menos dos imanes es el adecuado para la retención de las nanopartículas.



**Figura 2-6.** Imágenes tomadas tras cada paso de la simulación de ELISA empleando bombas de jeringa con un solo imán (BJ), puntas de micropipeta con un solo imán ( $PM_1$ ) y puntas de micropipeta con dos imanes ( $PM_2$ ) para el ingreso de los diferentes colorantes.

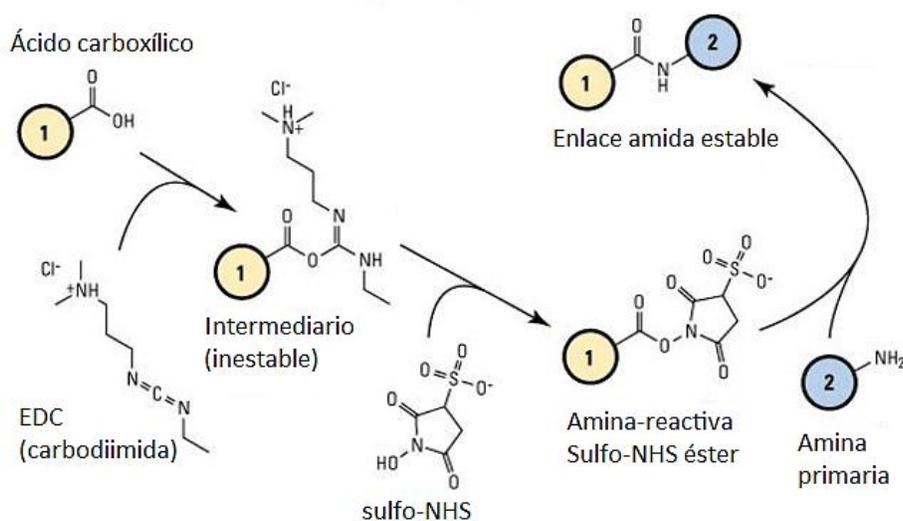
Debido a que se desea introducir al microdispositivo los reactivos con una micropipeta para conferir practicidad al método, los experimentos posteriores emplearon no sólo pequeños trozos de imán, sino también una torre de imanes debajo del microcanal, para ayudar a mejorar aún más su retención. Además, se aumentó el ancho y la longitud del microcanal para tener una mayor superficie de contacto con las nanopartículas al momento de realizar el inmunoensayo.



**Figura 2-7.** Porcentajes de área que ocupan las GMNPs retenidas por dos imanes dentro del microcanal después de cada uno de los pasos de simulación de ELISA empleando una micropipeta para su ingreso al microdispositivo (n = 3).

### 2.5.3 Conjugación del péptido cíclico citrulinado (CCP) con las nanopartículas magnéticas (MNPs)

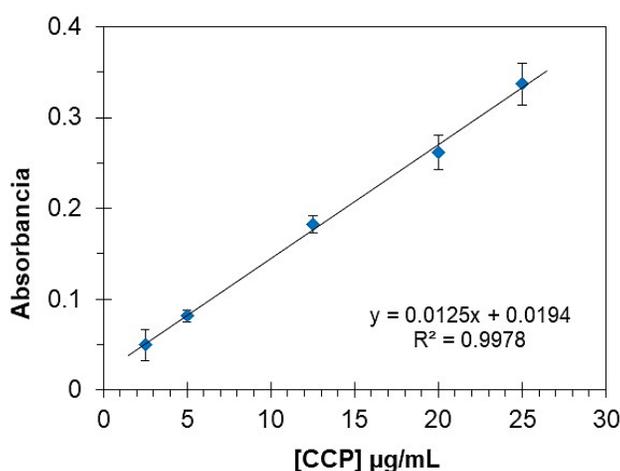
En la Figura 2-8 se muestra un esquema general del proceso de conjugación de nanopartículas magnéticas (MNPs) con péptidos/proteínas. El paso primordial corresponde a la activación de los grupos carboxilo en la superficie de las MNPs, requiriendo la adición de dos reactivos, una carbodiimida (EDC) la cual se enlaza al ácido carboxílico formando un intermediario inestable, y una N-hidroxisuccinimida (NHS), que forma un NHS-éster susceptible al ataque de una amina primaria libre del péptido/proteína, uniéndose por medio de un enlace amida muy estable.



**Figura 2-8.** Esquema del proceso de conjugación de proteínas con el kit LinkAmine MAGNETIC. (1) Nanopartícula magnética y (2) Cadena del péptido/proteína. Imagen adaptada de Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook.<sup>151</sup>

La Figura 2-9 corresponde a la curva de calibración para la cuantificación de CCP por el ensayo de Lowry. El comportamiento observado se ajustó a una función lineal ( $R^2=0.9978$ ) con un intervalo de cuantificación de anti-CCP de 2.5 a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Tabla 2-2 se muestra la concentración de la solución del péptido al inicio y al final del proceso de conjugación con las nanopartículas magnéticas. La diferencia entre ambas concentraciones representa la concentración de CCP conjugada a la nanopartícula. Se determinó la cantidad de CCP conjugado por mg de MNPs considerando que la concentración de las nanopartículas magnéticas es 10  $\text{mg/mL}$ , de acuerdo con la Ecuación 2-1.



**Figura 2-9.** Curva de calibración para la cuantificación de CCP por medio del ensayo de Lowry. Intervalo lineal 2.5 a 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 3$ ).

**Tabla 2-2.** Resultados para la cuantificación de la concentración de CCP conjugado con las MNPs ( $n = 3$ ).

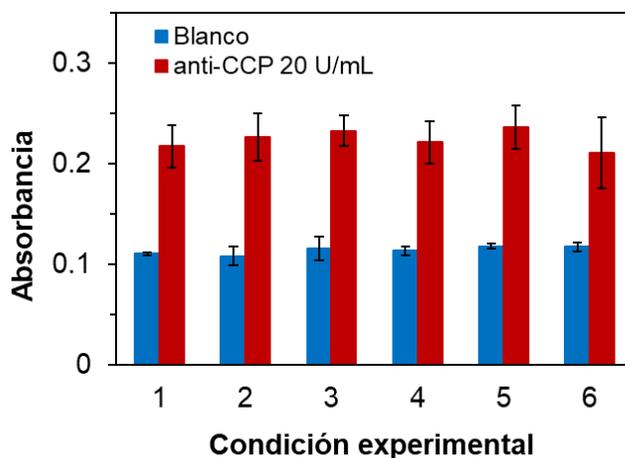
Muestra	[CCP] $\mu\text{g/mL} \pm S$	[CCP conjugado] $\mu\text{g/mL} \pm S$
Inicio	1042.77 $\pm$ 61.51	709.97 $\pm$ 53.90
Final	332.80 $\pm$ 9.51	

$$\frac{[\text{CCP conjugado}] \mu\text{g/mL}}{[\text{MNPs}] \text{mg/mL}} = \frac{709.97 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} = 70.99 \mu\text{g CCP/mg MNPs} \quad \text{Ecuación 2-1}$$

### 2.5.4 Establecimiento de las condiciones de reacción del inmunoensayo

Los anti-CCP se consideran biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico diferencial de AR.<sup>132,152</sup> El valor de corte para el diagnóstico de la enfermedad se calcula como el punto máximo del área bajo la curva al construirse una curva de características receptor-operador (ROC, por sus siglas en inglés). ROC es una gráfica de la tasa de verdaderos positivos contra la tasa de falsos positivos, en otras palabras, muestra la relación entre sensibilidad y especificidad del método analítico.<sup>153</sup> Para la cuantificación de anti-CCP realizada en este estudio, se consideró el valor de corte de 20 U/mL, el cual es proporcionado por el Kit ELISA anti-CCP empleado.

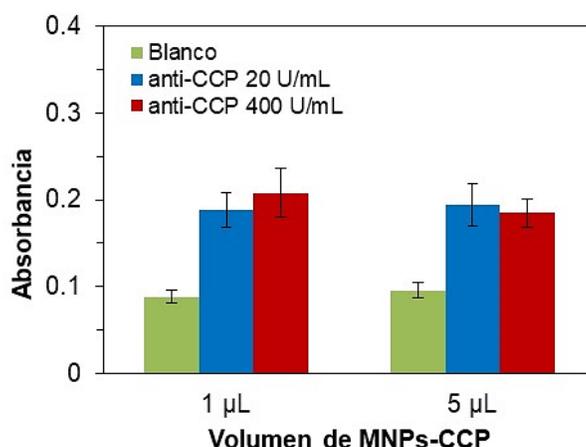
El tiempo de incubación después de la adición de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP son pasos críticos para el correcto funcionamiento del inmunoensayo. Los resultados de absorbancia para los seis experimentos con diferente tiempo de incubación mostraron que, independientemente de la disminución en el tiempo de incubación, la señal analítica para el blanco y para el estándar de anti-CCP permanece prácticamente constante, sin cambios significativos como se observa en la Figura 2-10. Estos resultados sugirieron que al emplear los microdispositivos, es posible disminuir el tiempo de análisis en comparación con el método convencional en microplaca la cual tiene una duración de 1 h 45 min.



**Figura 2-10.** Mediciones de absorbancia para un blanco y un estándar de 20 U/mL anti-CCP empleando 1  $\mu$ L de MNPs-CCP bajo diferentes tiempos de incubación de anti-CCP y anti-h-IgG-HRP: (1) 60 min y 30 min; (2) 30 min y 15 min; (3) 15 min y 7 min; (4) 7 min y 3 min; (5) 3 min y 1 min; y (6) 1.5 min y 30 s. Tiempo de reacción enzimática 15 min a 22 °C. Mediciones de absorbancia a  $\lambda = 650$  nm ( $n = 3$ ).

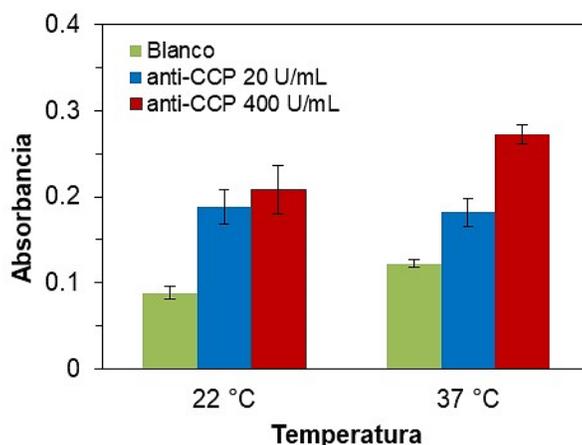
Además, se evaluó si la cantidad de MNPs-CCP retenida en el microcanal afectaba la absorbancia medida. Los resultados experimentales para un blanco y estándares de anti-CCP de 20 U/mL y 400 U/mL se muestran en la Figura 2-11. A pesar de que se esperaba una marcada

diferencia entre la absorbancia de los estándares, los resultados fueron muy similares:  $0.189 \pm 0.020$  (anti-CCP 20 U/mL) contra  $0.208 \pm 0.027$  (400 U/mL) para 1  $\mu\text{L}$  de MNPs-CCP; y  $0.194 \pm 0.024$  (20 U/mL) contra  $0.185 \pm 0.16$  (400 U/mL) para 5  $\mu\text{L}$  de MNPs-CCP. Por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones experimentales, lo que implica que no es necesario utilizar grandes cantidades de MNPs-CCP para llevar a cabo el inmunoensayo. Este comportamiento podría atribuirse a los cortos tiempos de incubación seleccionados (1.5 min para anti-CCP y 30 s para anti-h-IgG-HRP) aunado al hecho de que puede existir un impedimento estérico entre las mismas MNPs-CCP que limite la unión del Ab únicamente al Ag inmovilizado en las nanopartículas más expuestas dentro del microcanal, por lo que, pese al aumento de la cantidad de MNPs-CCP la cantidad de anti-CCP unido es similar. Con el propósito de disminuir el tiempo total de análisis del inmunoensayo y mantener un bajo el volumen de reactivos, se seleccionó 1  $\mu\text{L}$  de MNPs-CCP para realizar los experimentos posteriores.



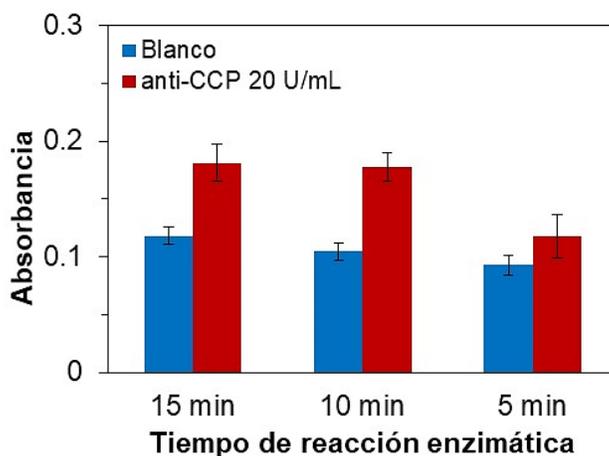
**Figura 2-11.** Mediciones de absorbancia para el blanco y estándares de anti-CCP empleando el inmunoensayo en microdispositivo con diferentes cantidades de MNPs-CCP. Tiempos de incubación anti-CCP 1.5 min, anti-h-IgG-HRP 30 s, tiempo de reacción enzimática 15 min a 22 °C. Mediciones de absorbancia a  $\lambda = 650 \text{ nm}$  ( $n = 3$ ).

Para averiguar si era posible un aumento en la señal analítica del estándar de anti-CCP de 400 U/mL, se estudió la influencia de la temperatura durante el proceso de reacción enzimática. La temperatura óptima para la enzima peroxidasa de rábano picante se ha estudiado previamente, encontrando una pérdida en la actividad de la enzima a temperaturas inferiores a 37 °C y superiores a 40 °C.<sup>154</sup> Por lo tanto, se seleccionó una temperatura de reacción enzimática de 37 °C, además de 22 °C. Las mediciones de absorbancia mostraron una diferencia significativa entre los estándares de anti-CCP de 20 U/mL y 400 U/mL a 37 °C (Figura 2-12), lo cual es indispensable para la posterior construcción de la curva de calibración.



**Figura 2-12.** Mediciones de absorbancia para un blanco y estándares de anti-CCP empleando 1  $\mu$ L de MNPs-CCP a dos temperaturas de reacción enzimática diferentes. Tiempo de incubación anti-CCP 1.5 min, tiempo de incubación anti-h-IgG-HRP 30 s, y tiempo de reacción enzimática 15 min Mediciones de absorbancia a  $\lambda = 650$  nm ( $n = 3$ ).

También se demostró que un tiempo de reacción enzimática de 5 min no es suficiente para obtener una señal diferencial entre el blanco y el estándar anti-CCP de 20 U/mL. Sin embargo, un tiempo de 10 min es suficiente para alcanzar la saturación de los sitios activos de la enzima, obteniendo una señal analítica equivalente a la obtenida con 15 min de reacción (Figura 2-13).



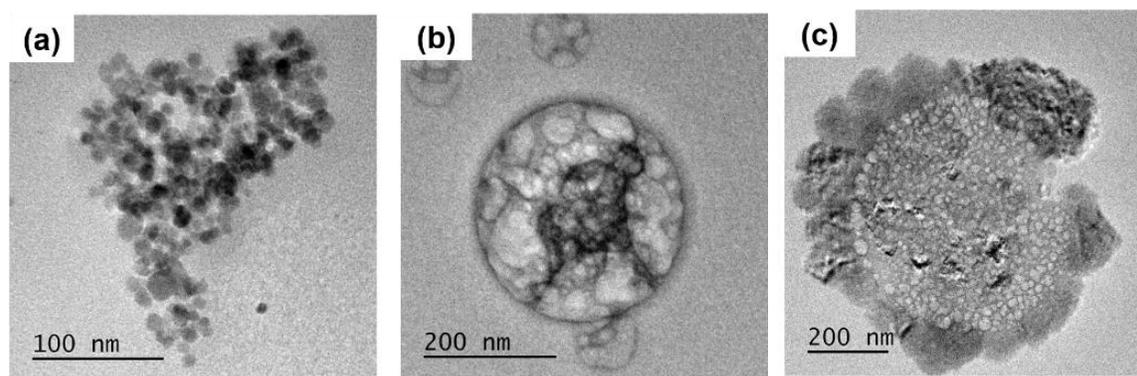
**Figura 2-13.** Mediciones de absorbancia para un blanco y un estándar de anti-CCP de 20 U/mL empleando 1  $\mu$ L de MNPs-CCP con diferentes tiempos de reacción enzimática. Tiempo de incubación anti-CCP 1.5 min, tiempo de incubación anti-h-IgG-HRP 30 s, y temperatura de reacción enzimática 37 °C. Mediciones de absorbancia a  $\lambda=650$  nm ( $n = 3$ ).

Así, las condiciones de reacción seleccionadas para el inmunoensayo en el microdispositivo fueron: 1  $\mu$ L de MNPs-CCP (equivalente a 0.01 mg de MNPs = 0.71  $\mu$ g de CCP), tiempo de incubación anti-CCP de 1.5 min, tiempo de incubación anti-h-IgG-HRP de 30 s, y tiempo de reacción enzimática de 10 min a 37 ° C. Tiempo total de análisis de 12 min.

### 2.5.5 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La aglomeración es una característica común de las partículas en los sistemas acuosos y ocurre cuando las nanopartículas dispersas individualmente se agrupan. La razón es que las partículas a nanoescala exhiben una enorme energía superficial debido a su mayor proporción de átomos de superficie y tienden a adherirse entre sí para reducirla. Además, el proceso de aglomeración se maximiza en las nanopartículas magnéticas debido a la existencia de atracción dipolo-dipolo entre ellas.<sup>155</sup> Este fenómeno puede reducirse o erradicarse con la adición de tensioactivos al sistema acuoso. Por este motivo, para obtener una mejor visualización de las nanopartículas, se decidió añadir un pequeño volumen de tensioactivo Tween 80 durante la preparación de la muestra.

Las imágenes TEM se muestran en la Figura 2-14. Las nanopartículas magnéticas sin conjugación de CCP (Figura 2-14(a)) se observan bien definidas, lo que significa que es fácil distinguirlas entre sí con un tamaño de partícula de alrededor de 10 nm. Las MNPs conjugadas con CCP mostraron la encapsulación de las nanopartículas, formando una especie de vesículas donde el péptido CCP se unió a la superficie (Figura 2-14(b)), lo que provocó un aumento de su tamaño hasta alrededor de 200 nm. Este aumento de tamaño fue aún más notorio al analizar la imagen de las MNPs-CCP al concluir el inmunoensayo, en este caso, el tamaño de la nanopartícula se incrementó al menos al doble del tamaño anterior con un promedio de alrededor de 450 nm debido a la unión de los anticuerpos involucrados en el inmunoensayo en la superficie de la nanopartícula como se ve en la Figura 2-14(c). Por tanto, el tamaño de la nanopartícula magnética aumentó en función del número de anticuerpos conjugados lo que corroboran la unión correcta durante el procedimiento del inmunoensayo.



**Figura 2-14.** Imágenes TEM de las nanopartículas magnéticas. (a) MNPs sin conjugación. (b) MNPs-CCP. (c) MNPs-CCP después de terminar el proceso del inmunoensayo.

### 2.5.6 Detección y cuantificación de anti-CCP en el microdispositivo

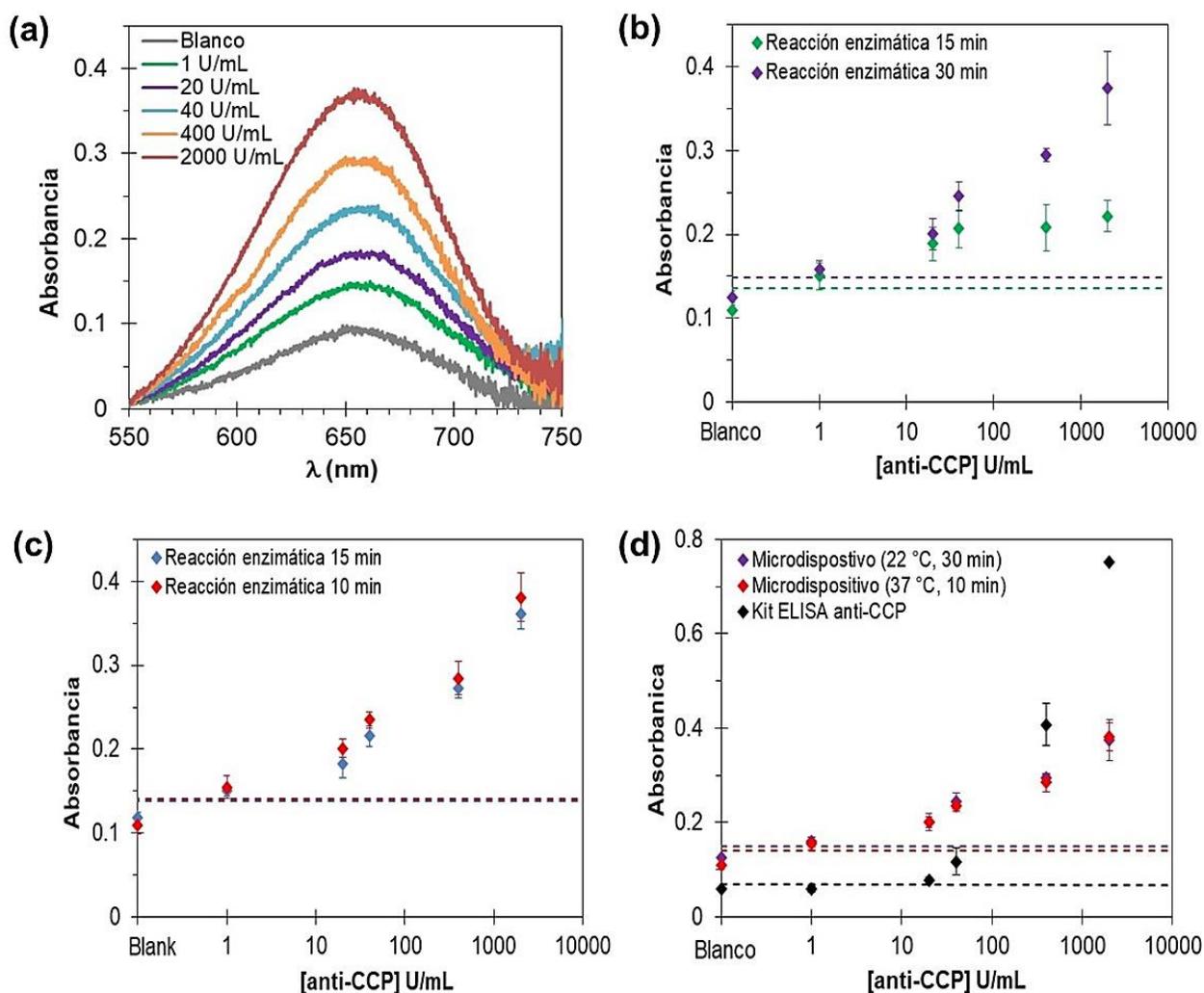
El principio del ensayo se basó en la unión de anti-CCP presente en los estándares o en la muestra de plasma diluida al antígeno (CCP) conjugado a las MNPs ( $70.9 \pm 5.4 \mu\text{g CCP/mg MNP}$ ). Después del tiempo de incubación, las MNPs-CCP se lavaron para eliminar los componentes no reactivos. El siguiente paso implicó la adición de la solución conjugada de anticuerpo con enzima anti-h-IgG-HRP, la cual reconoció los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Después del tiempo de incubación, cualquier exceso de enzima conjugada no específicamente unida se eliminó por lavado. Finalmente, se agregó una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para comenzar la reacción enzimática, dejando suficiente tiempo para el desarrollo del producto de reacción colorido debido a la oxidación de TMB. La cantidad de color fue directamente proporcional a la concentración de anti-CCP presente en el estándar o en las muestras. Las señales de medición espectrofotométrica típicas obtenidas se muestran en la Figura 2-15(a).

#### 2.5.6.1 Construcción de curvas de calibración

Las curvas de calibración de anti-CCP (1 — 2000 U/mL) construidas a  $22^\circ\text{C}$  se presentan en la Figura 2-15(b). Los límites de detección (LOD) 0.70 U/mL (15 min) y 0.71 U/mL (30 min) se determinaron considerando el promedio de la señal del blanco ( $n = 10$ ) más tres desviaciones estándar ( $S$ ). A pesar de la diferencia en el tiempo de reacción, ambos resultados fueron equivalentes y están muy por debajo del valor de corte (20 U/mL). Sin embargo, se observa una notoria diferencia entre ambas curvas de calibración. Con un tiempo de reacción enzimática de 15 min a  $22^\circ\text{C}$ , la absorbancia medida permaneció constante después de que una concentración de 40 U/mL, por lo que, bajo estas condiciones experimentales, sólo es posible tener una detección cualitativa de los anticuerpos. Sin embargo, si el tiempo de reacción enzimática aumenta hasta 30 min, es factible tener señales diferenciales para cada concentración de estándar de anti-CCP y cuantificar el anticuerpo. Al incrementar la temperatura a  $37^\circ\text{C}$  se obtuvieron señales analíticas equivalentes a las obtenidas con  $22^\circ\text{C}$  y 30 min de reacción, pero con un tiempo de reacción enzimática más corto, ver Figura 2-15(c). Una temperatura más alta ayudó a tener una reacción enzimática más rápida manteniendo los mismos valores de LOD (0.70 U/mL a los 10 min y 0.62 U/mL a los 15 min). Por lo tanto, con el propósito de reducir el tiempo total del inmunoensayo en el microdispositivo, se eligió el tiempo de reacción enzimática de 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  para probar el método desarrollado con muestras de plasma reales.

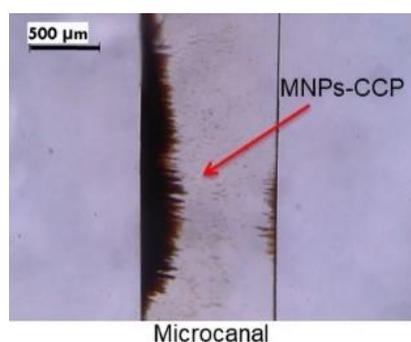
### 2.5.6.2 Análisis de muestras reales de plasma y comparación con el método convencional

La cuantificación de los controles de plasma positivo y negativo diluidos 1:100 en SAF se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción establecidas para el inmunoensayo en el microdispositivo. Los resultados se presentan en la Tabla 2-3. La concentración de anti-CCP para la muestra de plasma del paciente diagnosticado con AR tuvo un fuerte valor positivo (>1500 U/mL), mientras que la absorbancia de control negativo fue menor al valor del límite de detección.



**Figura 2-15.** Detección y cuantificación de anti-CCP. (a) Espectro de absorción típico para diferentes concentraciones de anti-CCP empleando el inmunoensayo en microdispositivo (tiempo de reacción enzimática 10 min a 37 °C). (b) Curvas de calibración del inmunoensayo en microdispositivo para 15 y 30 minutos de reacción enzimática a 22 °C (n = 3). (c) Curvas de calibración del inmunoensayo en microdispositivo para 10 y 15 minutos de reacción enzimática a 37 °C (n=3). (d) Comparación entre las curvas de calibración del inmunoensayo en microdispositivo (n = 3) e inmunoensayo de placa de microtitulación (n=2). Las líneas discontinuas en (b), (c) y (d) representan la señal del blanco + 3 S. Mediciones de absorbancia a  $\lambda = 650$  nm para inmunoensayo de microdispositivo y a  $\lambda = 450$  nm para EL kit ELISA anti-CCP.

Para comparar el rendimiento del inmunoensayo, se construyó una curva de calibración de anti-CCP en el mismo intervalo de concentración del inmunoensayo en el microdispositivo (1 – 2000 U/mL) siguiendo las instrucciones del método convencional de placa de microtitulación del kit anti-CCP ELISA.<sup>150</sup> Asimismo, se realizó la cuantificación de los controles positivo y negativo. La concentración de anti-CCP en el control positivo fue muy similar entre los dos métodos y, en ambos casos, no se pudo cuantificar el control negativo. Además, empleando el kit ELISA el LOD determinado fue de 11.50 U/mL (al menos 16 veces mayor que al emplear el microdispositivo). Si comparamos las curvas de calibración entre los dos métodos (Figura 2-15(d)), existe una mayor sensibilidad a bajas concentraciones cuando se trabaja con el microdispositivo. Este resultado podría atribuirse a la alta relación superficie/volumen de las MNPs-CCP<sup>156</sup> retenidas formando una aglomeración 3D y concentradas en un solo lado del microcanal (Figura 2-16), lo que ayudó a tener un área de contacto más grande entre el antígeno y el anticuerpo detectado.



**Figura 2-16.** Retención de las MNPs conjugadas con CCP dentro del microcanal al colocarse una torre de imanes.

Por lo tanto, el método de microdispositivo ofrece la posibilidad de detectar y cuantificar concentraciones más bajas de anti-CCP, lo que es importante para predecir el posible desarrollo de la enfermedad en pacientes propensos.<sup>157</sup> Sin embargo, a concentraciones más altas de anti-CCP, la absorbancia medida con el microdispositivo es notoriamente menor que la obtenida con el kit. La reducción en la sensibilidad podría atribuirse a la saturación en la superficie de los MNP-CCP. Por lo tanto, es probable que se requiera una cantidad mayor de 5  $\mu$ L de nanopartículas para obtener valores de absorbancia más altos. Como el propósito del inmunoensayo en el microdispositivo es reducir el volumen de reactivos empleados y el tiempo de análisis, la sensibilidad del método desarrollado se considera adecuada para la cuantificación.

La Tabla 2-3 resume los resultados para el inmunoensayo de microdispositivo y el método convencional de placa de microtitulación. El primero mostró el valor más bajo de LOD (0.70 U/mL tiempo de reacción enzimática 10 min a 37 °C), además presentó las ventajas de requerir un

volumen de muestra mucho más pequeño (6 µL) y un tiempo de ensayo más corto (12 min). Asimismo, la concentración de anti-CCP en el control positivo fue muy similar entre los dos métodos, y en ambos casos, el control negativo no pudo ser cuantificado. Se realizó una prueba *t* de Student para comparar las medias de ambos métodos mostrando que no hay diferencias estadísticamente significativas por lo que ambos métodos son equivalentes (Anexo 3).

**Tabla 2-3** Comparación de los resultados del inmunoensayo empleando el microdispositivo y el kit ELISA convencional para la cuantificación de biomarcadores anti-CCP.

<b>Característica</b>	<b>Inmunoensayo en microdispositivo</b>	<b>Inmunoensayo en microplaca</b>
Volumen	6 µL	100 µL
LOD	0.70 U/mL	11.50 U/mL
Tiempo de análisis	12 min	105 min
[anti-CCP] Control positivo	1505.19 ± 317.13 U/mL	1594.50 ± 173.24 U/mL
[anti-CCP] Control negativo	NC	NC

NC: No cuantificable, valor de A < LOD

### 2.5.7 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

En general, los análisis con pequeños volúmenes de muestras y reactivos conducen a mayores errores que cuando se analizan volúmenes más grandes. Para demostrar que la precisión de la metodología propuesta es al menos similar a la del kit ELISA, se realizó un análisis de repetibilidad (variación de la absorbancia de un estándar anti-CCP de 20 U/mL en un día empleando la misma equipo y analista) y de reproducibilidad intralaboratorio (variación de la absorbancia de un estándar anti-CCP de 20 U/mL entre diferentes días, utilizando el mismo equipo y analista). Los resultados de la medición de absorbancia por duplicado se localizan en la Tabla 2-4.

**Tabla 2-4.** Resultados para la medición de la precisión del método analítico al medir por duplicado la absorbancia de un estándar de anti-CCP 20 U/mL durante siete días.

<b>Día</b>	<b>A<sup>λ=650 nm</sup> ± S</b>		<b>Promedio</b>
	<b>Medición 1</b>	<b>Medición 2</b>	
1	0.209	0.199	0.204
2	0.227	0.237	0.232
3	0.212	0.226	0.219
4	0.220	0.227	0.224
5	0.238	0.236	0.237
6	0.205	0.209	0.207
7	0.205	0.227	0.216
<b>PROMEDIO TOTAL</b>			<b>0.220</b>

Con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor se obtuvo la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y el cuadrado medio (CM) de la variación de las absorbancias entre días y dentro de días (Tabla 2-5) que serán de utilidad para el cálculo de la precisión.

**Tabla 2-5.** Análisis de varianza de un factor para la determinación de la precisión de la metodología.

Origen de la variación	SC	GL	CM
Entre días	0.001773857	6	0.000295643
Dentro de días	0.0004745	7	6.7785 x 10 <sup>-5</sup>
Total	0.002248357	13	

La repetibilidad ( $S_R^2$ ), mide la variación de la señal analítica de la muestra obtenida en un mismo día (dentro de días) y se calculó considerando la Ecuación 2-2.

$$S_R^2 = CM_{dentro\ de\ días} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

La reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia ( $S_{WR}^2$ ), se determinó con las Ecuaciones 2-3 y 2-4, en donde  $n_j$  corresponde al número de réplicas realizadas por día ( $n_j = 2$ ).

$$S^2 = \frac{CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días}}{n_j} \quad \text{Ecuación 2-3}$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S^2 \quad \text{Ecuación 2-4}$$

Por último, se expresó la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio en términos de porcentaje con base en las Ecuaciones 2-5 y 2-6.

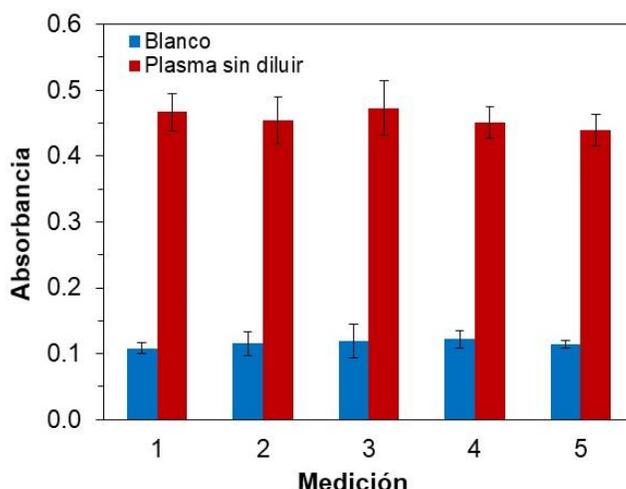
$$Repetibilidad = \left( \frac{S_R}{Promedio\ total} \right) 100 = \left( \frac{\sqrt{CM_{dentro\ de\ días}}}{Promedio\ total} \right) 100 \quad \text{Ecuación 2-5}$$

$$Reproducibilidad = \left( \frac{S_{WR}}{Promedio\ total} \right) 100 = \left( \frac{\sqrt{S_{WR}^2}}{Promedio\ total} \right) 100 \quad \text{Ecuación 2-6}$$

La repetibilidad obtenida fue de 3.8 %, mientras que la reproducibilidad fue de 6.1 %. Ambos porcentajes son muy similares a los reportados en el manual del kit ELISA convencional (5.5 % y 6.8 % respectivamente). Estos resultados muestran que, a pesar de usar solo 6  $\mu$ L para reactivos y muestras, existe una excelente precisión para el método propuesto.

### 2.5.8 Tiempo de vida de los microdispositivos

Se usó un control positivo sin diluir con el propósito de exponer la mayor cantidad de anti-CCP a las MNPs-CCP retenidas dentro del microcanal. Los resultados experimentales (Figura 2-17) mostraron que, a pesar del gran número de anticuerpos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cinco mediciones de absorbancia para el blanco ( $0.116 \pm 0.005$ ), y el control positivo sin diluir ( $0.457 \pm 0.013$ ). Por lo tanto, los microdispositivos son reutilizables y pueden emplearse para múltiples mediciones sin una variación significativa en las señales. Tener microdispositivos reutilizables es una gran ventaja atribuida al uso de MNPs-CCP como soporte sólido, ya que no hay magnetización remanente cuando se elimina el campo magnético, y la limpieza de los microcanales puede realizarse con facilidad.



**Figura 2-17.** Medidas de absorbancia a  $\lambda = 650$  nm del control positivo sin diluir y blanco (SAF) empleando los mismos tres microdispositivos para realizar el inmunoensayo.

## 2.6 CONCLUSIONES

El microdispositivo desarrollado permite la determinación de anti-CCP con un tiempo de análisis más corto que los empleados actualmente en métodos convencionales de microplaca (12 min contra 105 min) con una precisión y resultados equivalentes a los del kit ELISA, y con un límite de detección 16 veces menor (LOD 0.70 U/mL contra 11.50 U/mL). Los valores mínimos para los métodos actuales varían de un método a otro y de una prueba a otra, pero ninguno se ha desarrollado actualmente con un valor de LOD tan bajo como el presentado en esta investigación. Además, el microdispositivo desarrollado tiene la ventaja de requerir solo 6  $\mu$ L de muestras y reactivos (en comparación con los 100  $\mu$ L requeridos por el método convencional), y posee la gran ventaja de ser un microdispositivo reutilizable. Estas dos características ayudan a disminuir el costo del inmunoensayo. Así, utilizando 1 mL de cada reactivo se pueden realizar casi 167 pruebas, mientras que con el kit ELISA sólo se realizan 10.

Los resultados obtenidos utilizando un control de anti-CCP negativo y positivo mostraron que el inmunoensayo en microdispositivo empleando MNPs conjugados con CCP como soporte sólido, puede ser un excelente prototipo para la cuantificación de anti-CCP, siendo un método más rápido, económico, sensible y simple que los métodos actuales. También abre una ventana de oportunidad para la detección de otro tipo de biomarcadores con la posibilidad de disminuir los límites de detección actuales.

## \* CAPÍTULO III \*

### Microdispositivo basado en el efecto centrífugo y la ley de bifurcación para la separación de plasma de sangre total diluida en línea

#### 3.1 RESUMEN

La sangre total está compuesta por eritrocitos, linfocitos, plaquetas y plasma. Los cambios detectados en los perfiles de proteínas plasmáticas pueden reflejar condiciones fisiológicas o patológicas asociadas con muchas enfermedades, convirtiendo a la sangre en el líquido más importante para un diagnóstico clínico. La centrifugación es la técnica convencional más utilizada para la separación de plasma sanguíneo, sin embargo, este método puede consumir tiempo y producir la hemólisis de eritrocitos si no se emplea adecuadamente. Debido a su gran versatilidad, los dispositivos de microfluídica se han implementado como alternativa de separación. En el presente trabajo se diseñó, fabricó y caracterizó un innovador microdispositivo para la dilución de sangre total en línea con una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) y la separación de plasma. El microdispositivo se construyó con una sección transversal rectangular y microcanales en forma de espiral mediante fotolitografía y litografía suave por moldeo de réplica. Además, se modificó el ancho de los microcanales de salida con la finalidad de crear una diferencia en los caudales que facilitara la separación de plasma con base en la combinación del efecto centrífugo y la ley de bifurcación. La pureza de separación ( $\alpha$ ) bajo las condiciones de separación (caudal total entre 25 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , relación de caudal de entrada SAF/sangre total entre 4 y 10, y hematocrito (% HCT) entre 3 y 8) fue de alrededor del 100 %, mientras que la eficiencia de separación ( $\beta$ ) se determinó entre 8 y 13 %. La concentración de plasma separado fue entre 0.1 y 0.7 % (v/v) con caudales de salida de plasma entre 3 y 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La calidad del plasma diluido y separado se corroboró con una muestra de sangre de un paciente diagnosticado con AR mediante la cuantificación de anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) empleando un inmunoensayo en microdispositivo. El microdispositivo desarrollado tiene un alto potencial para acoplarse con la detección y cuantificación en línea de diferentes biomarcadores.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

La sangre total está compuesta por eritrocitos (glóbulos rojos), linfocitos (glóbulos blancos), plaquetas y plasma. La proporción de linfocitos y eritrocitos es de 1:600-1000.<sup>158</sup> Los glóbulos rojos ocupan aproximadamente el 45 % del volumen total de sangre en humanos adultos, también conocido como porcentaje de hematocrito (% HCT). El plasma sanguíneo, que representa alrededor del 55% del volumen total de la sangre total, está compuesto en un 95% por agua y varios biomarcadores circulantes, ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos.<sup>21,23</sup> Los anticuerpos y antígenos presentes en el plasma permiten el diagnóstico de diversas enfermedades, sin embargo, la correcta cuantificación de ellos depende en gran medida del manejo adecuado durante la toma y preparación de la muestra, siendo el paso de separación de plasma crucial.<sup>91</sup>

La separación de plasma se realiza comúnmente mediante centrifugación o filtración por membrana, sin embargo, estos métodos pueden estar limitados por diferentes factores como obstrucción de la membrana, daño celular si las muestras no se manipulan de manera adecuada, requieren una cantidad alta de muestra, además de una inversión relativamente alta de tiempo.<sup>91,92</sup> Debido a las posibles desventajas que pueden presentar los métodos de separación convencionales, las técnicas a microescala se han considerado como alternativas por ser herramientas que permiten la manipulación de volúmenes pequeños de muestra; la portabilidad, el rápido análisis, el costo relativamente bajo y la integración de varios pasos (pretratamiento de muestra, separación, reacciones y detección) son algunos de los beneficios del uso de dispositivos “Lab-on-a-chip” (LOC).<sup>22,159</sup> Por lo que, los dispositivos LOC se han convertido en un procedimiento rentable para la separación de plasma, sin embargo, la complejidad de la matriz en las muestras de sangre total es el principal desafío a enfrentar.<sup>20,21</sup>

En la actualidad, se encuentran disponibles varias soluciones que permiten lograr la extracción de plasma de manera miniaturizada, la mayoría de los trabajos reportados se han realizado en formato de microchip, diferenciándose entre separaciones pasivas y activas. La primera se realiza mediante fuerzas físicas e hidrodinámicas y el propio flujo, en donde las partículas/células se logran separar exclusivamente por sus propiedades mecánicas, como tamaño, forma y deformabilidad, debido a las diferentes geometrías de los microcanales o por la fabricación de microestructuras dentro de los microcanales.<sup>94</sup> Mientras que, los microdispositivos de separación activa requieren un campo externo adicional (acústico, eléctrico o magnético) para lograr la separación.<sup>21</sup>

Diferentes estudios para la separación microfluídica de plasma sanguíneo ya han sido publicados. La mayoría de ellos utilizan mecanismos de desviación celular, como obstáculos

inclinados<sup>95</sup> y fuerzas de elevación hidrodinámicas,<sup>96,97</sup> siendo la fuerza centrífuga<sup>25</sup> y el efecto Zweifach-Fung (ley de bifurcación) los más empleados.<sup>24,98</sup>

Por ejemplo, Wu *et al.* reportó un microdispositivo en espiral con sección transversal trapezoidal y demostró su capacidad para separar leucocitos de sangre humana diluida (1—2 % HCT) con una eficiencia mayor a 80 %.<sup>109</sup> Por su parte, Rafeie *et al.* trabajó en el desarrollo de un microdispositivo con ocho microcanales en espiral conectados con una sección transversal trapezoidal para la separación de plasma empleando sangre humana diluida (0.5—1 % HCT), su diseño alcanzó un caudal máximo de 24 mL/min con una alta eficiencia de separación.<sup>25</sup> Sin embargo, es importante recalcar que todos ellos realizan la separación introduciendo al microdispositivo muestras de sangre previamente diluidas; hasta la fecha, ningún trabajo ha explorado la dilución y su estudio dentro del mismo microdispositivo.

En este capítulo, se fabricó un microdispositivos de PDMS para la dilución en línea de sangre total y posterior separación de plasma basado en el efecto centrífugo y la ley de bifurcación. Este microdispositivo se diferencia de los demás en su diseño, brindando la oportunidad de diluir la sangre total empleando el mismo microdispositivo y calculando el % HCT antes de realizar la separación de plasma, característica que no había sido estudiada por ningún otro trabajo hasta ahora, además, tiene un alto potencial para poder ser acoplado con posteriores análisis de biomarcadores en el plasma separado.

### 3.3 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, fabricar y evaluar el funcionamiento de un microdispositivo en espiral de PDMS para la dilución en línea de sangre total y subsecuente separación de plasma con base en el efecto centrífugo y ley de la bifurcación.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Emplear las técnicas de fotolitografía y litografía suave por moldeo de réplica para la fabricación de microdispositivos de PDMS.
- Caracterizar los microdispositivos construidos.
- Optimizar la dilución de sangre total y la separación de plasma en el microdispositivo evaluando parámetros como: diseño de los microcanales, porcentaje de nivel de hematocrito en las muestras de sangre y caudal empleado.
- Determinar el caudal de salida, así como la concentración del plasma diluido y separado.
- Calcular la pureza y eficiencia de la separación de plasma.
- Corroborar la calidad del plasma separado por medio de la cuantificación de un biomarcador presente en el mismo.

### 3.4 METODOLOGÍA

#### 3.4.1 Reactivos

La resina fotosensible SU-8 3035 se adquirió de Microchem Inc., el kit de polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 y el surfactante TRITON™ X-100 se adquirieron de Dow Corning Corporation, 2-propanol, acetato de éter monometílico de propilenglicol, nanotubos de carbono multipared (diámetro 110—170 nm, longitud 5—9  $\mu\text{m}$ ), glicerina y la solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.01 mol/L, pH 7.4 se adquirieron de Sigma-Aldrich.

#### 3.4.2 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos

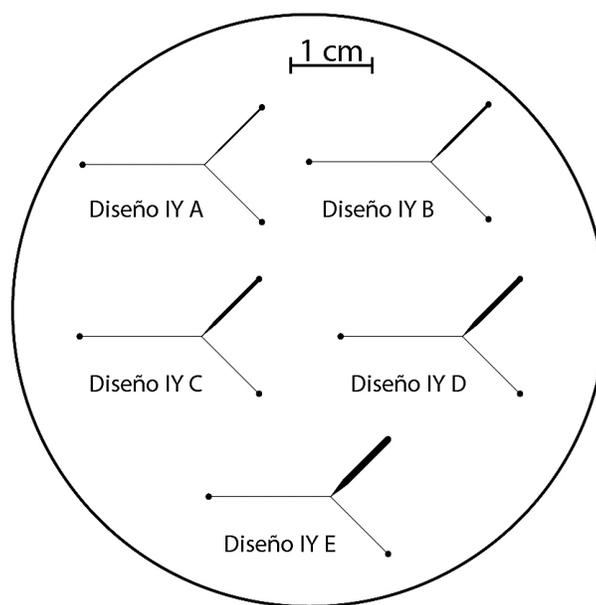
La fabricación y caracterización de los microdispositivos de PDMS se realizó de acuerdo con procedimiento descrito en el Capítulo II sección 2.4.2, con la diferencia de que el programa para la distribución de la fotorresina en el spin-coater se implementó sólo una vez para los microdispositivo de separación de plasma (profundidad  $\approx 100 \mu\text{m}$ ); y con un programa de 500 rpm durante 10 s (aceleración 100 rpm/s) seguido por 2000 rpm durante 30 s (aceleración 300 rpm/s para los microdispositivos usados durante los experimentos iniciales (profundidad  $\approx 50 \mu\text{m}$ ).

### 3.4.3 Experimentos iniciales

Los experimentos iniciales realizados se centraron en la evaluación del funcionamiento del microdispositivo en dos aspectos: (1) la diferencia de caudales de salida creada al variar el ancho de dos microcanales empleando un dispositivo con forma de intersección en Y; (2) ver el comportamiento de nanopartículas al ser introducidas en este microdispositivo de acuerdo con la ley de la bifurcación.

#### 3.4.3.1 Estudio de la relación de caudal de salida en función de la relación del ancho de microcanal

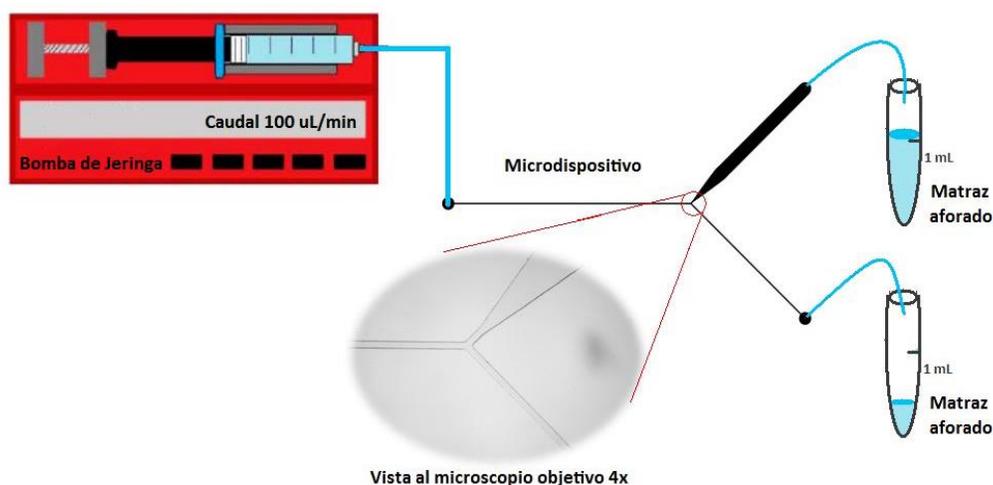
Se construyeron cinco microdispositivos con un diseño con forma de intersección-Y identificados como IY A—E, los cuales se diferenciaron únicamente por variar el ancho de uno de los microcanales de salida desde aproximadamente 160  $\mu\text{m}$  hasta alrededor de 800  $\mu\text{m}$ , manteniendo el otro microcanal con un ancho fijo de alrededor de 60  $\mu\text{m}$  (Figura 3-1), con la finalidad de crear una diferencia de caudal.



**Figura 3-1.** Diseño de los microdispositivos construidos para la realización del estudio previo. Se cuenta con cinco diseños de intersección-Y (A—E) con modificación en el ancho de uno de los microcanales de salida.

Se preparó una solución acuosa de glicerina al 36 % v/v (densidad = 1.10 g/mL y viscosidad dinámica = 3.35 mPa·s), la cual se sonicó durante 15 min para eliminar cualquier burbuja de aire y se filtró a través de un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman) con el objetivo de evitar el ingreso de pelusas que pudieran obstaculizar los microcanales y modificar el flujo.

De acuerdo con el montaje experimental que se presenta en la Figura 3-2, se ingresó la solución de glicerina al 36 % v/v a cada uno de los diseños IY A—E con un caudal de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se cronometró el tiempo en que, por cada una de las dos salidas, se dispensaba un volumen total de 1 mL por triplicado empleando para la recolección un matraz aforado; el correcto funcionamiento del microdispositivo se monitoreo observando al microscopio con un objetivo 4x (DM750, Leica Microsystems) la intersección de los microcanales para detectar cualquier tipo de obstrucción de los mismos.



**Figura 3-2.** Montaje experimental para el estudio de RCS en función de RAM. Se tiene una bomba de jeringa unida con tubería de teflón a la entrada del microdispositivo diseño IY. Cada una de las dos salidas se conectó con tubería de teflón a un matraz aforado de 1 mL para la recolección del líquido.

Con los resultados obtenidos se realizó el cálculo del caudal de salida en ambos microcanales en el orden de  $\mu\text{L}/\text{min}$  obteniendo así una relación de caudales de salida (RCS) al dividir el caudal mayor ( $Q_{MM}$ ) entre el caudal menor ( $Q_{MR}$ ), tal que  $RCS = Q_{MM}/Q_{MR}$ . Asimismo, se determinó la relación del ancho de los microcanales (RAM) dividiendo el ancho del microcanal mayor ( $A_{MM}$ ) entre el ancho del microcanal menor ( $A_{MR}$ ), teniendo así  $RAM = A_{MM}/A_{MR}$ . Posteriormente se construyó un gráfico que relaciona los valores de RCS en función de RAM con el propósito de conocer si RCS y RAM mantenían una relación directamente proporcional.

### 3.4.3.2 Observación de la ley de la bifurcación

Se preparó una dispersión de nanotubos de carbono multipared (diámetro 110—170 nm, longitud 5—9  $\mu\text{m}$ ) a una concentración de 40 mg/L en surfactante tritón X-100 al 1.3 % con una relación 1:350, la cual se colocó en un baño de ultrasonido durante 2 horas.<sup>160</sup>

Esta dispersión se introdujo al microdispositivo identificado como diseño IY E a través de una bomba de jeringa (NE-300, New Era Pump Systems) con un caudal programado de 0.8  $\mu\text{L}/\text{h}$  siguiendo un montaje experimental similar al presentado en la Figura 3-2, sin la necesidad de colocar tuberías de salida debido al bajo caudal de trabajo. Se observó al microscopio (DM750, Leica Microsystems) el comportamiento de los nanotubos de carbono al llegar a la zona de intersección dentro del microcanal, con la finalidad de corroborar que la mayoría de las nanopartículas se desplazan hacia el canal más ancho (canal de mayor caudal).

#### 3.4.4 Toma de muestras de sangre

Se tomaron diversas muestras de sangre de mujeres y hombres de entre 25 y 50 años. Las muestras se recolectaron utilizando un tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA K2 y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (máximo 8 días).

#### 3.4.5 Medición del porcentaje de hematocrito (% HCT) en las muestras de sangre

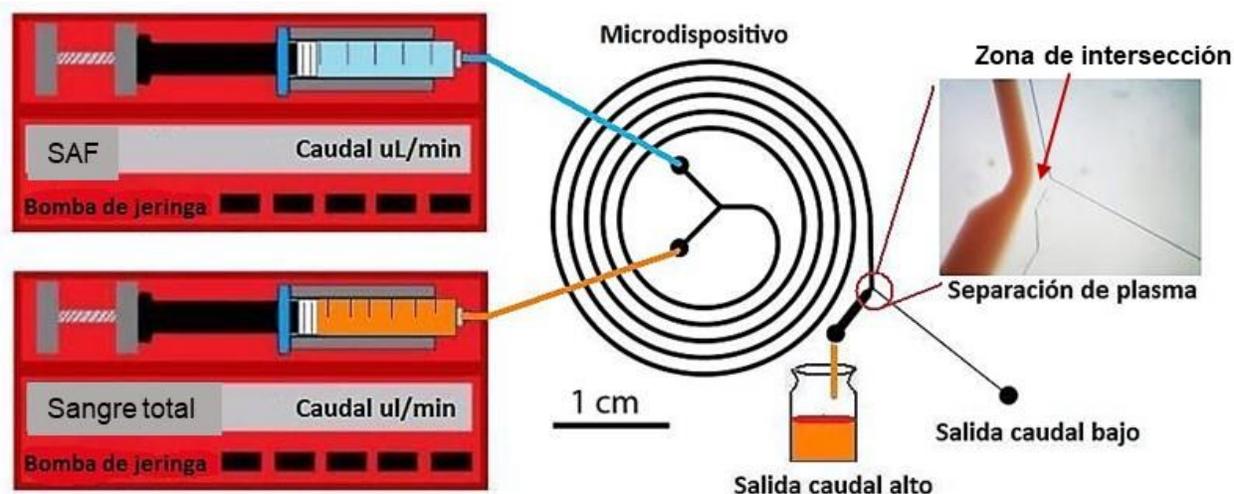
Un tubo capilar con heparina (diámetro 1 mm, longitud 75 mm) se llenó con la muestra de sangre a tres cuartas partes de su longitud total, se selló en uno de sus extremos con un tapón de plastilina y se centrifugó a 3000 rpm durante 8 min. Después del centrifugado, se midió la longitud correspondiente a la muestra de sangre total (T) y a la fracción de eritrocitos (E) y se calculó el porcentaje de hematocrito (% HCT) con base en la Ecuación 3-1. El % HCT se determinó por triplicado para cada muestra.

$$\% HCT = \left(\frac{E}{T}\right) 100 \quad \text{Ecuación 3-1}$$

#### 3.4.6 Montaje experimental para la dilución de sangre y separación de plasma

La dilución y separación de plasma sanguíneo se llevó a cabo en flujo continuo empleando la siguiente configuración: se colocaron dos bombas de jeringa (NE-300, New Era Pump Systems) con jeringas de 3 mL (BD Plastipak™) conectadas con tubería de teflón de 0.022 pulgadas de diámetro interno (Cole Parmer) a las entradas del microdispositivo por donde ingresan la muestra de sangre total y la solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.01 mol/L pH 7.4 a diferente caudal en el orden de  $\mu\text{L}/\text{min}$ , realizando así la dilución *in situ*. El cociente entre el caudal de entrada de SAF ( $Q_{\text{SAF}}$ ) y el caudal de entrada de sangre total ( $Q_{\text{S}}$ ) se definió como la relación de caudales de entrada ( $\text{RCE} = Q_{\text{SAF}}/Q_{\text{S}}$ ), mientras que

la suma de ambos caudales se definió como el caudal total ( $Q_{\text{Total}} = Q_{\text{SAF}} + Q_{\text{S}}$ ). Cuando la muestra de sangre diluida alcanzó la zona de intersección, el plasma fue separado del resto de células sanguíneas (Figura 3-3).



**Figura 3-3.** Configuración experimental para la dilución de sangre total y separación de plasma. Se tienen dos bombas de jeringa unidas con tubería de teflón a las entradas del microdispositivo por donde ingresan la solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.01 mol/L pH 7.4 y la muestra de sangre total a diferentes caudales. Por la salida de mayor caudal se recolectan las células sanguíneas mientras que por la salida de menor caudal el plasma diluido.

### 3.4.7 Estudio de la separación de plasma modificando valores de RCE y $Q_{\text{Total}}$

Una muestra de sangre con % HCT inicial de  $44.66 \pm 0.46$  se introdujo al microdispositivo junto con SAF con valores de RCE entre 0.5 y 10, y  $Q_{\text{Total}}$  entre 5 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los experimentos se condujeron de la muestra de sangre más diluida (RCE = 10) a la más concentrada (RCE = 0.5), y del caudal total menor al mayor. Se observó durante 3 min la separación de plasma al microscopio (DM750, Leica Microsystems) y se tomaron las imágenes correspondientes para su posterior evaluación.

### 3.4.8 Variación del % HCT en función de los valores de RCE (dilución en línea)

El valor de RCE es el parámetro que relaciona la cantidad de SAF y de muestra de sangre que ingresa al microdispositivo, y, por lo tanto, influye directamente en la dilución realizada en el microdispositivo modificando el valor de % HCT de la muestra. Para su estudio, tres muestras de sangre, con % HCT inicial de  $44.66 \pm 0.46$ ,  $50.50 \pm 0.52$  y  $42.30 \pm 0.74$ , se introdujeron por separado a un microdispositivo con un montaje experimental semejante al presentado en la

Figura 3-3, con la diferencia de tener un orificio de salida en la zona de intersección. Los caudales de entrada se modificaron para obtener RCE entre 0.5 y 10 con un caudal total fijo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Las muestras de sangre diluida en línea se recolectaron por triplicado bajo cada una de las condiciones experimentales durante 3 min y se determinó el % HCT. Posteriormente, para cada valor de RCE se calculó el % de disminución de HCT en comparación con % HCT inicial (sangre sin diluir), y se realizó el gráfico correspondiente: % de disminución de HCT vs. RCE. Con dicho gráfico se obtuvo un modelo matemático con el que fue posible calcular el % HCT de las muestras de sangre diluidas en el microdispositivo al variar el valor de RCE.

### **3.4.9 Medición del caudal de salida de plasma**

Se midió el caudal de salida de plasma una vez separado del resto de sangre. Esta medición se realizó a 3 caudales totales diferentes  $Q_{\text{Total}} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $\text{RCE} = 10, 8, 6$  empleando una muestra de sangre con % HCT inicial de  $45.23 \pm 1.11$ . Para ello se recolectó en un tubo capilar el volumen dispensado en la salida de plasma durante 1 min ( $n = 10$ ) para cada condición experimental y se midió la altura alcanzada en el capilar por el líquido. Para poder convertir la medida de altura en volumen, se construyó un gráfico relacionando diferentes volúmenes de SAF (2.5 a 40  $\mu\text{L}$ ) con la altura que dicho líquido alcanzó dentro de un tubo capilar.

### **3.4.10 Medición de la concentración de plasma separado**

Se realizó un estudio para conocer la concentración de plasma después del proceso de dilución y separación en el microdispositivo. Se utilizaron cinco tubos BD Vacutainer® con 4 mL de una muestra de sangre (% HCT inicial de  $44.12 \pm 0.42$ ); uno de ellos se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min y se separó el plasma, éste se empleó para realizar una serie de diluciones abarcando concentraciones de plasma entre 0.05 y 1.50 % (v/v). Cada una de ellas se midió por triplicado espectrofotométricamente a  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , construyendo así una curva de calibración. Con el resto de la muestra de sangre total se realizó la separación de plasma en el microdispositivo empleando valores de  $Q_{\text{Total}} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  y valores de  $\text{RCE} = 10, 8, 6$  y 4. Se recolectó por duplicado el plasma diluido separado bajo cada condición experimental (aproximadamente 400  $\mu\text{L}$ ) y se midió la absorbancia a  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Empleando la curva de calibración previamente construida se calculó la concentración porcentual en el plasma diluido en función de los valores de  $Q_{\text{Total}}$  y RCE.

### 3.4.11 Evaluación del funcionamiento del microdispositivo

El funcionamiento del microdispositivo se estudió con base en dos factores: la pureza y eficiencia de separación de plasma.

#### 3.4.11.1 Medición de la pureza de separación ( $\alpha$ )

Empleando una muestra de sangre con % HCT inicial de  $45.23 \pm 1.11$  se estudió la pureza de separación de plasma a un caudal total de 25, 50 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  y RCE de 10, 8, 6 y 4. El microdispositivo se colocó en un microscopio invertido (DMI3000B, Leica Microsystems) y para cada condición experimental se grabó un video durante tres minutos en el microcanal de salida de plasma con una cámara phantom (Miro M110) empleando un objetivo 20x. Del video se tomó una fotografía cada 18-20 s para tener un total de 10 imágenes. Se empleó el programa *ImageJ* para calcular el % área ocupada por las células sanguíneas que pudieran estar presentes en el plasma después de ser separado.

Para determinar el % área ocupada por las células de sangre en la muestra sin separación de plasma, se repitió el procedimiento anterior con una ligera modificación. En este caso se obstruyó el microcanal de salida de mayor caudal obligando a ingresar a toda la muestra de sangre al microcanal destinado al plasma. Las imágenes obtenidas se analizaron nuevamente con el programa *ImageJ* para determinar el % área ocupada por las células sanguíneas sin separación de plasma.

A los valores promedio de % área antes y después de la separación de plasma se les resta el valor de un blanco, obtenido al tomar imágenes del microcanal de plasma lleno únicamente con SAF. Por último, se hizo una comparativa entre el % área ocupada por células en la sangre sin separar y el % área ocupada por células en el plasma una vez separado y se calculó la pureza de separación ( $\alpha$ ) en términos de porcentaje con base en la Ecuación 3-2.

$$\alpha = \left(1 - \frac{Cel_{ds}}{Cel_{as}}\right) 100 \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Donde  $Cel_{ds}$  es el % área que ocupan las células en el plasma después de la separación,  $Cel_{as}$  es el % área que ocupan las células antes de la separación.

Posteriormente, se repitieron las condiciones experimentales mencionadas para la medición de la pureza de separación con la misma muestra de sangre almacenada en refrigeración durante un periodo de ocho días a 4 °C y se calculó el valor de  $\alpha$  al observar la formación de aglomerados celulares adheridos a la zona de intersección del microdispositivo.

#### 3.4.11.2 Medición de la eficiencia de separación ( $\beta$ )

Se calculó el % del volumen de plasma separado considerando el volumen total de plasma en la muestra de sangre diluida en el microdispositivo y el volumen de plasma recolectado durante un minuto ( $n = 10$ ) con base en la Ecuación 3-3.

$$\beta = \left( \frac{V_S}{V_{Total}} \right) 100 \quad \text{Ecuación 3-3}$$

En donde  $V_S$  corresponde al volumen de plasma separado y recolectado, y  $V_{Total}$  al volumen de plasma total disponible.

#### 3.4.12 Evaluación de la calidad del plasma diluido y separado en línea

La calidad del plasma diluido y separado en el microdispositivo se evaluó con una muestra de sangre de un paciente diagnosticado con AR (% HCT =  $44.60 \pm 0.43$ ) mediante la cuantificación de anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP). La cuantificación se realizó empleando el inmunoensayo en microdispositivo con nanopartículas magnéticas descrito en el Capítulo II sección 2.4.6. Para la dilución de la muestra de sangre y separación de plasma se fijaron las condiciones experimentales  $Q_{Total} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $RCE = 4$  y se recolectó durante 10 min el plasma diluido y separado. Además, con la misma muestra de sangre se separó el plasma por centrifugación (4500 rpm durante 15 min) y se diluyó con SAF hasta una concentración de 0.7 % (v/v) (7  $\mu\text{L}$  de plasma + 993  $\mu\text{L}$  de SAF). Esta dilución se seleccionó porque es la concentración en la que se diluye el plasma dentro del microdispositivo bajo las condiciones de separación experimentales ( $Q_{Total} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $RCE = 4$ ). Así, se utilizaron las muestras de plasma procesadas tanto en lote como en microdispositivo para realizar el inmunoensayo en microdispositivo para la cuantificación anti-CCP por triplicado, los resultados obtenidos se compararon entre sí.

### 3.4.13 Procedimiento de limpieza de los microdispositivos

Con la finalidad de retirar cualquier remanente de sangre, los microdispositivos una vez usados se lavaron con solución salina al 1 % (v/v) en flujo continuo a un caudal de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 10 min. Posteriormente, se enjuagaron con SAF 0.01 mol/L pH 7.4 al mismo caudal y se secaron con aire a presión. Como un paso extra se colocó bajo luz UV a 254 nm por 25 min. Concluido el procedimiento están listos para reutilizarse sin ninguna variación en la separación de plasma.

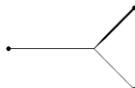
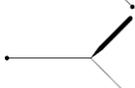
## 3.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.5.1 Experimentos iniciales

#### 3.5.1.1 Estudio de la relación de caudal de salida en función de la relación del ancho del microcanal

En la Tabla 3-1 se muestran los resultados de la caracterización de los microdispositivos IY A—E, en donde se especifican tres valores de ancho de microcanal. El microcanal principal corresponde a la entrada de la solución de glicerina 36 % v/v hasta la zona de intersección. El microcanal mayor es aquel que presenta un ancho de microcanal superior en los canales bifurcados en comparación con el microcanal menor, todo esto con el fin de crear una diferencia en los caudales de salida.

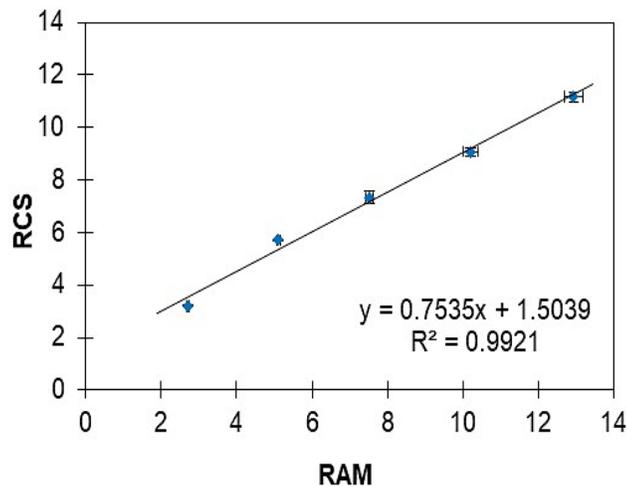
**Tabla 3-1.** Caracterización de los microdispositivos diseños IY A—E para la realización de experimentos iniciales.

Diseño	Ancho de los microcanales ( $\mu\text{m}$ )			Profundidad ( $\mu\text{m}$ )
	Principal	Mayor	Menor	
IY A 	$60.1 \pm 1.2$	$161.1 \pm 1.2$	$60.0 \pm 1.1$	$46.7 \pm 0.8$
IY B 	$60.2 \pm 2.6$	$304.4 \pm 2.0$	$60.0 \pm 1.0$	$47.6 \pm 1.5$
IY C 	$60.2 \pm 0.8$	$451.9 \pm 2.2$	$60.1 \pm 1.0$	$48.4 \pm 1.7$
IY D 	$58.0 \pm 1.4$	$608.5 \pm 1.8$	$59.7 \pm 1.3$	$48.5 \pm 1.5$
IY E 	$59.6 \pm 1.8$	$771.6 \pm 3.5$	$59.6 \pm 1.4$	$48.1 \pm 1.6$

Para esta serie de experimentos se decidió emplear una solución acuosa de glicerina con una concentración 36 % v/v para simular las propiedades de una muestra de sangre (densidad de 1.10 g/mL y viscosidad dinámica de 3—4 mPa·s).<sup>161</sup> En la Tabla 3-2 se muestran los resultados del caudal de salida calculado, el valor de RCS para cada uno de los diseños del microdispositivo, asimismo se presentan los valores de medida de ancho de microcanal y RAM. La Figura 3-4 representa la relación de caudales de salida (RCS) en función de la relación del ancho de los microcanales (RAM). Ambos parámetros mostraron tener una relación lineal directamente proporcional, lo que implica que, al modificar el ancho de uno de los microcanales de salida es posible crear una diferencia de caudales dentro del microdispositivo. Así, el microcanal más ancho será aquel que presente un mayor caudal en comparación con el microcanal menos ancho.

**Tabla 3-2.** Resultados del caudal de salida calculado ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ), relación de caudales de salida (RCS), ancho de los microcanales y relación del ancho de los microcanales (RAM).

Diseño	Ancho del microcanal ( $\mu\text{m}$ )		RAM	Caudal de salida ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )		RCS
	Mayor	Menor		Mayor	Menor	
IY A	161.1 $\pm$ 1.2	60.0 $\pm$ 1.1	2.70 $\pm$ 0.03	74.29 $\pm$ 0.23	23.20 $\pm$ 0.22	3.20 $\pm$ 0.03
IY B	304.4 $\pm$ 2.0	60.0 $\pm$ 1.0	5.10 $\pm$ 0.05	82.16 $\pm$ 0.47	14.37 $\pm$ 0.02	5.71 $\pm$ 0.04
IY C	451.9 $\pm$ 2.2	60.1 $\pm$ 1.0	7.52 $\pm$ 0.09	83.55 $\pm$ 2.83	11.39 $\pm$ 0.44	7.34 $\pm$ 0.23
IY D	608.5 $\pm$ 1.8	59.7 $\pm$ 1.3	10.20 $\pm$ 0.19	85.31 $\pm$ 0.93	9.40 $\pm$ 0.07	9.08 $\pm$ 0.15
IY E	771.6 $\pm$ 3.5	59.6 $\pm$ 1.4	12.94 $\pm$ 0.25	90.11 $\pm$ 1.50	8.07 $\pm$ 0.20	11.17 $\pm$ 0.19

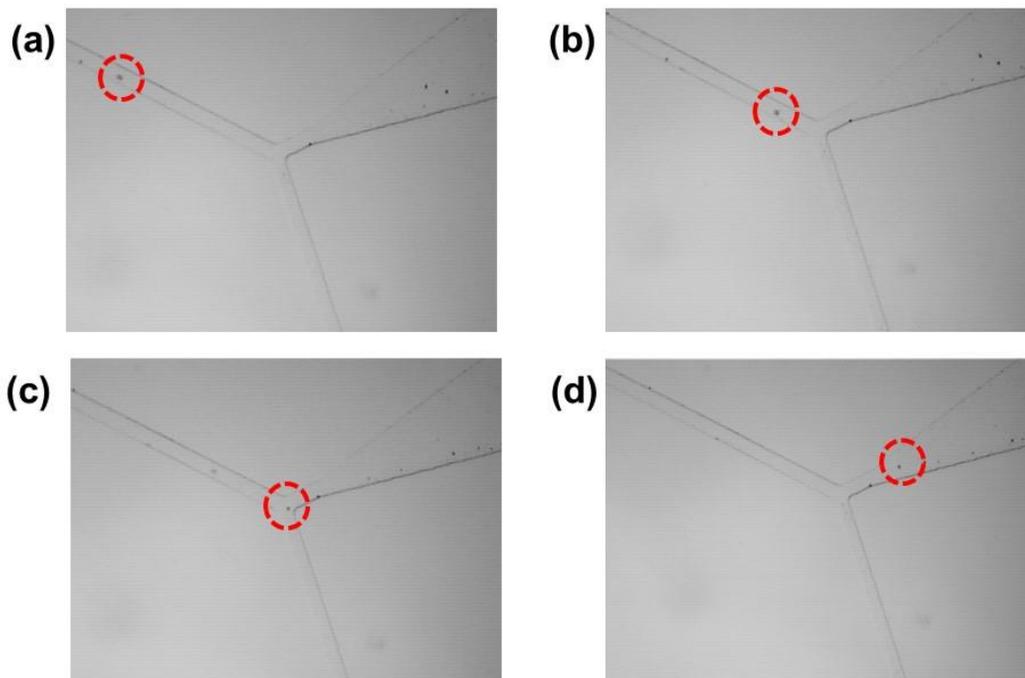


**Figura 3-4.** Relación de caudales de salida (RCS) en función de la relación del ancho de los microcanales (RAM) empleando una solución de glicerina 36 % v/v (n = 3).

### 3.5.1.2 Observación de la ley de la bifurcación

La ley de la bifurcación (también conocida como efecto Zweifach-Fung) describe que, cuando una suspensión de partículas viaja a través de un microcanal y pasa a través de una bifurcación con velocidades de flujo diferentes, la fracción de partículas será mayor en el microcanal de caudal más alto. Expresado de otra manera, las partículas serán “atraídas” hacia el microcanal con caudal más alto.<sup>100</sup>

Como se aprecia en la Figura 3-5, tal como lo describe la ley de la bifurcación, los nanotubos de carbono mostraron preferencia hacia el microcanal de mayor caudal (microcanal más ancho), dicho comportamiento fue más notorio cuando las nanopartículas formaban conglomerados, aumentando así el tamaño de partícula y facilitando su identificación bajo el microscopio.



**Figura 3-5.** Secuencia de imágenes de la distribución de la dispersión de nanotubos de carbono en tritón X-100 1.3 % relación 1:350 al viajar dentro de los microcanales del microdispositivo diseño IY E con un caudal de 0.8  $\mu\text{L/h}$ . El círculo discontinuo muestra la posición de una aglomeración de nanotubos de carbono antes de llegar a la zona de intersección (a) y (b); en la zona de intersección (c); y después de la intersección (d) en donde se dirige hacia el microcanal de mayor caudal (más ancho). Vista al microscopio empleando un objetivo 4x.

### 3.5.2 Características y funcionamiento del microdispositivo

Una fotografía del microdispositivo de PDMS construido, así como las imágenes de la sección transversal para la determinación del ancho y profundidad de diferentes partes del microdispositivo se muestran en la Figuras 3-6 y 3-7 respectivamente.

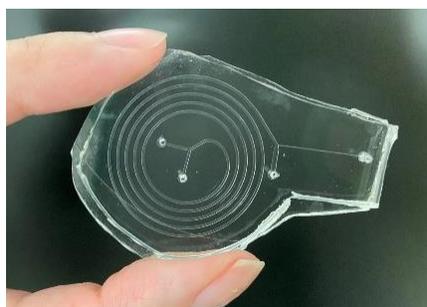


Figura 3-6. Fotografía del microdispositivo de PDMS construido.

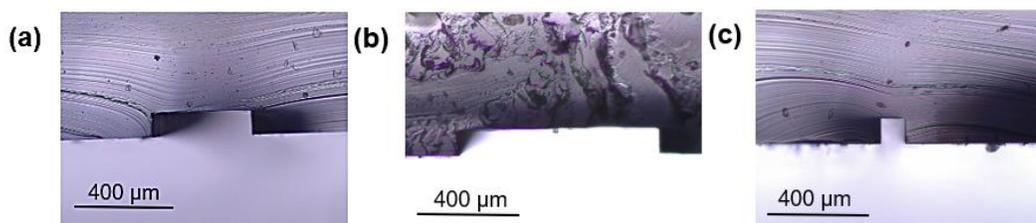
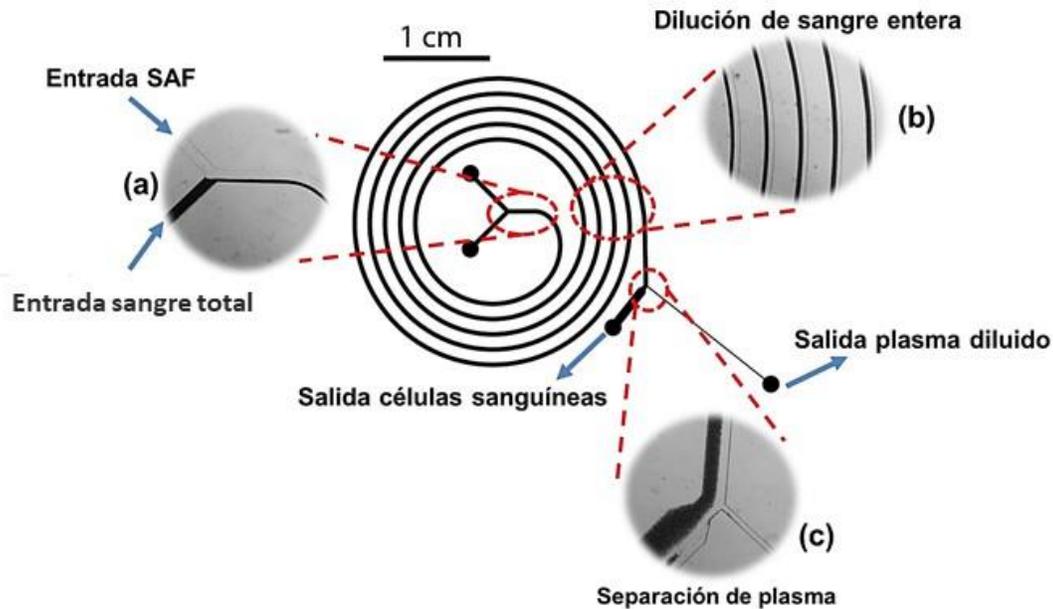


Figura 3-7. Imágenes de la sección transversal de los microcanales (objetivo 100x). (a) canal principal (microcanal en espiral), (b) microcanal de salida de células sanguíneas y (c) microcanal de salida de plasma. Las medidas del microcanal son: profundidad  $104.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$ , ancho del microcanal principal  $397.30 \pm 5.79 \mu\text{m}$ , ancho del microcanal de salida de plasma  $97.01 \pm 2.82 \mu\text{m}$  y ancho del microcanal de salida de células sanguíneas  $820.70 \pm 3.60 \mu\text{m}$ .

El diseño del microdispositivo, mostrado en la Figura 3-8, consiste en dos entradas y dos salidas conectadas por un canal en espiral con una sección transversal rectangular cuyas medidas son profundidad  $104.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$  y ancho  $397.3 \pm 5.8 \mu\text{m}$ . Los microcanales de salida son de diferente ancho con la finalidad de inducir una diferencia en los caudales que permita la separación del plasma del resto de las células (ancho de microcanal de salida de plasma  $97.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$ , ancho de salida de microcanal de células sanguíneas  $820.7 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ), de tal manera que la salida con un mayor ancho de microcanal tiene un mayor caudal con un valor de  $\text{RAM} = 8.5$ . Para llevar a cabo la separación, el dispositivo utiliza dos efectos principales: (1) el efecto centrífugo, que tiene como principal función el mantener el mayor número de células sanguíneas pegadas a la pared interna del microcanal y (2) la ley de bifurcación o efecto Zweifach-Fung, variando el ancho de los microcanales de salida para la separación por diferencia de caudal. Además, el mezclado de la muestra de sangre con el diluyente SAF se realiza por medio del fenómeno de difusión a lo largo del microcanal favorecido por la curvatura. Es importante recalcar que, si se trabajara únicamente con un microcanal recto, la dilución de la sangre se lograría por difusión manteniendo un flujo laminar con caudales menores a  $1 \mu\text{L}/\text{min}$  para lograr la

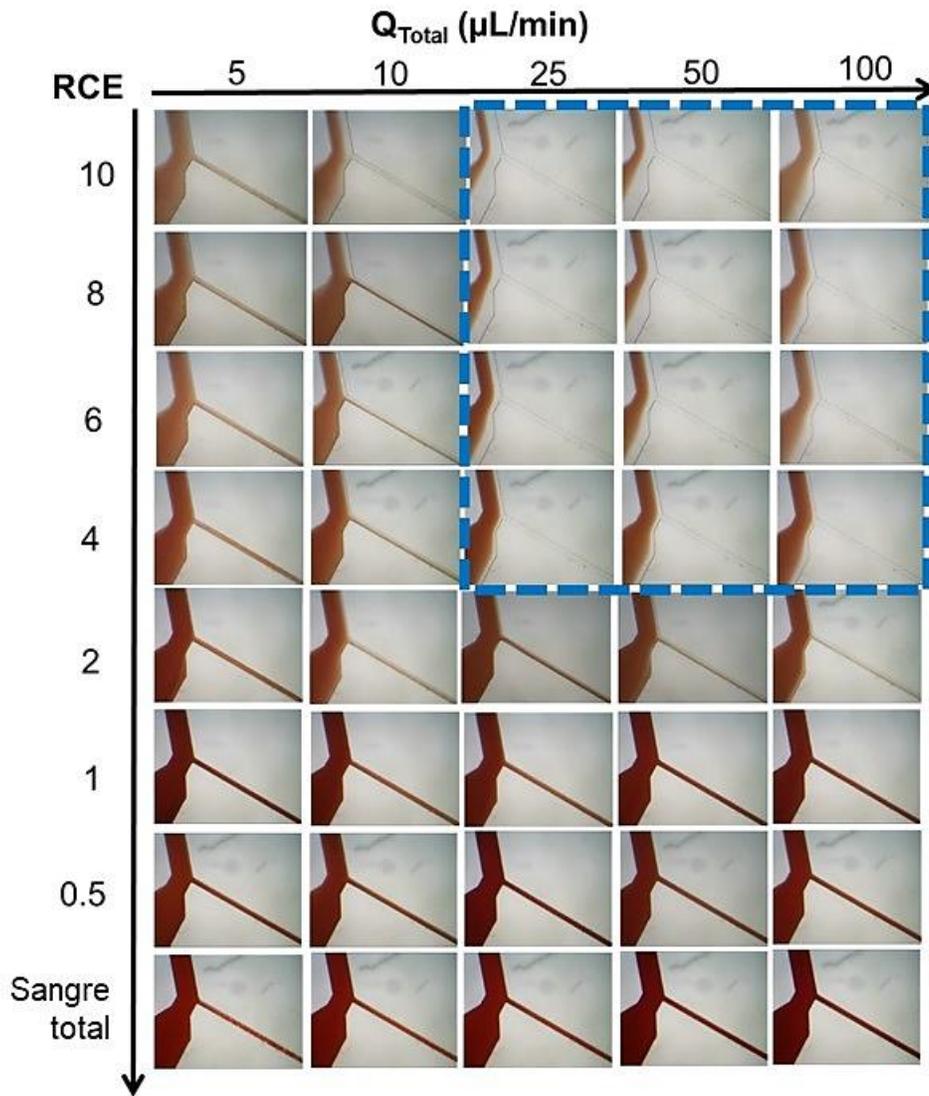
separación del plasma debido al fenómeno de sedimentación de las células sanguíneas similar al trabajo reportado por Sun *et al.*<sup>162</sup>



**Figura 3-8.** Componentes del microdispositivo para la separación de plasma de sangre diluida en línea. (a) Entrada de sangre total y SAF. (b) Recorrido en espiral para la dilución de la muestra y posicionamiento de las células sanguíneas. (c) Separación de la muestra de sangre por diferencia de caudales.

### 3.5.3 Estudio de la separación de plasma modificando valores de RCE y $Q_{Total}$

En la Figura 3-9 se presentan los resultados de la separación de plasma en función de la relación de caudales de entrada (RCE) y caudal total ( $Q_{Total}$ ). Se observa que el valor de RCE demostró ser un factor importante para efectuar la separación, así, mientras más diluida se encuentre la muestra de sangre (mayor RCE) existe un menor número de células sanguíneas por unidad de volumen lo que facilita la separación de plasma. A caudales de 5 y 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  la fuerza centrífuga es menor (menor número de Dean), lo que impide el reposicionamiento de las células sanguíneas hacia la pared interna del microcanal y la correcta separación de plasma debido a la baja fuerza de arrastre de Dean. Al incrementar  $Q_{Total}$  aumenta la fuerza centrífuga induciendo la aparición del vórtice de Dean, el cual recoloca la posición de equilibrio de las células hacia la pared interna del microcanal logrando la separación (25 y 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Sin embargo, si  $Q_{Total}$  se aumenta aún más las fuerzas de Dean comienzan a dominar, lo que resulta en el desenfoco de las células sanguíneas hacia la parte central del microcanal, este comportamiento puede apreciarse ligeramente a un caudal de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .<sup>25,101,108</sup> Se decidió evaluar como zona de separación valores de RCE = 10, 8, 6 y 4 y  $Q_{Total}$  = 25, 50 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



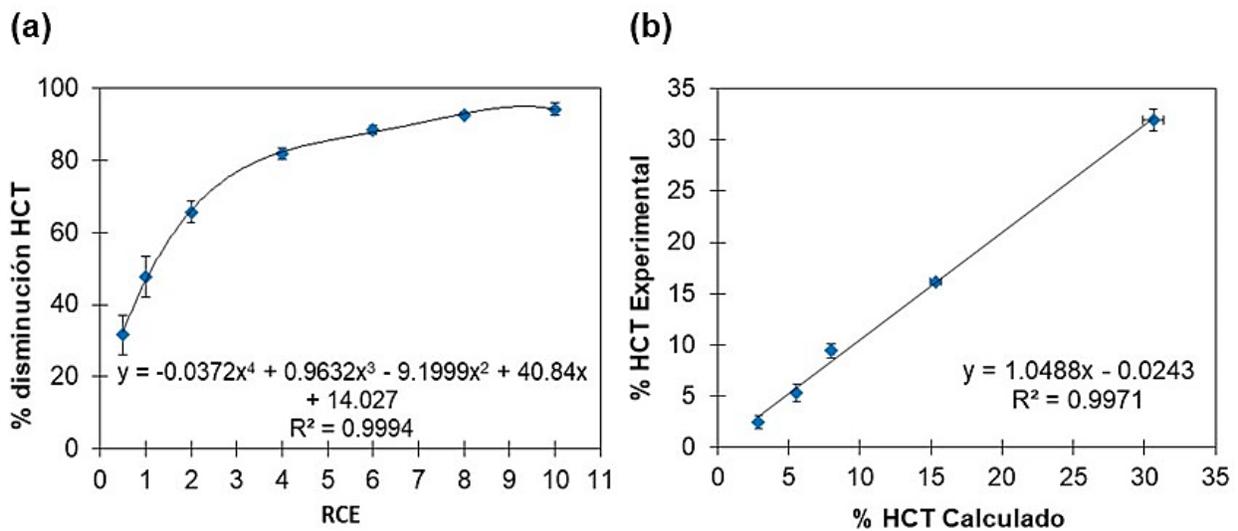
**Figura 3-9.** Imágenes de la separación de plasma sanguíneo en función del valor de RCE y caudal total ( $Q_{Total}$ ). La línea punteada selecciona la zona de separación.

### 3.5.4 Variación del % HCT en función de los valores de RCE (dilución en línea)

Este estudio se realizó con el propósito de conocer el % HCT de la muestra de sangre al realizar la dilución en línea antes de la separación de plasma. Se emplearon tres muestras de sangre con diferente valor de % HCT inicial para considerar todas las posibles variaciones en los resultados y así, proponer un modelo matemático (con el promedio de las tres muestras) que fuera aplicable a diferentes muestras de sangre.

La relación que existe entre el % disminución de HCT en función de RCE se muestra en la Figura 3-10(a). Los porcentajes obtenidos fueron muy cercanos a los valores esperados

considerando que el factor de dilución está dado por el valor de RCE. Por ejemplo, para  $RCE = 4$  la solución de PBS ingresó al microdispositivo con un caudal de  $40 \mu\text{L}/\text{min}$ , mientras que la muestra de sangre total a  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ , lo que corresponde a una relación 4 a 1 con un volumen total de 5. Esto implica una fracción 4/5 de diluyente (SAF) correspondiente al 80 % de la solución de sangre diluida, por lo que se espera que el % de HCT disminuya alrededor del 80 %. Mientras que para  $RCE = 2$ , la fracción de SAF en la solución de sangre diluida es de 2/3, lo que corresponde a una disminución de % HCT de aproximadamente el 66%. Si se aplica el mismo razonamiento al resto de valores de RCE, se puede explicar el comportamiento del gráfico.



**Figura 3-10.** Estudio del cambio en el valor de % HCT al realizar la dilución en línea de la muestra de sangre. (a) % de disminución HCT en función del valor de RCE ( $n = 3$ ). (b) Comparación entre los valores de % HCT experimental y calculado empleando el modelo matemático de cuarto grado y la Ecuación 3-4 ( $n = 3$ ).

Dichos valores se ajustaron a un modelo de cuarto grado ( $R^2 = 0.9994$ ) con el que fue posible calcular el % HCT que pierden las muestras de sangre diluidas en el microdispositivo. Posteriormente, empleando la Ecuación 3-4, se determinó el % HCT calculado después del proceso de dilución, sustituyendo el % HCT inicial (muestra de sangre sin diluir) y el % de disminución de HCT previamente calculado. Por ejemplo, para un valor de RCE de 6, el % disminución de HCT es 87.71 %. Así, para una muestra de sangre con un % HCT inicial de  $45.23 \pm 1.11$  el % HCT calculado es  $5.56 \pm 0.14$ , mientras que el % HCT experimental (determinados por triplicado con tubos capilares y centrífuga) fue  $5.35 \pm 0.84$ . En la Figura 3-10(b) se comparan los valores de % HCT experimentales y calculados

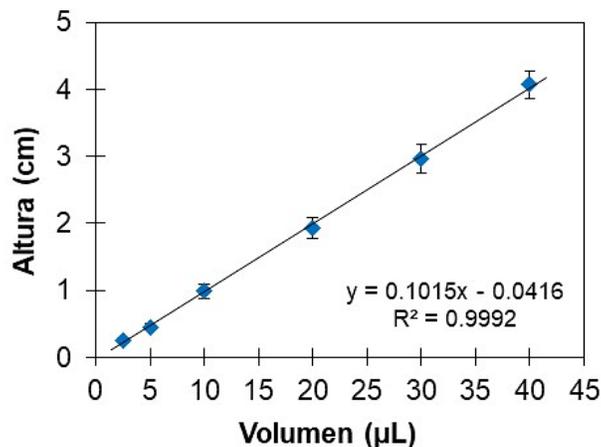
para cinco valores de RCE. El modelo propuesto muestra una excelente predictibilidad al observarse una relación lineal entre ambos parámetros.

$$\% \text{ HCT calculado} = \frac{(100 - \% \text{ disminución HCT})(\% \text{ HCT inicial})}{100} \quad \text{Ecuación 3-4}$$

La zona de separación de plasma se realiza con valores de RCE entre 4 y 10, lo que implica una disminución de HCT entre 82.31 y 93.64 % de la cantidad de % HCT inicial. Así, considerando una muestra con 45 % de HCT inicial, los valores de HCT que se obtienen al realizar la dilución dentro de microdispositivo estarían aproximadamente entre el 3 y 8 %.

### 3.5.5 Medición del caudal de salida y concentración del plasma separado.

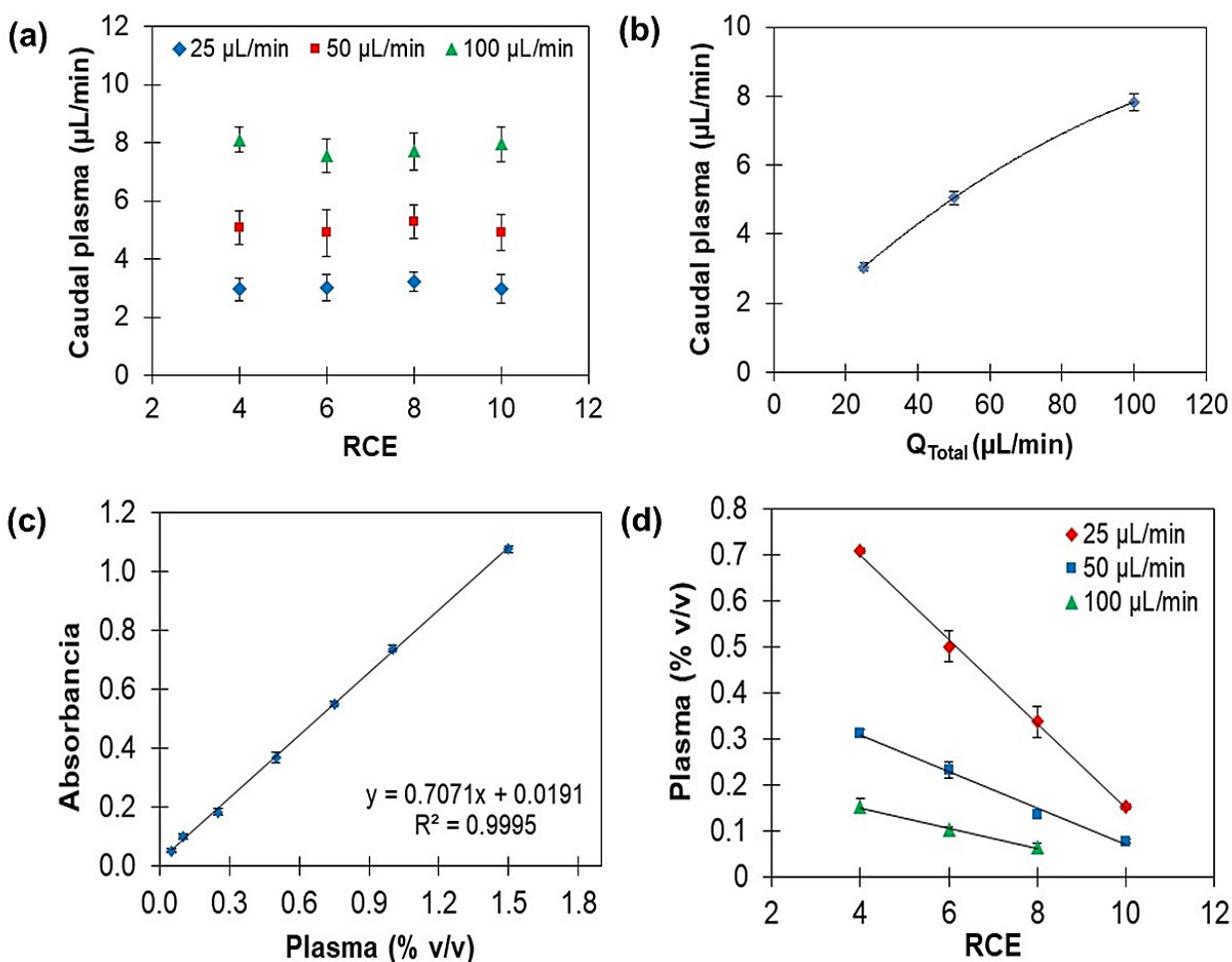
La gráfica que relaciona la altura medida en un tubo capilar en función del volumen recolectado de SAF se ajustó a una función lineal (Figura 3-11), la cual se empleó para calcular el caudal de salida de plasma a diferentes valores de RCE y  $Q_{\text{Total}}$ .



**Figura 3-11.** Relación entre la altura alcanzada dentro de un tubo capilar al colocar diferentes volúmenes de SAF para el cálculo del caudal de salida de plasma (n = 3).

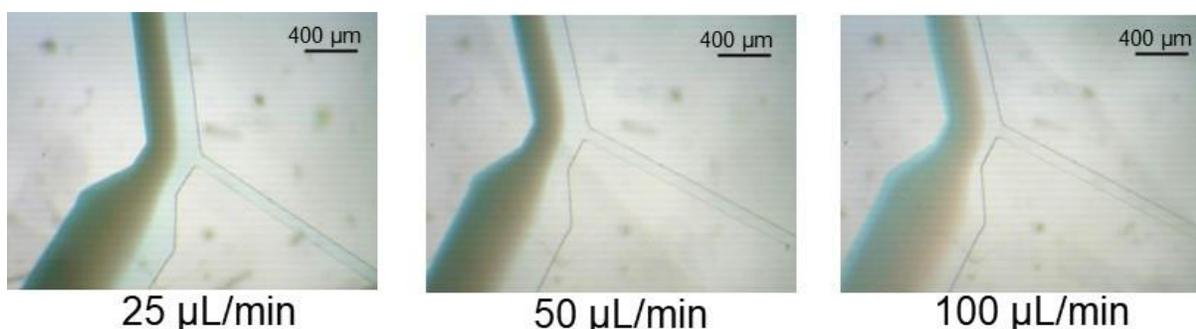
Como se observa en la Figura 3-12(a), el caudal de salida de plasma depende únicamente del caudal total ( $Q_{\text{Total}}$ ), es decir, el caudal de salida de plasma aumenta si  $Q_{\text{Total}}$  aumenta, independientemente del valor de RCE. Así, para un caudal total de 25, 50 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  el caudal de salida de plasma fue  $3.05 \pm 0.12 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $5.05 \pm 0.18 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $7.82 \pm 0.24 \mu\text{L}/\text{min}$ , respectivamente (Figura 3-12(b)).

La Figura 3-12(c) muestra la absorbancia registrada en función de la concentración porcentual de plasma, el gráfico se ajusta a una línea recta ( $R^2 = 0.9995$ ) con un intervalo lineal de 0.05 a 1.5 % (v/v). Con dicho gráfico se calcularon las concentraciones porcentuales de plasma de las muestras separadas en el microdispositivo bajo cada condición experimental las cuales se localiza en la Figura 3-12(d). La concentración de plasma máxima ( $0.71 \pm 0.01$  % (v/v)) se obtuvo al emplear un caudal total y RCE menor ( $Q_{\text{Total}} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $\text{RCE} = 4$ ).



**Figura 3-12.** Determinación del caudal de salida y concentración de plasma separado. (a) Comparación del caudal de salida de plasma en función de RCE para  $Q_{\text{Total}} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $n = 3$ ). (b) Modificación del caudal de salida de plasma en función  $Q_{\text{Total}}$ . (c) Curva de calibración para la cuantificación de la concentración de plasma separado (% v/v), absorbancia medida a  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $n = 3$ ). (d) Comparación de la concentración de plasma (% v/v) en función del valor de RCE a diferentes valores de  $Q_{\text{Total}}$  ( $n = 2$ ).

Para estudiar cualitativamente la distribución del plasma al realizar la dilución con SAF, se agregaron gotas de colorante azul a una muestra de sangre total antes de ser introducida al microdispositivo, posteriormente se observó al microscopio la zona de separación empleando  $Q_{\text{Total}} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  con un valor de  $\text{RCE} = 10$ . Los resultados muestran una mayor presencia de colorante en el microcanal de separación de plasma (equivalente a una mayor concentración) mientras menor sea el caudal total ( $Q_{\text{Total}} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$ ), lo que coincide con los resultados cuantitativos (Figura 3-13). Esto puede deberse a que, a un caudal mayor, la sangre y el diluyente tienen un menor tiempo de mezclado por difusión, lo que se traduce en poca presencia de colorante en el plasma separado.



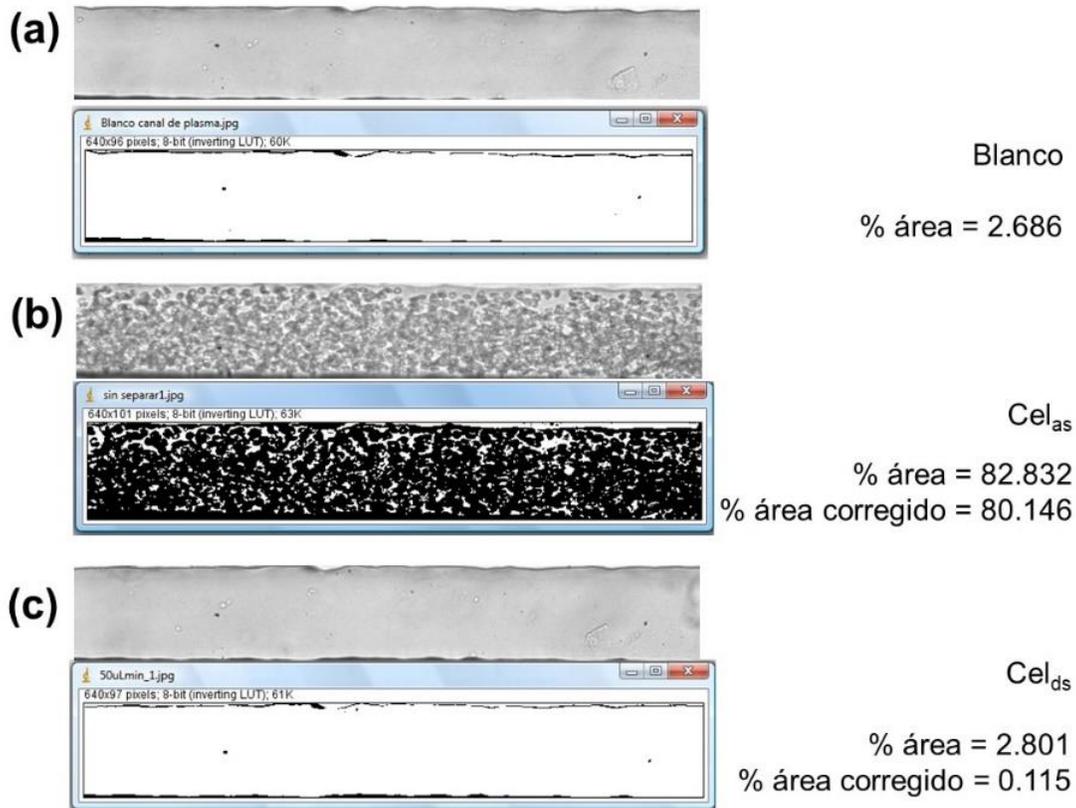
**Figura 3-13.** Estudio cualitativo de la dilución y separación de plasma sanguíneo en el microdispositivo con SAF bajo diferentes valores de  $Q_{\text{Total}} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  manteniendo fijo  $\text{RCE} = 10$ . La mayor intensidad colorante azul presente en el microcanal de separación de plasma corresponde a una mayor concentración (% v/v).

Los resultados demostraron que el emplear un caudal total de  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  implica un mayor caudal de salida de plasma ( $7.82 \pm 0.24 \mu\text{L}/\text{min}$ ) pero con bajas concentraciones (alrededor de  $0.1 \% (v/v)$ ). Mientras que a un caudal total de  $25 \mu\text{L}/\text{min}$ , el caudal de salida de plasma es menor ( $3.05 \pm 0.12 \mu\text{L}/\text{min}$ ) pero la concentración es mayor con un máximo en  $0.7 \% (v/v)$ . La medición del caudal de salida y la concentración de plasma una vez diluido y separado es importante para el acoplamiento en línea con algún método de cuantificación de biomarcadores presentes en éste. La selección de las condiciones de separación dependerá del propósito de estudio.

### 3.5.6 Evaluación del funcionamiento del microdispositivo

La pureza de separación ( $\alpha$ ) relaciona el número de células sanguíneas presentes en el plasma antes y después de la separación. Este análisis se realizó por medio del programa *ImageJ* calculando el % área que ocupan las células sanguíneas dentro del microcanal de

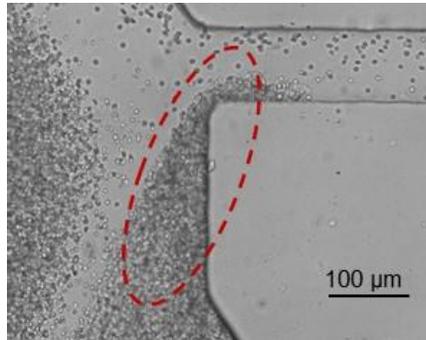
separación de plasma. La Figura 3-14 muestra un ejemplo del análisis de imágenes realizado.



**Figura 3-14.** Ejemplo del análisis de imágenes realizado por medio del programa *ImageJ* para el cálculo de pureza de separación ( $\alpha$ ),  $Q_{Total} = 50 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $RCE = 10$ . (a) Fotografía del microcanal de plasma lleno de SAF (Blanco), (b) % área antes de la separación de plasma ( $Cel_{as}$ ) y (c) % área después de la separación de plasma ( $Cel_{ds}$ ).

De acuerdo con la Ecuación 3-2, el cociente entre  $Cel_{ds}$  y  $Cel_{as}$  determina el porcentaje de células sanguíneas que no fueron separadas y se encuentran presentes en el plasma; al restar ese cociente a la unidad y multiplicar por 100, es posible determinar el porcentaje células sanguíneas que fueron separadas. Este porcentaje está relacionado con la pureza de la separación, así, cuanto más cercano sea el valor de  $\alpha$  a 100 % el plasma separado será más puro. Bajo las condiciones experimentales estudiadas ( $Q_{Total} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $RCE = 10, 8, 6$  y  $4$ ) la pureza de separación alcanza valores del 100 %, lo cual implica que el plasma separado se encuentra libre de células sanguíneas. Sin embargo, cuando se emplearon muestras de sangre con al menos siete días de almacenamiento, se observó la presencia de aglomerados celulares. La aglomeración es un fenómeno fisiológico que se presenta en muestras de sangre normal en condiciones de bajo flujo o

estasis debido a la tendencia de los eritrocitos a agruparse, este fenómeno aumenta en función del tiempo de almacenamiento.<sup>163</sup> La presencia de aglomerados afecta aleatoriamente la pureza de separación, abarcando valores de  $\alpha$  desde 58 hasta 94 % (Tabla 3-3), dependiendo del tamaño del aglomerado formado y si éste se adhiere o no a la pared del microcanal (Figura 3-15), lo que modifican el comportamiento del resto de las células provocando que pierdan su posición de equilibrio en la pared interna del microcanal.



**Figura 3-15.** Formación de aglomerados celulares en la zona de separación de plasma al emplear una muestra de sangre total con siete días de almacenamiento.  $Q_{\text{Total}} = 50 \mu\text{L}/\text{min}$  and  $\text{RCE} = 6$  (objetivo 4x). El óvalo punteado muestra el área de adhesión del aglomerado formado en la zona de intersección.

**Tabla 3-3.** Pureza de separación ( $\alpha$ ) calculada con la formación de aglomerados celulares al emplear una muestra de sangre con siete días de almacenamiento ( $n = 10$ ).

RCE	$Q_{\text{Total}} (\mu\text{L}/\text{min})$		
	25	50	100
10	$68.97 \pm 4.92$	$94.50 \pm 2.02$	$94.05 \pm 1.79$
8	$73.52 \pm 3.01$	$92.86 \pm 5.49$	$83.78 \pm 5.74$
6	$83.28 \pm 7.14$	$72.46 \pm 2.82$	$82.55 \pm 2.13$
4	$58.74 \pm 3.22$	$73.03 \pm 2.57$	$64.63 \pm 1.47$

La eficiencia de separación ( $\beta$ ) hace referencia a la cantidad de plasma separado en el microdispositivo considerando el volumen total de plasma disponible en un intervalo de un minuto. Los porcentajes obtenidos mostraron una eficiencia entre el 8 y 13 %, siendo esta mayor cuando  $Q_{\text{Total}} = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ . En la Tabla 3-4 se comparan los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  calculados para la separación de plasma. Es importante notar que algunos de los valores de  $\alpha$  pueden exceder levemente el 100 % debido al error asociado al método de análisis de imágenes. Como se observa, el dispositivo desarrollado no sólo da la oportunidad de realizar la dilución de la muestra de sangre y la separación de plasma en línea, sino también ofrece una alta pureza del plasma separado, y, pese a que la eficiencia de separación es relativamente baja, se considera adecuada

para el acoplamiento en línea con métodos de detección y cuantificación de biomarcadores, ya que los volúmenes requeridos para este tipo de análisis son muy bajos.

**Tabla 3-4.** Parámetros estudiados para la evaluación del funcionamiento del microdispositivo.  $Q_{Total} = 25, 50$  y  $100 \mu\text{L}/\text{min}$ , RCE = 4, 6, 8 y 10. Pureza de separación ( $\alpha$ ) y eficiencia de separación ( $\beta$ ) ( $n = 10$ ).

RCE	Pureza de separación ( $\alpha$ )			Eficiencia de separación ( $\beta$ )		
	$Q_{Total} (\mu\text{L}/\text{min})$					
	25	50	100	25	50	100
<b>10</b>	99.86 ± 0.31	100.09 ± 0.16	99.99 ± 0.25	8.19 ± 0.61	10.11 ± 0.52	12.23 ± 0.64
<b>8</b>	99.94 ± 0.39	100.54 ± 0.78	100.31 ± 0.33	7.96 ± 0.67	10.94 ± 0.34	13.32 ± 0.61
<b>6</b>	99.98 ± 0.38	99.96 ± 0.16	100.09 ± 0.23	7.99 ± 0.61	10.36 ± 0.49	12.79 ± 0.83
<b>4</b>	100.07 ± 0.22	99.85 ± 0.20	99.24 ± 0.24	8.79 ± 0.48	11.07 ± 0.42	12.91 ± 0.63

### 3.5.7 Comparación con otros trabajos reportados

En la Tabla 3-5 se resumen algunos de los trabajos reportados para la separación de plasma en microdispositivos y se comparan con el método desarrollado en esta investigación.

**Tabla 3-5.** Características de trabajos reportados para la separación de plasma sanguíneo empleando dispositivos de microfluídica.

Principio de separación	Caudal ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	HCT (%)	Pureza de separación (%)	Eficiencia de separación (%)	Referencia
Ley de bifurcación en dimensiones elevadas en canales en T	150	2 45	99 42	1.81	164
Efecto centrífugo y ley de la bifurcación	60 – 1200	5 45	90 58	5 – 10	165
Combinación de constricción-expansión y ley de la bifurcación	33	45	99	5	166
Combinación de efectos biofísicos y geométricos	400	15 45	100 80	3	167
Ley de la bifurcación, dispositivo con filtración en T	1.67	45 (sangre de oveja)	100	15 - 25	24
Efecto centrífugo y Ley de la bifurcación	25 – 100	3 – 8 (dilución <i>in situ</i> )	100	8 -13	Este trabajo

En general todos muestran una alta pureza de separación al trabajar con muestras de sangre más diluidas, con una eficiencia de separación similar. Sin embargo, es importante destacar que el presente trabajo es el único que ofrece la dilución y separación de plasma sanguíneo dentro del mismo microdispositivo. Esta característica es su mayor distintivo y ventaja frente a otros dispositivos desarrollados, ya que ningún otro trabajo había reportado hasta ahora el estudio de una dilución en línea con PBS, así como la evaluación de los parámetros involucrados. Además, al realizar una dilución *in-situ* la interacción usuario-microdispositivo se ve disminuida, facilitando su manipulación e implementación. Otra característica que los autores de otros trabajos no mencionan, es que, cuando se realiza la dilución de una muestra de sangre fuera del microdispositivo y se coloca en una jeringa para su ingreso, ésta tiende a irse separando en células sanguíneas y plasma en función del tiempo por efecto de la gravedad. Cuanto más diluida se encuentre la muestra de sangre, más rápida será su separación dentro de la misma jeringa, lo que puede provocar errores al momento de realizar la separación de plasma, ya que en este caso la muestra diluida no ingresa en una misma proporción. En cambio, si la muestra de sangre se coloca entera dentro de la jeringa, como es el caso del presente trabajo, no se ve afectada al momento de ingresar al microdispositivo, teniendo una dilución y separación de plasma homogénea.

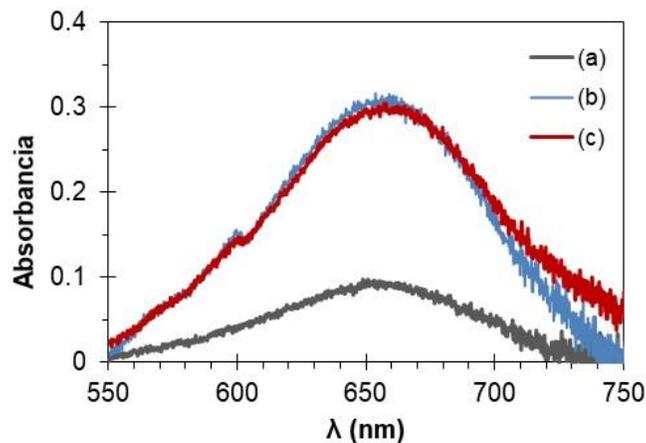
También es importante mencionar que los microdispositivos que utilizan un solo principio de separación suelen presentar algunas desventajas en comparación con aquellos que utilizan una combinación de efectos. Por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 3-5, Yang *et al.*<sup>24</sup> reportó un microdispositivo para separar plasma empleando únicamente la ley de la bifurcación, los resultados muestran una pureza de separación del 100 % cuando se trabaja con una muestra de sangre de oveja con 45 % de HCT con una eficiencia de separación entre el 15 y 25 %, sin embargo, el caudal empleado es muy bajo (1.67  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), lo que podría hacerlo impráctico debido al aumento en el tiempo de separación de plasma de un volumen determinado de muestra de sangre. Tripathi *et al.*,<sup>164</sup> empleando el mismo principio de la ley de la bifurcación, aumentó el caudal hasta 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  disminuyendo el tiempo de separación de plasma, pero comprometiendo la pureza y eficiencia de separación cuando se trabaja con 45 % HCT, teniendo que diluir la muestra hasta 2 % HCT. Por su parte, cuando se emplea una combinación de efectos, como es el caso del microdispositivo desarrollado en este trabajo, se observa en general una mayor pureza y eficiencia de separación aun cuando se emplean caudales mayores; en este sentido, se observa que el microdispositivo propuesto tiene la ventaja de trabajar en un intervalo de caudales entre 25 y 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , en comparación con los trabajos reportados por Kersaudy-Kherhoas *et al.*<sup>166</sup> y Prahakar *et al.*<sup>167</sup> que manejan un sólo caudal de trabajo. Además, si se compara específicamente con el trabajo publicado por Blattert *et al.*,<sup>165</sup> que emplea la misma

combinación de efecto centrífugo y ley de la bifurcación, el microdispositivo desarrollado tiene mayor pureza y eficiencia de separación al trabajar con muestras de sangre diluidas.

Debido a los argumentos anteriores, el microdispositivo propuesto en este trabajo posee un alto potencial para ser empleado en la separación de plasma y ser acoplado con la detección y cuantificación de diferentes biomarcadores debido a su versatilidad en las condiciones de separación, excelente pureza y buena eficiencia de separación.

### 3.5.8 Evaluación de la calidad del plasma diluido y separado en línea

La cuantificación de anti-CCP, un biomarcador con alta especificidad para el diagnóstico de AR fue útil para corroborar la calidad del plasma diluido y separado empleando el microdispositivo. Un ejemplo de las señales de absorbancia obtenidas al realizar el inmuno ensayo en microdispositivo para el blanco (SAF) y ambas muestras de plasma se muestra en la Figura 3-16. Los resultados de concentración de anti-CCP tanto para la muestra de plasma diluida y separada en el microdispositivo como para la muestra de plasma separada por centrifugación y diluida a una concentración 0.7 % v/v fueron similares:  $1041.27 \pm 117.45$  U/mL y  $1080.95 \pm 71.43$  U/mL, respectivamente. Lo anterior demuestra que el plasma obtenido empleando el microdispositivo efectivamente tiene una concentración cercana al 0.7 % v/v ( $Q_{\text{Total}} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $\text{RCE} = 4$ ) y que puede emplearse para la medición de biomarcadores sin presentar ningún tipo de interferencia.



**Figura 3-16.** Ejemplo de las señales de absorbancia para la cuantificación de anti-CCP al emplear el inmunoensayo en microdispositivo. (a) blanco, (b) plasma separado por centrifugación y diluido con SAF a 0.7 % v/v, y (c) plasma diluido y separado en línea empleando el microdispositivo  $Q_{\text{total}} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$  y  $\text{RCE} = 4$ .  $\lambda^{\text{máx}} = 650$  nm.

### 3.6 CONCLUSIONES

El microdispositivo desarrollado en esta investigación mostró excelentes resultados para la separación de plasma sanguíneo con la gran ventaja de acoplar la dilución en línea de la muestra de sangre total con SAF, tal procedimiento no ha sido explorado en ningún otro trabajo hasta el momento, implicando menor manipulación por parte del usuario.

La pureza de separación ( $\alpha$ ) fue alrededor del 100 %, asegurando así que el plasma separado no contenía células sanguíneas, y la eficiencia de separación ( $\beta$ ) tuvo recuperaciones entre el 8 y el 13 % del plasma total circulante dentro del microcanal. Estos porcentajes fueron consistentes con trabajos previos que no realizaron dilución dentro del mismo microdispositivo. La calidad del plasma diluido y separado de una muestra de sangre de un paciente con diagnóstico de AR se corroboró mediante la cuantificación de anti-CCP empleando un inmunoensayo de microdispositivo. El microdispositivo desarrollado mostró una fácil manipulación y un alto potencial para ser acoplado con la detección y cuantificación en línea de diferentes biomarcadores debido a su gran versatilidad en las condiciones de separación.

## \* CAPÍTULO IV \*

### **Detección rápida, sensible y selectiva de H5-Hemaglutitina del virus de la influenza aviar empleando un dispositivo de inmuno-pared**

#### **4.1 RESUMEN**

La influenza aviar, causada por el virus de la influenza tipo A, es una enfermedad respiratoria aguda infecciosa de las aves relacionada con los brotes de influenza en todo el mundo. El subtipo del virus de la influenza aviar (VIA) altamente patógeno H5N1 ha cruzado las barreras de las especies para infectar a mamíferos, incluidos los humanos, con resultados fatales, recibiendo especial atención como una posible futura amenaza pandémica. La detección rápida y oportuna en aves de corral es de vital importancia para prevenir la propagación del virus. A pesar de su gran sensibilidad, los métodos de detección convencionales, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) y la prueba de precipitación en gel de agar, requieren mucho tiempo, manipulación y capacitación especial en el área. En este trabajo, se evaluó un dispositivo de pared inmunológica (inmuno-pared) como una forma más fácil y rápida para la detección y cuantificación de H5-hemaglutinina del virus de la influenza aviar (VIA H5-HA). Se emplearon dos tipos de anticuerpos para la detección: un anticuerpo marcado con fluorescencia y otro con una enzima realizando un inmunoensayo tipo sándwich. Se demostró que ambos representan una forma más fácil y rápida de detección en comparación con el kit de ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) convencional. Además, se logró una alta selectividad para la detección de VIA H5-HA después de la evaluación de otros subtipos de virus HA. El límite de detección fue de 0.23 ng/mL para el anticuerpo marcado con enzima. Este valor fue equivalente al del kit ELISA convencional, pero ocho veces más rápido (31 min contra 260 min). El rango de detección fue de 0.23 a 100 ng/mL. El dispositivo de inmuno-pared con anticuerpo marcado con enzima ofrece la oportunidad de realizar un inmunoensayo de manera rápida, sensible, selectiva y simple para la futura detección de muestras reales.

## 4.2 INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda contagiosa causada por diferentes virus de la influenza (A, B y C). El virus de la influenza tipo A es capaz de infectar una amplia variedad de especies de aves y mamíferos, y es el único asociado con las pandemias de influenza ocurridas, lo que lo convierte en el tipo más importante y potencialmente peligroso para la salud pública en todo el mundo.<sup>168</sup> Según las combinaciones de diferentes glicoproteínas en la superficie del virus, conocidas como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el virus de la influenza A se divide en subtipos; hasta el momento se han identificado 16 HA (H1-H16) y 9 NA (N1-N9).<sup>169</sup>

La influenza aviar es una enfermedad infecciosa de las aves causada por el virus de la influenza tipo A. Se sabe que las aves acuáticas silvestres, las gaviotas y las aves playeras son reservorios naturales de este virus permaneciendo perfectamente sanas, sin embargo, otras especies de aves, como las aves de corral, también son susceptibles de infectarse con una amplia gama de síntomas: desde una enfermedad leve hasta una enfermedad altamente contagiosa y mortal.<sup>170</sup> Según su virulencia, los virus de la influenza aviar (VIA) se clasifican en dos grupos: de baja incidencia patógena y altamente patógena. Cuando dos subtipos de virus de influenza tipo A diferentes infectan una misma célula, algunos de sus segmentos de genes son intercambiados fácilmente,<sup>171</sup> por lo tanto, los virus categorizados como altamente patógenos pueden comenzar a evolucionar rápidamente mutando a una versión mucho más letal, con una mortalidad cercana al 100%.<sup>170</sup> Hasta la fecha, las formas altamente patógenas se han limitado a los subtipos H5 y H7; en particular, el virus de influenza H5N1 ha mostrado una rápida mutación infectando otras especies animales. En 2015, se notificaron 907 casos humanos infectados por influenza H5N1 con una tasa de mortalidad del 53 % en 16 países.<sup>172</sup> La creciente incidencia de influenza H5N1 en aves aumenta las posibilidades de una posible infección a humanos y, posteriormente, el riesgo de transmisión de persona a persona, por lo que, una rápida y oportuna detección es de vital importancia para detectar brotes de virus antes de que tenga la oportunidad de mutar a su forma altamente patógena.<sup>173</sup>

La forma de detección del VIA empleada en los laboratorios se basa en las pruebas “estándar de oro” como el cultivo viral y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR).<sup>174</sup> A pesar de su gran sensibilidad, estos métodos requieren mucho tiempo y trabajo, en algunas ocasiones necesitan una semana o más para completarse, así como instalaciones adecuadas y analistas especialmente capacitados.<sup>175</sup> Otros métodos populares son los inmunoensayos, como el ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA),<sup>176</sup> sin embargo presentan la desventaja de requerir periodos largos de análisis.

Actualmente, se cree que los sistemas de detección por medio de microdispositivos desechables *in situ* son la mejor opción para prevenir la propagación de infecciones. Éstos ofrecen las ventajas de no requerir el transporte de muestras evitando la exposición al virus y la posterior descontaminación del equipo,<sup>177</sup> sin embargo, pocos son los trabajos que han reportado la detección de diferentes virus de la influenza altamente patógenos en microdispositivos, por ejemplo, Kubicki *et al.* desarrolló un microchip para la detección rápida de marcadores genéticos de cepas de influenza aviar A (H7N7) de baja y alta patogenicidad en muestras heterogéneas utilizando un método ultrasensible de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) combinado con electroforesis capilar (CE) logrando disminuir el tiempo de análisis de 2 h a 6 min.<sup>178</sup> En cuanto a la aplicación de inmunoensayos en microdispositivos, Yu *et al.* reportó el desarrollo de un dispositivo de microfluídica integrado con nanobarras de óxido de zinc para la detección sensible y específica de VIA H5N2, aprovechando la morfología 3D que ofrecen las nanoestructuras para aumentar el área de superficie en la captura de anticuerpos, además de mejorar la detección fluorescente disminuyendo el límite de detección y mejorando la sensibilidad en comparación con un ELISA convencional bajo las mismas condiciones,<sup>179</sup> sin embargo, éste último presenta la desventaja de requerir un tiempo largo para lograr la funcionalización de la superficie de las nanobarras con el anticuerpo de captura, tomando alrededor de 15 h. El grupo de investigación de Tokeshi *et al.* ha demostrado la viabilidad del uso de una estructura 3D polimérica construida dentro de un microcanal (inmuno-pared) para la realización de inmunoensayos. Este microdispositivo proporciona una detección rápida, fácil y altamente sensible de biomarcadores de enfermedades; en él, un anticuerpo de captura biotinilado se inmoviliza en la superficie de la estructura de la pared a través de la interacción biotina-estreptavidina. La introducción del analito y los anticuerpos secundarios y marcados producen un complejo tipo sándwich anclado en ambos lados de la pared.<sup>17,78,79,139</sup> Los dispositivos de inmuno-pared tienen la ventaja de requerir poco más de 1 h para su construcción y retención del anticuerpo de captura, y pueden almacenarse por un periodo de tiempo de al menos 90 días en refrigeración a 4 °C. Además, para mejorar la sensibilidad de la inmuno-pared, Nishiyama *et al.* reportó la amplificación de la señal analítica mediante una reacción enzimática con un sustrato fluorogénico.<sup>17</sup>

En este capítulo, se realizó la detección fluorescente y la cuantificación de H5-hemaglutinina del VIA utilizando un dispositivo de inmuno-pared. Comparando entre dos anticuerpos marcados, uno con fluorescencia y otro con una enzima con el fin de lograr una detección altamente sensible. El rendimiento se contrastó con el de un kit ELISA convencional, además de evaluar la selectividad frente a diferentes proteínas HA: H1, H3, H5 y H7.

### 4.3 OBJETIVO GENERAL

Construir un microdispositivo de inmuno-pared para la detección fluorescente y cuantificación de H5-hemaglutinina del virus de la influenza aviar por medio de un inmunoensayo tipo sándwich.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir la inmuno-pared dentro del microdispositivo empleando un fotopolímero soluble en agua y estreptavidina para inmovilizar un anticuerpo de captura biotilado.
- Realizar la detección fluorescente con dos anticuerpos, uno marcado con fluorescencia y otro con una enzima para comparar la sensibilidad.
- Construir la curva de calibración con ambos anticuerpos de detección y determinar los límites de detección.
- Estudiar la influencia del tiempo de reacción enzimática en la sensibilidad de la detección al emplear el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina.
- Estudiar la selectividad del microdispositivo de inmuno-pared desarrollado por medio de la detección de diferentes tipos de hemaglutinina: H1, H3, H5 y H7.
- Comparar los resultados experimentales con las características reportadas por un kit ELISA convencional.

### 4.4 METODOLOGÍA

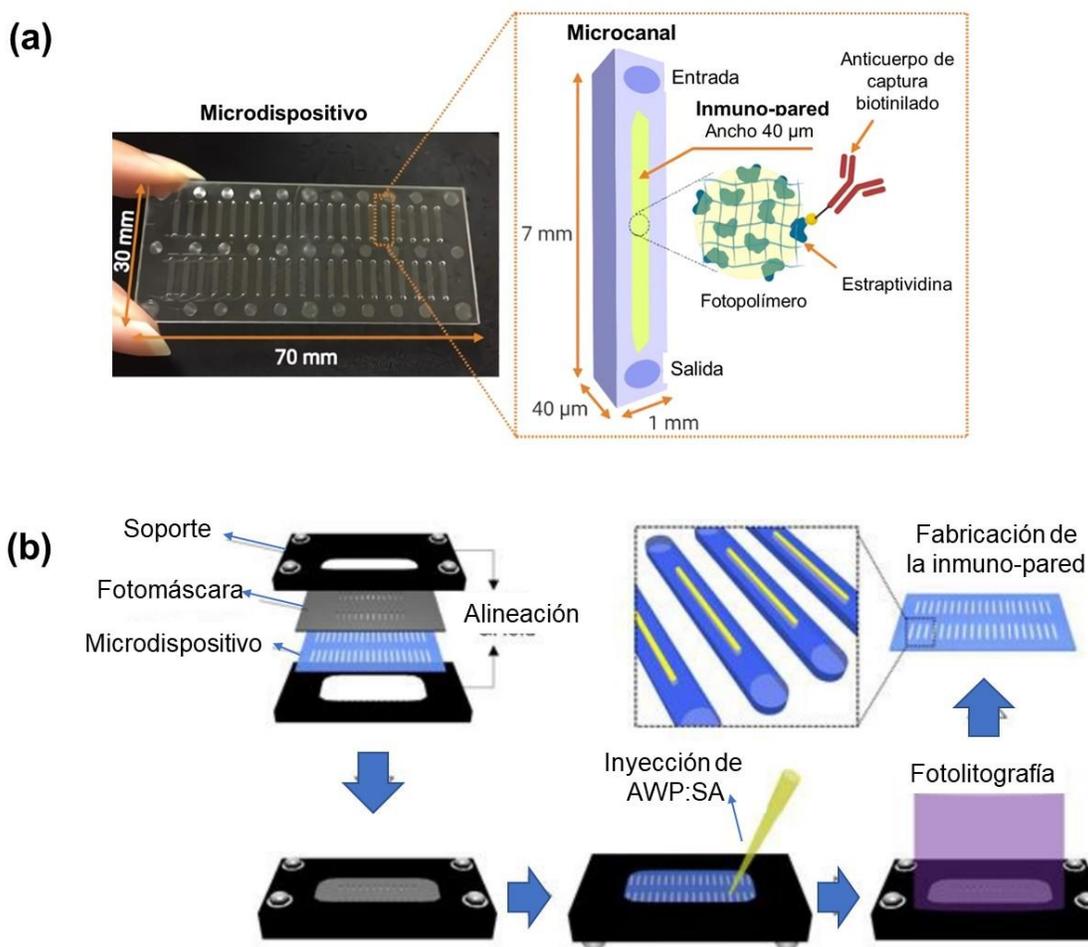
#### 4.4.1 Reactivos

El fotopolímero soluble en agua (BIOSURFINE-AWP, 6 %) se adquirió de Toyo Gosei Co., Ltd. La estreptavidina se adquirió de ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. La albúmina de suero bovino (BSA), la leche desnatada en polvo, el ácido clorhídrico y el cloruro de magnesio hexahidratado se adquirieron de FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp. La base Trizma® y Tween 20 se adquirieron de Sigma-Aldrich. La solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.01 mol/L pH 7.4 y sal diamónica 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7-il) fosfato (fosfato DDAO) se adquirieron de Thermo Fisher Scientific, Inc. 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7-il) (DDAO) se adquirió de Cosmo Bio Corp. El anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina H5N1 de ratón, la hemaglutinina recombinante H5N1 (A/Anhui/1/2005), H1N1 (A/PuertoRico/8/34), H3N2 (A/Aichi/2/19968), H7N9 (A/Shangai/1/2013) y el anticuerpo policlonal de hemaglutinina anti-influenza aviar A de conejo se adquirieron de Sino Biological Inc. El anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo marcado con DyLight 650 y el anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo marcado con fosfatasa

alcalina se adquirieron de Abcam. El kit de marcaje con una biotina reactiva a aminas se adquirió en Dojindo Molecular Technologies, Inc.

#### 4.4.2 Fabricación del dispositivo de inmuno-pared

La Figura 4-1(a) muestra una fotografía del microdispositivo empleado y la representación esquemática del dispositivo de inmuno-pared. El microdispositivo cuenta con un total de 40 microcanales y fue fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd. (Tokio, Japón) a partir de un copolímero de olefina cíclica (COC). La inmuno-pared se construyó dentro del microcanal con un ancho de 40  $\mu\text{m}$  utilizando una mezcla de fotorpolímero soluble en agua (AWP) y estreptavidina (SA) por la técnica de fotolitografía. La relación de volúmenes para AWP:SA fue de 5:5 para el ensayo con anticuerpo marcado con DyLight 650 y 7:3 para el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina; en ambos, la concentración final de SA en la inmuno-pared fue de 5 mg/mL.



**Figura 4-1.** (a) Fotografía del microdispositivo y representación esquemática de la inmuno-pared. (b) Ilustración del proceso de fabricación de la inmuno-pared por fotolitografía empleando una mezcla de fotorpolímero soluble en agua (AWP) y estreptavidina (SA). La relación de volúmenes para AWP:SA fue de 5:5 para el ensayo con anticuerpo marcado con DyLight 650 y 7:3 para el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina.

El proceso de fabricación de la inmuno-pared se describe a continuación. Primero, el microdispositivo y la fotomáscara se alinearon dentro de un soporte. Después, el microcanal se llenó con la mezcla de AWP y SA (0.25  $\mu\text{L}$ ) utilizando una micropipeta (PIPETMAN, Gilson S.A.S.). Posteriormente, se irradió luz UV (365 nm, 20 mW) con una lámpara de mercurio (LA-410UV, Hayashi Watch Works) durante 8 s. Finalmente, la mezcla sin curar se eliminó mediante una bomba de vacío (SP 20, Air Liquide Medical Systems) conectada con una manguera a una punta de micropipeta, y la pared inmunológica se lavó diez veces con la solución de lavado (SAF que contenía 0.5 % de Tween-20 y 0.5% de BSA) para eliminar el fotopolímero remanente y revelar la estructura resultante (inmuno-pared). El esquema de la construcción de la inmuno-pared se muestra en la Figura 4-1(b).

#### **4.4.3 Establecimiento de las condiciones para la construcción de la inmuno-pared**

Se realizó una serie de experimentos con la finalidad de mejorar la variación de las señales analíticas al emplear al anticuerpo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, partiendo de las condiciones de construcción de la inmuno-pared previamente reportadas por Keine *et al.*<sup>17</sup>

##### **4.4.3.1 Estudio de la intensidad fluorescente en función del tiempo**

Para estudiar cómo influye la formación del producto fluorescente obtenido durante la reacción enzimática en el aumento de la señal analítica. Se construyeron microdispositivos con un ancho de inmuno-pared de 20 y 40  $\mu\text{m}$  empleando una mezcla de AWP:SAF con una relación 5:5 (en este caso no fue necesario adicionar SA ya que no se realizó el inmunoensayo). Los microdispositivos se colocaron sobre la platina del microscopio y se inyectó al microcanal una solución del producto de reacción fluorescente (DDAO) de concentración 0.25  $\mu\text{M}$  en una solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ). Se registró la intensidad fluorescente en función del tiempo desde el tiempo cero (antes de la inyección de DDAO) hasta 30 min, para los dos anchos de inmuno-pared por sextuplicado. Posteriormente se construyó una gráfica comparativa.

##### **4.4.3.2 Variación de la relación AWP:SAF**

Se construyeron microdispositivos de inmuno-pared de 40  $\mu\text{m}$  de ancho variando la relación AWP:SAF (9:1, 7:3, 5:5 y 3:7) para conocer que tanto influía sobre la intensidad fluorescente al adicionar DDAO en función del tiempo. Se registró la señal analítica por sextuplicado desde el tiempo cero (antes de la inyección de la solución de DDAO 0.25  $\mu\text{M}$  en una solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ )) hasta un tiempo de 15 min para cada condición de inmuno-pared y se realizó un gráfico comparativo.

#### 4.4.4 Proceso de biotilación del anticuerpo de captura

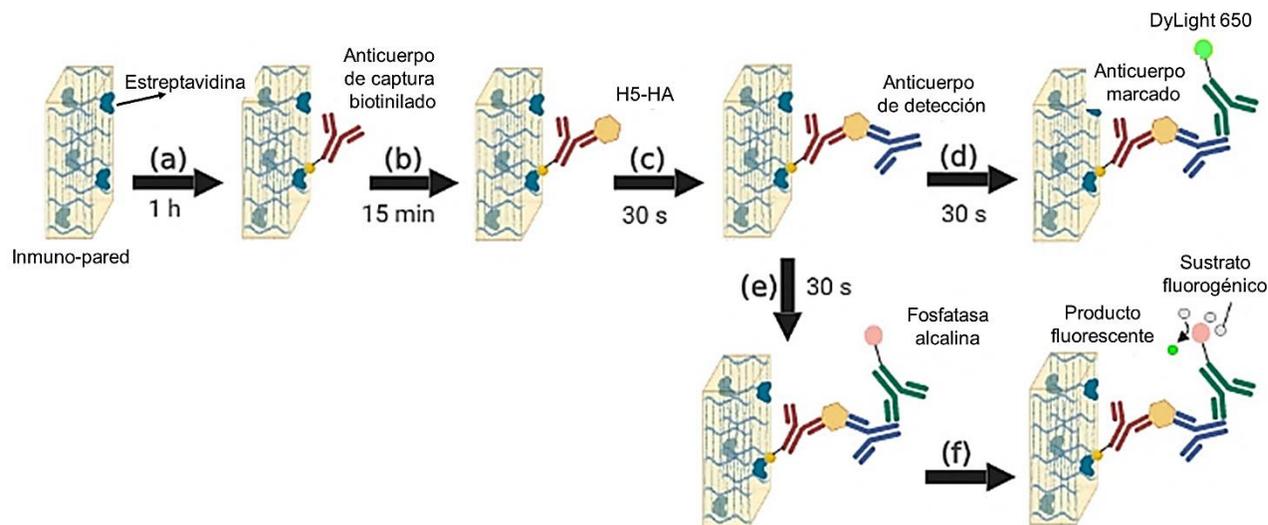
El anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina H5N1 de ratón (el cual tiene la función de actuar como anticuerpo de captura) se biotiló empleando las soluciones y siguiendo procedimiento descrito en el kit de marcaje con una biotina reactiva a amina con modificaciones menores.<sup>180</sup> Se añadieron 25 µg de la solución de anticuerpo y 100 µL de buffer WS a un tubo de filtración. La mezcla resultante se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. A continuación, se añadieron al tubo de filtración 100 µL de buffer de reacción más 8 µL de solución de biotina reactiva a amina en DMSO. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min. Después de la incubación, se añadieron 100 µL de buffer WS al tubo de filtración y la mezcla se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. Por último, se recuperó el conjugado del tubo de filtración añadiendo 200 µL de buffer WS. La solución resultante se transfirió a un microtubo y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

#### 4.4.5 Procedimiento del inmunoensayo

El volumen de cada una de las soluciones inyectadas dentro del microcanal fue de 0.25 µL. En la Figura 4-2 se localiza la representación general del procedimiento empleado. Primero se inyectó al microcanal el anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina H5N1 de ratón biotilado (anticuerpo de captura) con una concentración de 50 µg/mL en 0.5 % BSA-SAF y se incubó durante 1 h. A continuación, se añadió SAF (blanco) o el estándar de VIA H5-HA en SAF con un tiempo de incubación de 15 min. Enseguida, se agregó 1 % de leche desnatada en polvo en SAF (solución de bloqueo) y se incubó durante 5 min (este paso sólo fue necesario cuando se empleó el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina). Posteriormente, se inyectó anticuerpo policlonal de hemaglutinina anti-influenza aviar A de conejo (anticuerpo de detección) con una concentración de 50 µg/mL en 0.5 % BSA-PBS y se incubó durante 30 s. Finalmente, se inyectó anticuerpo marcado con DyLight 650 o anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (anticuerpo de marcaje) con una concentración de 50 µg/mL en 0.5 % BSA-PBS y se incubó durante 30 s. Después de cada paso de incubación a temperatura ambiente se eliminó la solución empleando una bomba de vacío y se lavó la pared inmunológica cinco veces con la solución de lavado sin eliminar la última inyección de solución de lavado.

Para los experimentos con anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, se requirió un paso adicional: el microdispositivo de inmuno-pared se colocó sobre la platina del microscopio de fluorescencia y se inyectó al microcanal una solución de sustrato flurogénico (fosfato DDAO) de concentración 30 µM en una solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1 µM Mg<sup>2+</sup>). La reacción

enzimática se llevó a cabo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Es importante recalcar que una vez terminado el inmunoensayo los microdispositivos no pueden ser reutilizados.



**Figura 4-2.** Representación esquemática del proceso del inmunoensayo empleando el microdispositivo de inmuno-pared. Inyección de (a) anticuerpo de captura con incubación de 1 h, (b) el antígeno (H5-HA) con incubación de 15 min, (c) el anticuerpo de detección con incubación de 30 s, (d) el anticuerpo marcado con fluorescencia con incubación de 30 s, (e) el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina con incubación de 30 s, y (f) adición del sustrato fluorogénico para llevar a cabo la reacción enzimática durante 30 min.

#### 4.4.6 Captura y análisis de imágenes

El microdispositivo de inmuno-pared se colocó en un microscopio de fluorescencia invertido (BZ-9000, Keyence) con un filtro Cy5 (OP-87766; excitación 620/60 nm, emisión 700/75 nm; Keyence). Se tomaron imágenes de fluorescencia a los 10, 20 y 30 min para el ensayo de anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina (el tiempo de exposición de la cámara CCD fue de 0.5 s) y sin ningún intervalo de tiempo para el ensayo de anticuerpos marcados con DyLight 650 (el tiempo de exposición de la cámara CCD fue de 7 s). Para cada estándar, el ensayo se realizó por triplicado. La intensidad de la fluorescencia de las imágenes capturadas se midió mediante el programa *ImageJ*, definiendo la zona de medición y obteniendo un valor arbitrario de fluorescencia.

#### 4.4.7 Construcción de las curvas de calibración

Se prepararon estándares de AVI H5-HA en SAF abarcando concentraciones de 1 a 100 ng/mL y se construyeron las curvas de calibración tanto para el inmunoensayo con anticuerpo marcado con fluorescencia (DyLight 650) como para el inmunoensayo realizado con el anticuerpo marcado

con la enzima fosfatasa alcalina (en este caso se obtuvieron tres curvas de calibración, para un tiempo de reacción enzimática de 10, 20 y 30 min). Cada uno de los estándares se midió por triplicado.

#### **4.4.8 Estudio de selectividad**

Los experimentos de selectividad se llevaron a cabo con cuatro tipos de proteínas de hemaglutinina H1, H3, H5 y H7. Se prepararon soluciones de cada estándar a una concentración de 100 ng /mL en SAF (anticuerpo marcado con fluorescencia) y 20 ng/mL en SAF (anticuerpo marcado con enzima) y se realizó en inmunoensayo empleando el microdispositivo de inmuno-pared. Los resultados obtenidos se compararon con la señal del blanco de reacción (SAF).

### **4.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS**

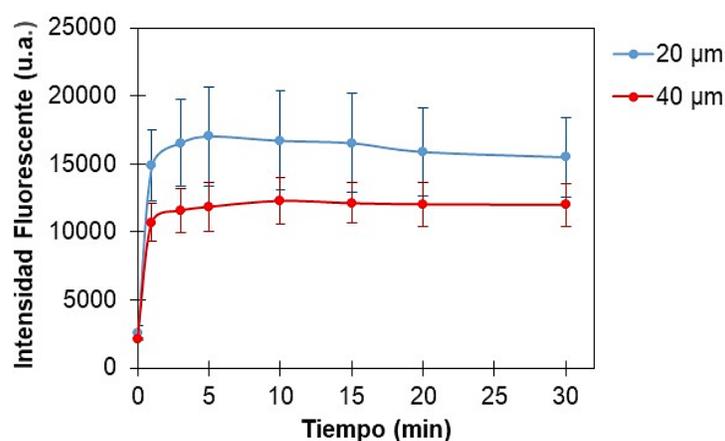
#### **4.5.1 Establecimiento de las condiciones para la construcción de la inmuno-pared**

Trabajos anteriores empleando la detección por medio de una inmuno-pared de 20  $\mu\text{m}$  de ancho y el anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina han demostrado su gran utilidad para el aumento en la sensibilidad de la detección y amplificación de la señal analítica, seleccionando al sustrato fluorogénico fosfato DDAO como el ideal para llevar a cabo la reacción enzimática.<sup>17</sup> Sin embargo, este procedimiento no sólo provoca un aumento en la intensidad fluorescente, sino también, un aumento considerable de la variación de las señales analíticas registradas. Por esta razón, se decidió buscar condiciones experimentales que permitieran mantener una señal analítica alta con una mínima variación al emplear el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina.

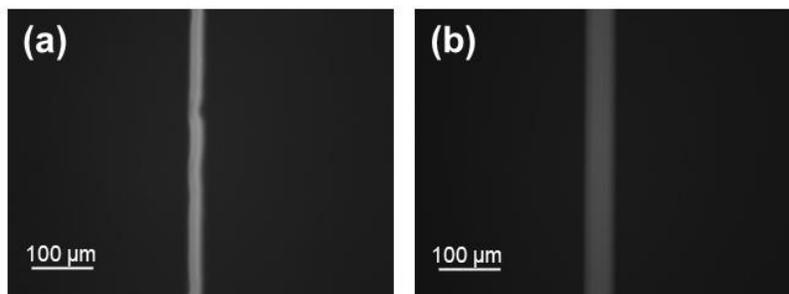
##### **4.5.1.1 Estudio de la intensidad fluorescente en función del tiempo**

La Figura 4-3 muestra los resultados de intensidad fluorescente en función del tiempo para una inmuno-pared de 20 y 40  $\mu\text{m}$  de ancho después de la adición de la solución DDAO. Como se observa, la señal analítica aumentó en ambos casos durante los primeros 5 min, para después mantenerse prácticamente constante. La amplificación de la intensidad fluorescente y su aumento en función del tiempo puede atribuirse en gran medida a la estructura de la inmuno-pared, debido a la acumulación espontánea de la molécula fluorescente DDAO (producto de reacción enzimática entre la enzima fosfatasa alcalina y DDAO fosfato) dentro de la pared de

AWP.<sup>181</sup> Sin embargo, es importante recalcar que pese a que la inmuno-pared con un ancho de 20  $\mu\text{m}$  presentó una mayor intensidad fluorescente en comparación con la de 40  $\mu\text{m}$ , la variación entre las señales registradas fue mucho mayor presentando un coeficiente de variación (CV) de alrededor del 20 %, mientras que para la inmuno pared con un ancho de 40  $\mu\text{m}$  se obtuvo un CV = 12 %. Además, el aumento en el ancho de la inmuno-pared le confiere una forma más definida y menor probabilidad de sufrir alguna deformación durante los pasos del inmunoensayo, ya que la inmuno-pared de 20  $\mu\text{m}$  de ancho era más propensa a deformarse en comparación con la de 40  $\mu\text{m}$ , tal como se aprecia en la Figura 4-4. Por lo anterior, se decidió seleccionar un ancho de canal de 40  $\mu\text{m}$  para realizar los experimentos posteriores.



**Figura 4-3.** Intensidad fluorescente en función del tiempo al emplear una inmuno-pared de 20 y 40  $\mu\text{m}$  de ancho construida con una relación AWP:SAF 5:5. El tiempo cero corresponde a antes de la adición de la solución DDAO 0.25  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ) hasta un tiempo de 30 min (n = 6).

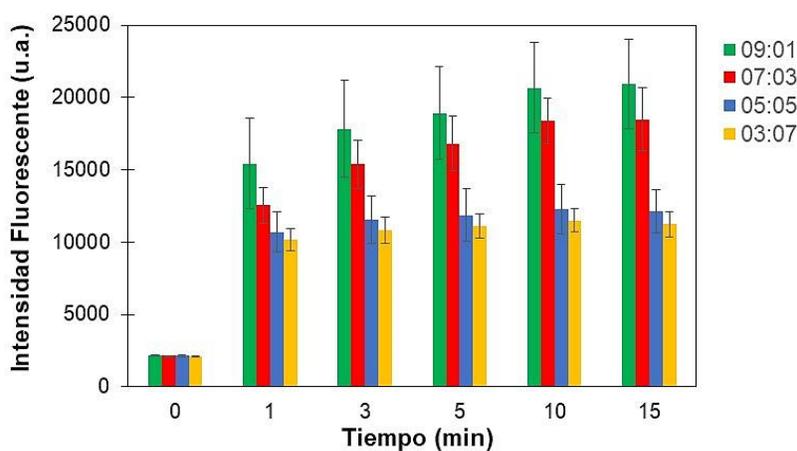


**Figura 4-4.** Imagen de una inmuno-pared de (a) 20  $\mu\text{m}$  y (b) 40  $\mu\text{m}$  de ancho después de 10 min de la adición de la solución de DDAO 0.25  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ). AWP:SAF 5:5

#### 4.5.1.2 Variación de la relación AWP:SAF

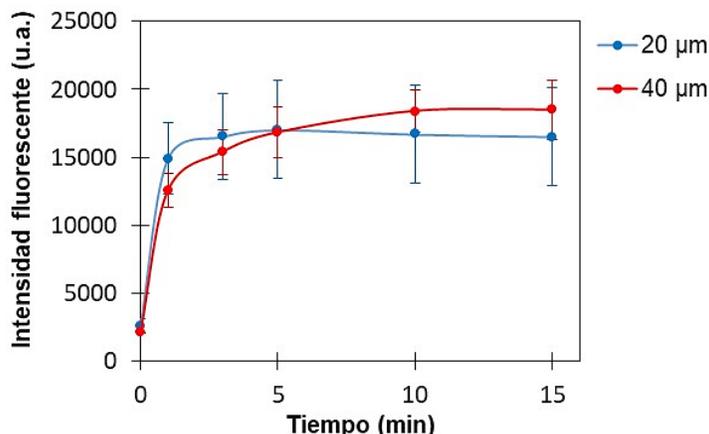
La modificación en la relación AWP:SAF influye directamente en la estructura de la inmuno-pared construida, ya que a mayor cantidad de polímero AWP, ésta será más rígida adquiriendo una forma más definida. Como se observa en la Figura 4-5, el aumento en la cantidad de AWP favoreció el incremento en la señal analítica, así, con una relación AWP:SAF 9:1 se obtuvo la intensidad fluorescente más alta (CV = 17 %) mientras que con la relación 3:7 la intensidad más baja (CV = 8 %). Este comportamiento se atribuye a que, al tener mayor cantidad de AWP, la molécula fluorescente DDAO tiende a acumularse en mayor cantidad dentro de la inmuno-pared aumentando la señal registrada, así como también aumentan la variación de las señales.

Debido a que se busca tener un balance entre una señal fluorescente alta con una baja variación, se decidió seleccionar la relación 7:3 con un CV = 10 % para la futura construcción de la inmuno-pared.



**Figura 4-5.** Intensidad fluorescente en función del tiempo empleando diferentes relaciones de AWP:SAF para la construcción de la inmuno-pared de 40  $\mu\text{m}$  de ancho. El tiempo cero corresponde a antes de la adición de la solución DDAO 0.25  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ) hasta un tiempo de 15 min (n = 6).

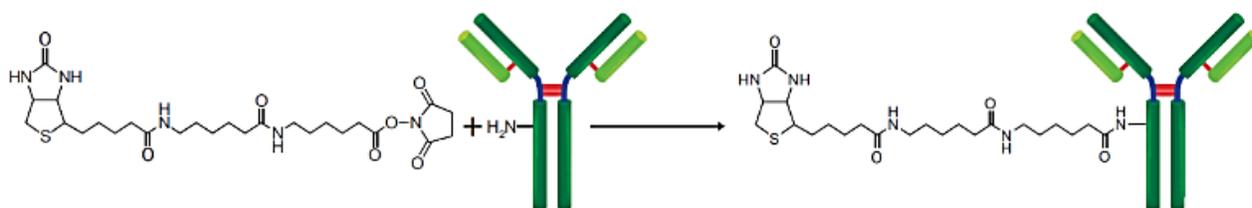
Si se comparan los resultados obtenidos con las condiciones empleadas por Keine *et al.* (inmuno-pared con 20  $\mu\text{m}$  de ancho, AWP:SAF 5:5)<sup>17</sup> con las obtenidas al modificar el ancho de la inmuno-pared (40  $\mu\text{m}$ ) y relación AWP:SAF (7:3), se observan intensidades fluorescentes similares, pero con valores de CV mucho menores para los experimentos empleando un ancho de la inmuno-pared 40  $\mu\text{m}$  y relación AWP:SAF 7:3 (Figura 4-6). Debido a lo anterior, se decidió seleccionar estas últimas condiciones para realizar los inmunoensayos empleando el anticuerpo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina.



**Figura 4-6.** Intensidad fluorescente en función del tiempo al emplear una inmuno-pared de 20 µm (AWP:SAF 5:5) y 40 µm (AWP:SAF 7:3) de ancho. El tiempo cero corresponde a antes de la adición de la solución DDAO 0.25 µM en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0, 1 µM Mg<sup>2+</sup>) hasta un tiempo de 15 min (n = 6).

#### 4.5.2 Proceso de biotilación del anticuerpo de captura

La unión covalente de biotina a anticuerpos (biotilación) es una técnica ampliamente usada en la realización de inmunoensayos. En este caso se empleó una biotina reactiva a aminas, la cual posee un grupo éster succinimidílico que puede formar fácilmente un enlace covalente con un grupo amino de una proteína u otras macromoléculas sin ningún proceso de activación (Figura 4-7). De acuerdo con el kit de inmovilización empleado<sup>180</sup> se logró la conjugación de entre 7 y 10 moléculas de biotina por cada anticuerpo

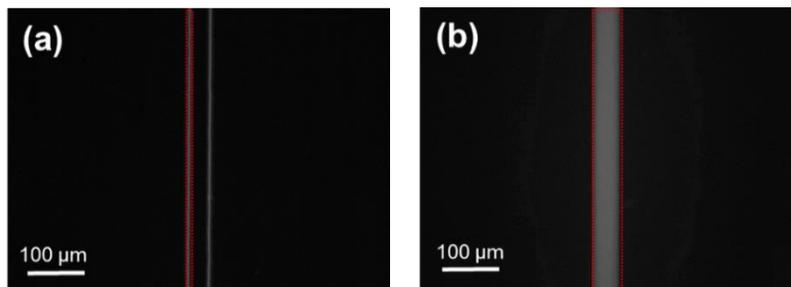


**Figura 4-7.** Ejemplificación del proceso de biotilación de un anticuerpo.<sup>180</sup>

#### 4.5.3 Captura y análisis de imágenes

A continuación, se muestran las imágenes de fluorescencia típicas obtenidas durante el análisis para un estándar de H5-HA en SAF. El área de detección (rectángulo punteado color rojo) se ajustó manualmente en el programa *ImageJ* a 20 × 1000 píxeles o 100 × 1000 píxeles según el inmunoensayo realizado, anticuerpo marcado con DyLight 650 o marcado con enzima fosfatasa alcalina, respectivamente. Obteniendo así unidades arbitrarias de intensidad fluorescente para la posterior construcción de las curvas de calibración. Para el inmunoensayo con el anticuerpo

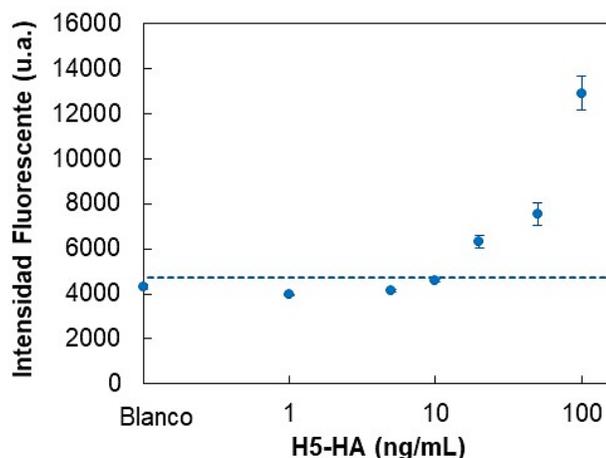
marcado con DyLight 650 la intensidad fluorescente se presentó en ambos lados de la pared inmunológica en donde se inmovilizaron y unieron los anticuerpos (Figura 4-8(a)), mientras que al emplear el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina el producto enzimático fluorescente (DDAO) se difunde y concentra dentro de la inmuno-pared induciendo la aparición de fluorescencia dentro de toda la estructura (Figura 4-8(b)).



**Figura 4-8.** Imágenes de fluorescencia típicas al emplear el microdispositivo de inmuno-pared para un estándar VIA H5-HA de 100 ng/mL. (a) Anticuerpo marcado con DyLight 650 con un área de detección de  $20 \times 1000$  píxeles (tiempo de exposición de la cámara CCD = 7 s). (b) Anticuerpo marcado con enzima con un área de detección de  $100 \times 1000$  píxeles (el tiempo de exposición de la cámara CCD = 0.5 s). El rectángulo punteado representa el área de detección.

#### 4.5.4 Detección de H5-HA con el anticuerpo marcado con DyLight 650

La curva de calibración construida abarcó un intervalo de concentraciones de H5-HA de 1 a 100 ng/mL (Figura 4-9). El límite de detección (LOD), se determinó considerando el promedio de la señal del blanco más tres desviaciones estándar, obteniendo un valor de 10.7 ng/mL. Por lo tanto, el intervalo de cuantificación de H5-HA fue de 10.7 a 100 ng/mL con un tiempo total de análisis de 16 min (sin considerar el tiempo de incubación del anticuerpo de captura).



**Figura 4-9.** Curva de calibración para la cuantificación de H5-HA empleando el microdispositivo de inmuno-pared con el anticuerpo marcado con DyLight 650. Intervalo de cuantificación 10.7—100 ng/mL. La línea punteada representa el LOD (promedio del blanco +  $3S$ ). El tiempo de exposición de la cámara CCD fue de 7 s ( $n = 3$ ).

#### 4.5.5 Detección de H5-HA con el anticuerpo marcado con enzima (fosfatasa alcalina)

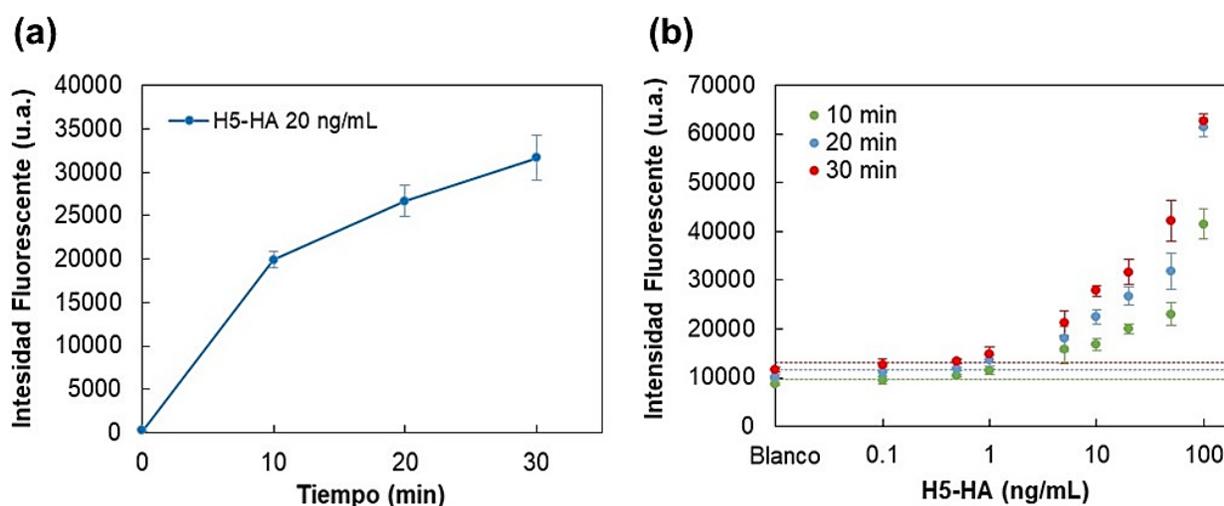
El uso del anticuerpo marcado con enzima tiene la finalidad de obtener un aumento en la sensibilidad del método. En este caso fue necesaria la adición de una solución de bloqueo (1 % de leche desnatada en SAF) para evitar la adsorción no específica del anticuerpo de detección en la superficie de la inmuno-pared y prevenir la variación en las señales de fluorescencia. Este paso se realizó una vez que el antígeno (H5-HA) se unió al anticuerpo de captura, ya que, si se realizaba antes, interferiría con el proceso de unión.

El producto fluorescente (DDAO) se generó por medio de una reacción enzimática en presencia de una cantidad en exceso de sustrato fluorogénico (fosfato DDAO) y la enzima fosfatasa alcalina.<sup>17</sup> Para estudiar la variación de la intensidad fluorescente del producto de reacción enzimática en función del tiempo, se utilizó una solución estándar de H5-HA en SAF de concentración de 20 ng/mL para la realización del inmunoensayo, las señales de fluorescencia se midieron durante 30 min en intervalos de 10 min. Se encontró que la intensidad de la fluorescencia aumenta considerablemente en función del tiempo (Figura 4-10(a)) por lo que se decidió realizar una curva de calibración para cada uno de los tres tiempos de reacción enzimática. Las curvas de calibración resultantes para los estándares de H5-HA en un intervalo de concentración de 0.1 a 100 ng/mL se muestran en la Figura 4-10(b). A pesar de que la intensidad fluorescente aumentó con el tiempo de reacción enzimática, el comportamiento de las curvas de calibración es muy similar. Los LOD's, calculados considerando el promedio del blanco más tres desviaciones estándar, fueron 0.23 ng/mL (10 min), 0.31 ng/mL (20 min) y 0.33 ng/mL (30 min). Estos valores no difieren mucho entre sí, y todos ellos son mucho más bajos que el LOD obtenido para el ensayo con anticuerpo marcado con fluorescencia. Como la finalidad del experimento es disminuir el tiempo de análisis, se seleccionó un tiempo de reacción enzimática de 10 min para llevar a cabo los experimentos de selectividad posteriores. El intervalo de detección fue de 0.23 a 100 ng/mL con un tiempo total de análisis de 31 min (sin considerar el tiempo de incubación del anticuerpo de captura).

#### 4.5.6 Comparación del método desarrollado vs. un kit comercial

La Tabla 4-1 resume y compara los resultados obtenidos al realizar el inmunoensayo en el microdispositivo de inmuno-pared con los reportados para un método de placa de microtitulación convencional (H5N1 (Avian Flu) Hemagglutinin ELISA Pair Set).<sup>182</sup> Como se observa en la tabla, el kit ELISA posee el valor más bajo de LOD (0.08 ng/mL), pero el tiempo de análisis más largo (260 min). Los microdispositivos de inmuno-pared tienen la ventaja de requerir un volumen muy

pequeño de muestra (0.25  $\mu$ l) y un tiempo de ensayo mucho más corto. Por ejemplo, utilizando el anticuerpo marcado con fluorescencia la detección y cuantificación de H5-HA se realiza en tan sólo 16 min, con un valor de LOD de 10.7 ng/mL. Si se emplea el anticuerpo marcado con enzima, se incrementa considerablemente la sensibilidad (LOD = 0.23 ng/mL) manteniendo un tiempo de análisis considerablemente corto (31 min). La comparación de los valores de LOD entre el dispositivo de inmuno-pared con anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina y el método de microplaca descrito en el kit ELISA muestran que éste último es casi tres veces más sensible. Sin embargo, el tiempo requerido para el análisis es ocho veces mayor. Como la detección rápida y oportuna de VIA H5-HA es necesaria para detener la propagación y la mutación de este virus en su forma altamente patógena,<sup>183</sup> el microdispositivo de inmuno-pared con anticuerpo marcado con enzima fosfatasa alcalina es opción viable para su futura detección de manera rápida y sensible utilizando un volumen de muestra muy bajo.



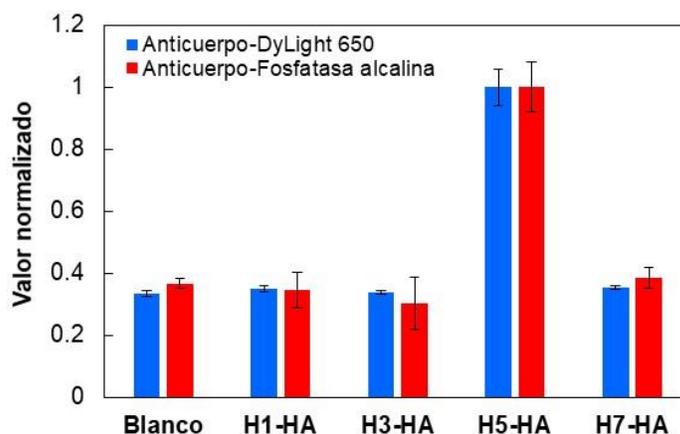
**Figura 4-10.** Medidas de intensidad fluorescente del inmunoensayo en microdispositivo de inmuno-pared empleando el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina. (a) Intensidad fluorescente de un estándar de H5-HA en SAF (20 ng/mL) en función del tiempo. (b) Curvas de calibración para la cuantificación de H5-HA bajo tres tiempos de reacción enzimática (10 min, 20 min, y 30 min). Intervalo de cuantificación 0.23–100 ng/mL. Las líneas punteadas representan el LOD (promedio del blanco + 3 $\sigma$ ). El tiempo de exposición de la cámara CCD fue de 0.5 s (n = 3).

**Tabla 4-1.** Características de los métodos de detección de VIA H5-HA empleando el microdispositivo de inmuno-pared (anticuerpo marcado con fluorescencia y con enzima) y el método convencional en microplaca (kit ELISA).

Característica	Microdispositivo de inmuno-pared		Método convencional en microplaca (kit ELISA) <sup>182</sup>
	Anticuerpo-DyLight 650	Anticuerpo-fosfatasa alcalina	
Tiempo	16 min	31 min	260 min
Volumen	0.25 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L	100 $\mu$ L
LOD	10.7 ng/mL	0.23 ng/mL	0.08 ng/mL

#### 4.5.7 Estudio de selectividad

Los valores normalizados de intensidad fluorescente se calcularon considerando el promedio de la señal de detección del estándar H5-HA como 1. Los resultados muestran que, entre los diferentes subtipos de proteínas de hemaglutinina, H5-HA fue el único que presentó una señal significativamente diferente al blanco tanto para la detección con el anticuerpo con marcaje fluorescente como con enzima (Figura 4-11). A partir de estos resultados, se concluyó que el microdispositivo de inmuno-pared es una opción prometedora para la futura detección del virus VIA H5-HA.



**Figura 4-11.** Valores normalizados de intensidad fluorescente para diferentes subtipos de hemaglutinina (H1, H3, H5, H7) y blanco de reacción (SAF) medidos con el dispositivo de inmuno-pared utilizando anticuerpos marcados con fluorescencia y marcados con enzima (tiempo de reacción enzimática 10 min) (n = 3).

#### 4.6 CONCLUSIONES

En este trabajo, se optimizó la detección y cuantificación de VIA H5-HA por medio de un microdispositivo de inmuno-pared con detección fluorescente. El anticuerpo marcado con fluorescencia (DyLight 650) y el anticuerpo marcado con enzima (fosfatasa alcalina) se utilizaron como dos variantes de anticuerpos de marcaje para realizar la detección obteniendo un aumento en la sensibilidad al emplear el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina con fosfato DDAO como sustrato fluorogénico, debido a la amplificación enzimática de la señal analítica obteniendo un LOD de 0.23 ng/mL, casi 50 veces menor que el del anticuerpo marcado con fluorescencia (10.7 ng/mL), y con un intervalo de cuantificación entre 0.23 y 100 ng/mL. Además, sólo se requirieron 31 min de tiempo de análisis con un pequeño volumen de muestra (0.25 µL). El método demostró ser altamente selectivo frente a otros subtipos de hemaglutininas. El dispositivo de inmuno-pared con anticuerpo marcado con enzima ofrece la posibilidad de realizar un inmunoensayo rápido, sensible, selectivo y simple para la detección y cuantificación de VIA H5-HA.

# \* CAPÍTULO V \*

## Microdispositivo en flujo continuo con nanopartículas magnéticas para la cuantificación de urea en muestras de orina y plasma

### 5.1 RESUMEN

La urea es el metabolito final del procesamiento de proteínas y compuestos nitrogenados en mamíferos. Formada exclusivamente en el hígado, la urea es principalmente transportada por el torrente sanguíneo a los riñones donde se excreta en la orina, lo que representan 80 – 90% de la excreción de nitrógeno en humanos. Un mal funcionamiento de los riñones incrementa el nivel de urea presente en sangre, convirtiéndose en un biomarcador útil en el diagnóstico clínico para evaluar la función renal. La detección de urea empleando microdispositivos ya ha sido estudiada aprovechando las ventajas que este tipo de dispositivos brindan (bajo costo, disminución de tiempo de análisis y uso de muestras/reactivos, portabilidad, rapidez, entre otras) enfocándose en su mayoría en detección conductimétrica, sin embargo, pocos son los trabajos que han explorado el área de detección espectrofotométrica. En el presente trabajo se diseñó, fabricó, caracterizó y evaluó un microdispositivo de polidimetilsiloxano (PDMS) para la cuantificación de urea en flujo continuo. El diseño del microdispositivo cuenta con dos zonas principales: (1) zona de reacción enzimática en donde se encuentran retenidas nanopartículas magnéticas conjugadas con ureasa y (2) zona de reacción de detección en donde se incorporan el resto de los reactivos (reacción modificada de Berthelot) para producir el producto de reacción colorido. La detección espectrofotométrica se realizó en un microdispositivo adicional empleado como microcelda de flujo con un diseño en Z acoplado con fibras ópticas. La curva de calibración construida con estándares de urea diluidos en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0.05 mol/L pH 7.0 tuvo un intervalo lineal de 0.12 – 3.00 mg/dL con valores de límite de detección y cuantificación de 0.04 y 0.12 mg/dL, respectivamente. Se evaluó la precisión de la metodología obteniendo una repetibilidad de 0.90 % y reproducibilidad de 4.52 %. La exactitud se estudió a través de ensayos de % recuperación empleando muestras de plasma y orina fortificadas obteniendo valores cercanos al 100 %. El método desarrollado se utilizó para la cuantificación de urea en muestras de plasma y orina encontrando valores dentro del intervalo normal con una tasa de análisis de 11 muestras por triplicado en un tiempo de 100 min.

## 5.2 INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal es una enfermedad que ocurre cuando los riñones dejan de funcionar correctamente, perdiendo su capacidad para filtrar residuos provenientes del torrente sanguíneo, así como exceso de líquidos y minerales. Por lo tanto, si los riñones se encuentran dañados pueden acumularse desechos peligrosos en el organismo, además de una elevación en la presión arterial, retención de líquidos y baja producción de glóbulos rojos. Lamentablemente, esta enfermedad no tiene cura y, una vez alcanzada la falla renal, el paciente debe recibir tratamiento de diálisis o un trasplante de riñón para sobrevivir, sin embargo, si no se trata a tiempo, esta enfermedad puede ser fatal. Las cifras de morbilidad y mortalidad son alarmantes y, en México, representa una de las principales causas de atención en hospitalización y en servicios de urgencia.<sup>184</sup>

Como un indicador de la función del riñón, la determinación de urea en muestras de plasma o suero y orina es una prueba rutinaria en los laboratorios de análisis clínicos.<sup>27</sup> La urea es el metabolito final predominante de los compuestos nitrogenados en mamíferos, y representa del 80 al 90 % de la excreción de nitrógeno en los seres humanos. Este biomarcador se forma exclusivamente en el hígado y se transporta principalmente por la sangre hacia los riñones donde se excreta en la orina,<sup>110</sup> su concentración normal en plasma o suero se encuentra entre valores de 15 a 45 mg/dL, mientras que puede estar hasta 50 veces más concentrada en muestras de orina.<sup>111</sup> La detección de un incremento en los niveles de urea en este tipo de muestras puede ser provocado por insuficiencia renal o la obstrucción del tracto urinario, por lo que su detección es de gran importancia para un diagnóstico clínico oportuno y un correcto seguimiento de la enfermedad.<sup>112</sup>

Para la cuantificación de urea, los métodos enzimáticos son los más empleados, su implementación se basa en la reacción de hidrólisis de urea catalizada por la enzima ureasa (URS), obteniendo como producto de reacción amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Esta reacción suele detectarse a través de métodos electroanalíticos o de manera espectrofotométrica por medio del método de Berthelot; el cual consiste en la formación de un indofenol colorido a partir de la reacción entre iones  $\text{NH}_4^+$  y fenol en medio básico con detección a longitudes de onda entre 630 y 720 nm.<sup>113,114</sup> De esta manera, la urea es cuantificada indirectamente con base en la cantidad de iones  $\text{NH}_4^+$  presentes en la solución después del proceso enzimático. Hoy en día, hay disponibles diversos kits comerciales para la detección de urea basados en el método de Berthelot, estos emplean volúmenes de reactivos y muestra relativamente bajos (1000  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$ , respectivamente),<sup>185,186</sup> sin embargo, se ha estudiado su mejora a través de la disminución

significativa del volumen de reactivos empleado, así como del tiempo de análisis, por medio de la implementación de dispositivos de microfluídica.

La gran mayoría de las metodologías reportadas para la detección de urea empleando microdispositivos se basan en biosensores mediante métodos electroanalíticos, como potenciometría, amperometría y conductimetría,<sup>112,119</sup> en donde la construcción de los electrodos dentro del microdispositivo es uno de los pasos claves para lograr una detección adecuada. En comparación, la detección espectrofotométrica de urea utilizando la reacción de Berthelot ha sido poco estudiada. Son escasos los trabajos que han reportado este tipo de detección en microchip, por ejemplo, Remiszewska *et al.*<sup>29</sup> desarrolló un sistema microanalítico para la determinación de urea en cultivos celulares con ureasa inmovilizada sobre la superficie de un microreactor empleando la tecnología de baja temperatura para cerámica cocida (LTCC), detectando iones  $\text{NH}_4^+$  a través del método de Berthelot modificado. No obstante, esta metodología presenta muchas desventajas: el proceso de microfabricación es complejo y laborioso, ya que incluye la formación de 14 capas con diseños independientes que juntas forman el dispositivo final, además la modificación química sobre la superficie de la cerámica para elaborar el microreactor requiere de muchos pasos como lo son hidratación, silanización, reacción con glutaraldehído y por último la inmovilización de la enzima ureasa, éste paso debe realizarse con cuidado cada vez que se construye un nuevo microdispositivo, ya que, una modificación sobre la inmovilización puede conducir a una reproducibilidad y repetibilidad baja. Estos microdispositivos son desechables con un tiempo de vida de la enzima inmovilizada en el microreactor de 30 días, ya que después de este tiempo la sensibilidad disminuye en un 14 % respecto al valor obtenido en el primer día de medición, y, a pesar de sólo requerir 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  de reactivos y muestra para realizar la detección, tienen una tasa de medición de tan sólo 6 muestras/h.

En este capítulo se presenta el diseño, fabricación y evaluación de un microdispositivo de PDMS reutilizable para la determinación de urea en muestras de orina y plasma, mejorando las desventajas encontradas en otros trabajos reportados, por medio de la construcción rápida y relativamente más barata de los microdispositivos empleando fotolitografía y litografía suave, así como utilizando MNPs conjugadas con la enzima ureasa como soporte sólido, buscando aumentar significativamente el área de superficie para el desarrollo de la reacción enzimática y disminuyendo el tiempo de análisis para el procesamiento de un mayor número de muestras por hora. Además, la cuantificación de urea en muestras de orina y plasma se comparó con una metodología en lote para estudiar el correcto funcionamiento del microdispositivo.

### 5.3 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, fabricar y evaluar un microdispositivo de PDMS para la cuantificación en flujo continuo de urea en muestras humanas de orina y plasma empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con ureasa como soporte sólido.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Emplear las técnicas de fotolitografía y litografía suave por moldeo de réplica para la fabricación de microdispositivos de PDMS y caracterizarlos.
- Realizar el procedimiento de conjugación de la enzima ureasa con MNPs empleando un kit comercial y determinar la cantidad de enzima unida por medio del ensayo de Lowry.
- Optimizar en el microdispositivo la cuantificación de urea empleando la reacción modificada de Berthelot, estudiando parámetros como: cantidad de enzima, uso de catalizador y su concentración, temperatura de reacción enzimática, concentración de reactivos y tiempo de vida de la enzima conjugada.
- Realizar un análisis de microscopía electrónica de transmitancia (TEM) para evaluar la conjugación de la enzima con las MNPs.
- Integrar la detección espectrofotométrica con fibras ópticas en un microdispositivo.
- Construir la curva de calibración y determinar los límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.
- Cuantificar la concentración de urea en diferentes muestras de orina y plasma en el microdispositivo y comparar el resultado al realizar la cuantificación en lote.

### 5.4 METODOLOGÍA

#### 5.4.1 Reactivos

Fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para la preparación del buffer de fosfatos (SAF) 0.05 mol/L pH 7.0, muestra comercial de cloro (Cloralex) con un porcentaje de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) del 5 %, ácido salicílico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ), nitroprusiato de sodio ( $\text{Na}_2[\text{C}_5\text{N}_6\text{OFe}]$ ), urea, ureasa (Tipo III de Jack Bean, 40150 U/g), Tween 80, 2-propanol y acetato de propilenglicol monometil éter fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) se adquirió de Fermont. El kit LinkAmine MAGNETIC 200 nm se adquirió de Nanoimmunotech. La resina fotosensible SU-8 3035 se adquirió de Microchem Inc. El kit de polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 se adquirió de Dow Corning Corporation.

### 5.4.2 Experimentos iniciales

Los experimentos iniciales se realizaron en lote empleando microtubos y se enfocaron en la modificación al método de Berthelot antes de efectuar los primeros experimentos en el microdispositivo. Se variaron parámetros como el reactivo utilizado para la reacción (2-clorofenol y salicilato), la adición de un catalizador (nitroprusiato), y el estudio del tiempo de incubación de la reacción enzimática y de desarrollo de color.

#### 5.4.2.1 Comparación entre el uso de 2-clorofenol y salicilato

Se realizaron una serie de experimentos en microtubos para comparar la absorbancia registrada al emplear como reactivo 2-clorofenol y salicilato variando las unidades de enzima ureasa utilizada. Los experimentos se condujeron de la siguiente manera: (1) se adicionó el volumen necesario de una solución de ureasa en SAF de concentración 16.5 U/mL para tener una cantidad de enzima entre 0.33 y 1.65 U; (2) se adicionaron 100  $\mu$ L de un estándar de urea en SAF de 300 mg/dL para tener una concentración de urea de 15 mg/dL, en el caso del blanco de reacción se adicionó únicamente SAF; (3) se agregaron 500  $\mu$ L de hipoclorito 1 % en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) más 500  $\mu$ L de una solución de 2-clorofenol o salicilato 0.25 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L); (4) se adicionó el volumen necesario de agua destilada hasta completar 2 mL; (5) la mezcla de reacción se incubó durante 40 min a 37 °C para permitir el desarrollo de color. Cada experimento se realizó por triplicado y la medición de la absorbancia a  $\lambda = 650$  nm se realizó en una celda de cuarzo ajustando la absorbancia con el blanco empleando un espectrofotómetro (Cary 1 UV-Vis spectrophotometer). Los resultados obtenidos se graficaron para comparar el uso de ambos reactivos (2-clorofenol y salicilato).

#### 5.4.2.2 Estudio del tiempo de incubación de la reacción urea-ureasa

Se decidió estudiar cómo se modifica la señal analítica al realizar un paso extra de incubación de la reacción enzimática. Para ello se repitió la metodología descrita en la sección anterior (5.4.2.1), únicamente empleando la solución de salicilato 0.25 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) y adicionando el paso de incubación de la reacción enzimática, así, después de la adición de ureasa y urea el microtubo se mezcló agitando ligeramente y se incubó a 37 °C durante un tiempo de 5 min. Cada experimento se realizó por triplicado y la medición de la absorbancia se realizó a  $\lambda = 650$  nm. Por último, se construyó un gráfico comparativo de las señales de absorbancia con y sin incubación de la reacción enzimática.

#### 5.4.2.3 Adición del catalizador nitroprusiato de sodio

Se prepararon dos soluciones de salicilato 0.25 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L), una sin catalizar y otra con nitroprusiato de sodio 0.025 mol/L como catalizador. Los experimentos se realizaron por triplicado en microtubos de la siguiente manera: (1) se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de ureasa en SAF 16.5 U/mL (1.65 U); (2) se agregaron 100  $\mu$ L de un estándar de urea en SAF con una concentración de 4 mg/dL para tener una concentración de urea de 0.2 mg/dL, en el caso del blanco de reacción se adicionó únicamente SAF; (3) la mezcla se agitó ligeramente y se realizó el paso de incubación de la reacción enzimática en baño de agua a 37 °C durante 5 min; (4) se adicionaron 500  $\mu$ L de hipoclorito 1 % en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) más 500  $\mu$ L salicilato 0.25 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) con o sin catalizador; (5) se agregó el volumen necesario de agua destilada hasta completar 2 mL; (5) la mezcla de reacción se incubó durante 40 min a 37 °C en baño de agua para permitir el desarrollo de color.

Se realizó el espectro de absorción de los productos de reacción con y sin el uso de catalizador para corroborar la longitud de onda de máxima absorción. La absorbancia se midió en una celda de cuarzo a  $\lambda = 650$  nm para el producto sin catalizador y a  $\lambda = 690$  nm para el producto con catalizador. Se realizó un gráfico comparativo entre ambos resultados.

#### 5.4.2.4 Estudio del tiempo de incubación de la reacción de Berthelot

Con la finalidad de disminuir el tiempo de incubación para el desarrollo de color después de la adición de la solución de hipoclorito y salicilato con catalizador (reacción de Berthelot), se realizó un procedimiento similar al descrito en la sección anterior (5.4.2.3) con una concentración de urea de 0.5 mg/dL. En este caso, el último paso de incubación a 37 °C en baño de agua se realizó registrando la absorbancia del producto de reacción a  $\lambda = 690$  nm en diferente tiempo durante un periodo de 1 a 40 min. Los resultados obtenidos se graficaron para seleccionar el tiempo de incubación para la reacción de desarrollo de color.

#### 5.4.3 Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos

La fabricación y caracterización de los microdispositivos de PDMS se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo II sección 2.4.2, con la diferencia de que el paso de distribución de la fotorresina sobre la oblea de silicio empleando el spin-coater se implementó únicamente una vez para obtener una profundidad de microcanal de alrededor de 100  $\mu$ m.

#### 5.4.4 Toma y tratamiento de muestras

- Muestras de plasma: las muestras de sangre se tomaron utilizando un tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA K2 en pacientes entre 21 y 50 años, inmediatamente se separó el plasma del resto de la sangre mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- Muestras de orina: se pidió a los mismos pacientes que donaron la muestra de sangre que recolectaran la primera orina de la mañana en un frasco esterilizado, 3 mL de la muestra se filtraron empleando un filtro de jeringa de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  de poro (Sigma-Aldrich) y se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 24 h para su análisis.

#### 5.4.5 Conjugación de ureasa (URS) con las nanopartículas magnéticas (MNPs)

La enzima ureasa se inmovilizó covalentemente a los grupos carboxilo en la superficie de las MNPs siguiendo el procedimiento descrito en el kit LinkAmine MAGNETIC con modificaciones menores,<sup>149</sup> tal como se describió en el Capítulo II sección 2.4.5 utilizando una solución de ureasa (URS) de concentración aproximada de 6 mg/mL. Las MNPs-URS resultantes se resuspendieron en solución amortiguadora (SAF) y se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Posteriormente, preparando las soluciones (reactivos A — D) presentadas en el Capítulo II sección 2.4.5, se cuantificó la cantidad de enzima ureasa conjugada por mg de nanopartícula magnética por medio del ensayo de Lowry. Para ello se empleó una solución madre de ureasa de concentración 5 mg/mL con la que se realizaron las diluciones necesarias para preparar siete estándares abarcando concentraciones entre 50 y 2000  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 5-1). La curva de calibración se realizó por triplicado y con los valores obtenidos se construyó una sola curva de calibración.

**Tabla 5-1.** Construcción de la curva de calibración para la cuantificación de ureasa (URS) por el ensayo de Lowry. Todos los estándares se aforaron a un volumen final de 2 mL con agua destilada.

Estándar	[URS] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen URS* ( $\mu\text{L}$ )	Volumen reactivo C (mL)	Volumen reactivo D ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	--	--		
1	50	20		
2	100	40		
3	250	100		
4	500	200	1	100
5	1000	400		
6	1500	600		
7	2000	800		

\*A partir de una solución de ureasa (URS) de 5 mg/mL

Se cuantificó la concentración de URS en la solución antes y después de realizar la conjugación con las MNPs. Para ello, se prepararon por triplicado soluciones de URS inicial (empleando un estándar de URS 6 mg/mL) y final (empleando el sobrenadante de inmovilización). La diferencia entre ambas concentraciones corresponde a la cantidad de ureasa inmovilizada.

#### **5.4.6 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

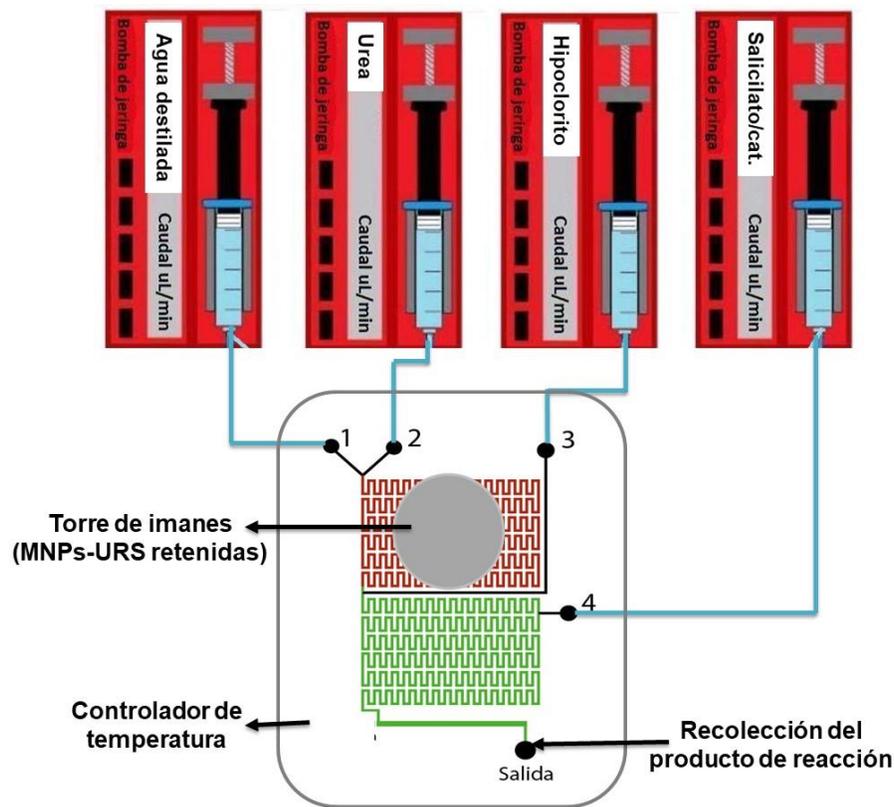
Se corroboró la correcta unión de la enzima con las MNPs mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La muestra se preparó y analizó siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo II 2.4.9 tanto para las MNPs con y sin conjugación con URS.

#### **5.4.7 Montaje experimental para la cuantificación de urea**

El microdispositivo se colocó sobre una torre de imanes, se selló la entrada número (2) y en la entrada (1) se inyectó con ayuda de una micropipeta ((Finnpipette F1, Thermo Scientific) un volumen apropiado de la solución de MNPs-URS (concentración 10 mg/mL;  $142.49 \pm 42.16 \mu\text{g}$  URS/mg MNPs) previamente sonicadas durante 30 s. Posteriormente el microdispositivo se colocó sobre un controlador de temperatura (Mero TCU-125, dolomite) y la torre de imanes se posicionó en la parte superior del mismo abarcando la zona de reacción enzimática. Una vez retenidas las MNPs-URS, se ingresaron los reactivos por medio de bombas de jeringa (NE-300, New Era Pump Systems) empleando jeringas de 3 mL (BD Plastipak™) conectadas con tubería de teflón de 0.022 pulgadas de diámetro interno (Cole Parmer) a las entradas del microdispositivo. El orden de ingreso fue el siguiente: (1) Agua destilada, (2) solución de urea diluida en SAF, (3) solución de hipoclorito de sodio en medio básico y (4) solución básica de salicilato con nitroprusiato de sodio (catalizador), cada uno a un caudal fijo de  $2 \mu\text{L}/\text{min}$ , teniendo así un caudal total de  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ . El montaje experimental puede apreciarse en la Figura 5-1.

Para la medición del blanco de reacción se detuvo la bomba de jeringa de entrada de urea (entrada 2) y se aumentó el caudal de entrada de agua destilada (entrada 1) a  $4 \mu\text{L}/\text{min}$  para mantener el caudal total de  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ .

La reacción se realizó en flujo continuo recolectando en la salida del microdispositivo con una punta de micropipeta aproximadamente  $5 \mu\text{L}$  de blanco o producto de reacción (tiempo de recolección 40 s) para su posterior detección espectrofotométrica. Entre cada cambio de muestra se esperó un tiempo aproximado de 4 min antes de realizar la medición.



**Figura 5-1.** Montaje experimental para la reacción en flujo continuo para la cuantificación de urea empleando el microdispositivo y MNPs-URS retenidas. Entrada de (1) agua destilada (acarreador), (2) solución de urea en SAF, (3) solución de hipoclorito de sodio y (4) solución de salicilato con catalizador, cada uno a un caudal de 2 µL/min. Caudal total de 8 µL/min. A la salida del microdispositivo se recolecta en puntas de micropipeta el producto de reacción.

#### 5.4.8 Sistema de detección

La absorbancia del producto de reacción recolectado en las puntas de micropipeta se midió espectrofotométricamente a  $\lambda = 690$  nm ajustando el blanco con agua destilada empleando un microdispositivo de PDMS como microcelda de flujo (Figura 2-3, Capítulo II sección 2.4.7).

#### 5.4.9 Establecimiento de las condiciones de reacción

Para la optimización de la metodología se evaluó el tiempo de vida de la enzima, la temperatura de reacción enzimática y por último se realizó un diseño de experimentos como se describe a continuación.

##### 5.4.9.1 Estudio del tiempo de vida de la enzima

Empleando una solución estándar de urea de concentración 2.5 mg/dL diluida en SAF, 8 µL de MNPs-URS (0.46 U de enzima ureasa), hipoclorito de sodio 0.5 % en medio básico (NaOH 0.1

mol/L) y salicilato 0.25 mol/L con nitroprusiato 0.025 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L), se realizó la reacción de detección de urea a 37 °C durante tres días consecutivos midiendo la absorbancia cada cierto tiempo en un lapso de 5 a 240 min por triplicado. Asimismo, se midió la señal del blanco de reacción por triplicado. Las señales obtenidas se compararon graficamente.

#### 5.4.9.2 Influencia de la temperatura sobre la reacción enzimática

Se realizó la medición de la absorbancia del blanco de reacción y de un estándar de urea de concentración 2.5 mg/dL diluida en SAF por triplicado empleando una temperatura de 37 °C y 60 °C bajo las siguientes condiciones: 8 µL de MNPs-URS (0.46 U de enzima), hipoclorito de sodio 0.5 % en medio básico (NaOH 0.1 mol/L), salicilato 0.25 mol/L con nitroprusiato (0.025 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L).

#### 5.4.9.3 Diseño de experimentos factorial completo 2<sup>3</sup> con 3 puntos centrales

Con la finalidad de aumentar la medida de absorbancia, se realizó un diseño de experimentos factorial completo 2<sup>3</sup> con 3 puntos centrales empleando una solución estándar de urea en SAF de concentración 3 mg/dL, manteniendo constante la concentración de salicilato a 0.25 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) y la temperatura a 37 °C. Se seleccionaron tres factores que pueden influir en la reacción enzimática y reacción de detección asignándoles un valor alto (1), bajo (-1) y medio (0), como se muestra en la Tabla 5-2. Con ayuda del programa *STATGRAPHICS* se construyó la matriz del diseño con todas las combinaciones posibles entre los factores seleccionados teniendo un total de 11 experimentos, para cada uno de ellos se midió la absorbancia del par blanco de reacción y producto. La resta de ambas absorbancias se empleó para el análisis de los resultados.

**Tabla 5-2.** Factores evaluados en el diseño de experimentos factorial completo 2<sup>3</sup> con 3 puntos centrales.

Factor	- 1	0	1
[Hipoclorito] % v/v	0.1	0.3	0.5
[Nitroprusiato] mol/L	0.025	0.038	0.050
Cant. Ureasa (volumen MNPs-URS)	0.230 U (4 µL)	0.345 U (6 µL)	0.460 U (8 µL)

#### 5.4.10 Construcción de la curva de calibración

La curva de calibración se construyó realizando las diluciones correspondientes de una solución madre de urea 10 mg/dL en SAF, abarcando concentraciones de 0.075 a 3 mg/dL. Cada uno de los estándares se ingresó al microdispositivo comenzando del más diluido al más

concentrada en flujo continuo bajo las condiciones de reacción establecidas (volumen de MNPs-URS = 8 µL (0.46 U); hipoclorito 0.1 % en medio básico (NaOH 0.1 mol/L); salicilato/Nitroprusiato 0.25/0.05 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L); caudal total 8 µL/min; temperatura 37 °C) y se recolectaron 5 µL del producto de reacción en la salida del microcanal con una punta de micropipeta midiendo inmediatamente su absorbancia a  $\lambda = 690$  nm, este procedimiento se realizó por triplicado. Asimismo, se midió la absorbancia del blanco de reacción hasta tener un total de 10 mediciones. Se calculó el promedio de la absorbancia del blanco de reacción y se restó este valor a la absorbancia registrada para cada estándar de urea, obteniendo así la absorbancia corregida que se empleó para la construcción del gráfico de absorbancia en función de la concentración de urea.

Se determinó el intervalo lineal, así como el valor del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) considerando el valor de la desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_0$ ) y el valor de la pendiente ( $b_1$ ) de acuerdo con las siguientes expresiones:<sup>187</sup>

$$LOD = \frac{3.3 \times S_0}{b_1} \quad \text{Ecuación 5-1}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_0}{b_1} \quad \text{Ecuación 5-2}$$

#### 5.4.11 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Se preparó un estándar de urea en SAF de 1.5 mg/dL por duplicado durante 7 días diferentes y bajo condiciones de reacción establecidas se midió su valor de absorbancia. Con los datos se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se calculó la repetibilidad y reproducibilidad de la metodología.

#### 5.4.12 Estudios de exactitud: porcentajes de recuperación

Los porcentajes de recuperación se realizaron empleando tanto una muestra de plasma como de orina fortificadas con 1 mg/dL de estándar de urea en SAF. Para ello, se realizaron las diluciones necesarias para que las muestras sin fortificar tuvieran una concentración de urea cercana a 0.5 mg/dL, posteriormente se adicionó 1 mg/dL de estándar de urea, tal que la concentración de la muestra fortificada fuera cercana a 1.5 mg/dL (parte central de la curva de calibración).

Se realizó cuantificación de ambas muestras (sin fortificar y fortificada) por sextuplicado en el microdispositivo bajo las condiciones de reacción establecidas y se registró el valor de absorbancia, a dicho valor se le restó el valor de absorbancia promedio del blanco de reacción. Empleando la curva de calibración previamente construida se determinaron las concentraciones reales de ambas soluciones y se calculó el % recuperación con base en la Ecuación 5-3.

$$\% \textit{Recuperación} = \frac{CM_F - CM_{SF}}{C} \quad \text{Ecuación 5-3}$$

En donde  $CM_F$  es la concentración de urea en la muestra fortificada,  $CM_{SF}$  es la concentración de urea en la muestra sin fortificar y  $C$  es la concentración adicionada de estándar de urea para realizar la fortificación, en este caso  $C = 1 \text{ mg/dL}$ .

#### 5.4.13 Comparación con una metodología en lote

Se empleó un método de cuantificación de urea en lote empleando microtubos, con el que se construyó una curva de calibración (la optimización de la curva de calibración en lote se muestra en el Anexo 4) como se muestra a continuación: (1) se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de URS de concentración 16.5 U/mL (1.65 U); (2) se incorporó el volumen necesario de un estándar de urea en SAF de 5 mg/dL para abarcar un intervalo de concentraciones de 0.013 a 0.35 mg/dL, en el caso del blanco de reacción se adicionó SAF; (3) la enzima y el sustrato se mezclaron agitando ligeramente el microtubo y se incubaron a 37 °C durante 5 min empleando un baño de agua; (4) se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de hipoclorito 0.5 % en medio básico (NaOH 0.1 mol/L) más 500  $\mu\text{L}$  de salicilato/Nitroprusiato 0.25/0.025 mol/L en medio básico (NaOH 0.1 mol/L); (5) se agregó el volumen necesario de agua destilada hasta completar 2 mL; (6) la mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 37 °C para permitir el desarrollo de color. Cada punto de la curva de calibración se construyó por triplicado y la medición de la absorbancia a  $\lambda = 690 \text{ nm}$  se realizó en una celda de cuarzo empleando un espectrofotómetro (Cary 1 UV-Vis spectrophotometer).

Con esta misma metodología en lote se realizó el estudio de precisión preparando un estándar de urea en SAF de 0.175 mg/dL por duplicado durante siete días registrando su valor de absorbancia, calculando la repetibilidad y reproducibilidad por medio de un ANOVA. Posteriormente, se determinaron los porcentajes de recobro empleando tanto una muestra de plasma como de orina para realizar las fortificaciones por sextuplicado.

#### 5.4.14 Cuantificación de muestras

Se realizó la cuantificación de urea en tres muestras de orina y tres muestras de plasma obtenidas en pares de un mismo paciente. Las muestras se diluyeron tomando el volumen necesario y llevando al aforo con SAF para que sus valores de absorbancia se encontraran dentro del intervalo central de la curva de calibración. Se ingresaron al microdispositivo bajo las condiciones de reacción establecidas para la cuantificación de urea por triplicado. A los valores de absorbancia registrados se les restó el valor de absorbancia promedio del blanco de reacción para obtener la absorbancia corregida, con la que se cuantificó la concentración de urea empleando la curva de calibración y considerando las diluciones realizadas.

Por último, las mismas muestras se cuantificaron en un mismo día utilizando el método en lote con la finalidad de poder tener una comparación de resultados entre ambos métodos.

#### 5.4.15 Limpieza de los microdispositivos

Al término del ensayo, se retiró la torre de imanes de la parte superior del microdispositivo y se realizó el lavado de los microcanales empleando agua destilada en cada una de las entradas con un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  (caudal total 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) durante al menos 10 min. De esta manera todas las MNPs-URS fueron arrastradas hacia fuera del microdispositivo. Posteriormente, para asegurar la salida de todas las nanopartículas magnéticas de los microcanales, el microdispositivo se sumergió en agua destilada y se colocó en baño de ultrasonido durante 15 min. Por último, los microcanales se secaron con aire a presión y se guardaron para su posterior uso.

### 5.5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

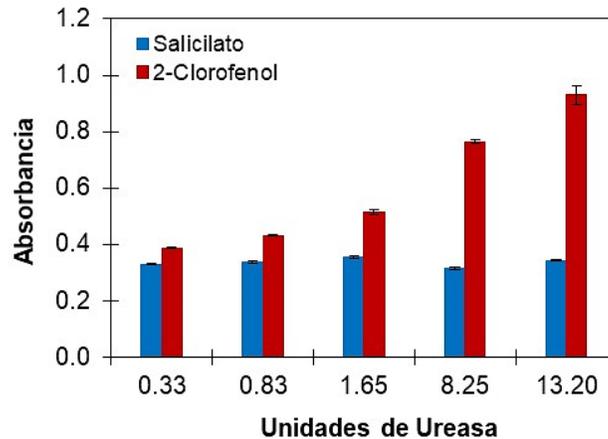
#### 5.5.1 Experimentos iniciales

Los experimentos iniciales no sólo ayudaron a tener un panorama del funcionamiento de la reacción, sino también sirvieron de guía para el desarrollo y establecimiento de las condiciones de la metodología de cuantificación en lote.

##### 5.5.1.1 Comparación entre el uso de 2-clorofenol y salicilato

La Figura 5-2 muestra la comparación de la medida de absorbancia registrada al modificar el reactivo derivado de fenol en la reacción de Berthelot. Como se observa, el uso de 2-clorofenol favorece la reacción presentando señales analíticas mayores que aumentan al incrementar las unidades de URS empleadas, mientras que el salicilato no sólo presenta valores de absorbancia

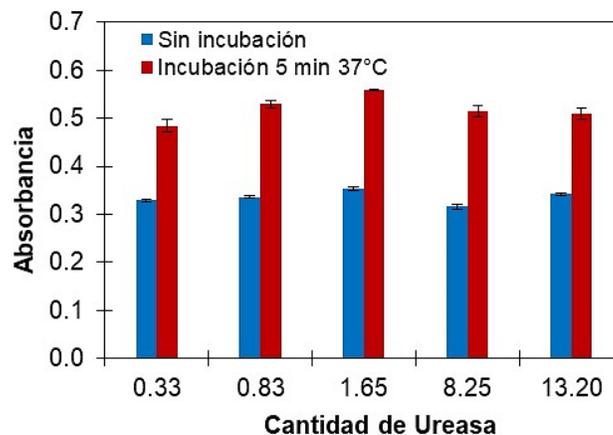
menores, sino también éstos se mantienen constantes aun cuando se aumenta la cantidad de URS. Pese a este comportamiento, se decidió trabajar con salicilato debido a que es menos tóxico; los siguientes experimentos se enfocaron en mejorar la señal analítica registrada al emplear salicilato.



**Figura 5-2.** Comparación de la medida de absorbancia para un estándar de urea de 15 mg/dL en función de la cantidad de enzima ureasa al modificar el reactivo 2-clorofenol y salicilato 0.25 mol/L (n = 3).  $\lambda = 650$  nm.

### 5.5.1.2 Estudio del tiempo de incubación de la reacción urea-ureasa

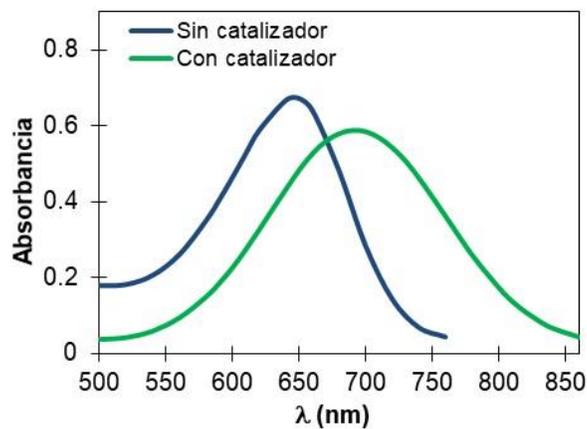
Los resultados obtenidos mostraron un incremento de alrededor de 0.2 unidades de absorbancia al incorporar un paso extra de incubación de reacción enzimática a 37 °C durante 5 min (Figura 5-3), mejorando así la sensibilidad el método de Berthelot al emplear salicilato. Demostrando ser este un paso clave a considerar cuando se realice la detección en el microdispositivo.



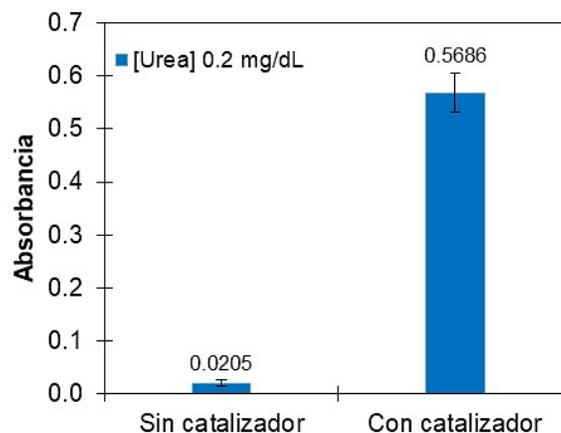
**Figura 5-3.** Medidas de absorbancia para un estándar de urea de 15 mg/dL en función de la cantidad de enzima ureasa con y sin incubar la reacción enzimática empleando salicilato 0.25 mol/L (n = 3).  $\lambda = 650$  nm.

### 5.5.1.3 Adición del catalizador nitroprusiato de sodio

El color del producto de reacción obtenido al emplear como catalizador nitroprusiato de sodio fue diferente al del indofenol formado sin catalizador, ya que este último presentaba una coloración azul, mientras que el primero un color más verdoso. Al realizar los espectros de absorción de ambos productos (Figura 5-4) se observa un ligero desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción cuando la reacción de Berthelot es catalizada. De esta manera se seleccionó 690 nm como longitud de onda para la medición del producto de reacción al emplear nitroprusiato como catalizador. Asimismo, se observó un aumento de casi 28 veces en la señal analítica cuando se adiciona nitroprusiato, tal como se muestra en la Figura 5-5, por lo que el uso de un catalizador es indispensable para mejorar la sensibilidad de la metodología.



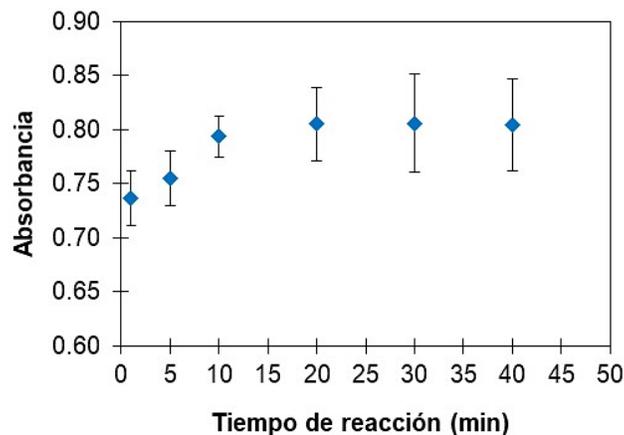
**Figura 5-4.** Espectros de absorción para el producto de reacción de la reacción de Berthelot empleando una solución de salicilato 0.25 mol/L con y sin catalizador nitroprusiato de sodio 0.025 mol/L. Estándar de urea de 15 mg/dL (sin catalizador) y 0.2 mg/dL (con catalizador), 1.65 U de URS.



**Figura 5-5.** Medidas de absorbancia para un estándar de urea de 0.2 mg/dL empleando salicilato 0.25 mol/L con y sin catalizador nitroprusiato de sodio 0.025 mol/L con 1.65 U de URS (n = 3).  $\lambda = 650$  nm sin catalizador y  $\lambda = 690$  nm con catalizador.

#### 5.5.1.4 Estudio del tiempo de incubación de la reacción de Berthelot

La Figura 5-6 muestra los valores de absorbancia registrados al modificar el tiempo de incubación de la reacción de Berthelot a 37 °C desde 1 min hasta 40 min. Como se observa, los valores de absorbancia registrados se incrementaron considerablemente durante los primeros 10 min de reacción para luego mantenerse prácticamente constantes, sin embargo, al emplear tiempo de reacción mayor a 10 min la variación de las señales se incrementa. Por lo tanto, es suficiente dejar un tiempo de incubación de 10 min durante la reacción de formación del indofenol y desarrollo de color.



**Figura 5-6.** Medidas de absorbancia para un estándar de urea de 0.5 mg/dL empleando salicilato 0.25 mol/L con catalizador nitroprusiato de sodio 0.025 mol/L en función del tiempo ( $n = 3$ ).  $\lambda = 690$  nm

#### 5.5.2 Conjugación de ureasa (URS) con las nanopartículas magnéticas (MNPs)

El fundamento de la reacción de conjugación para la formación de MNPs-URS empleando el kit LinkAmine MAGNETIC es el mismo que el que se muestra en el Capítulo II sección 2.5.3 y se ejemplifica en la Figura 2-8.

La Figura 5-7 corresponde a la curva de calibración para la cuantificación de ureasa (URS) por el ensayo de Lowry. El comportamiento observado se ajustó a una función de segundo grado ( $R^2=0.9987$ ) con un intervalo de cuantificación de 50 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Tabla 5-3 se muestra la concentración de la solución de ureasa al inicio y al final del proceso de conjugación con las nanopartículas magnéticas. La diferencia entre ambas concentraciones representa la concentración de URS conjugada con la nanopartícula. Posteriormente, se determinó la cantidad de URS conjugada por mg de MNPs considerando que la concentración de las nanopartículas magnéticas es 10 mg/mL, de acuerdo con la Ecuación 5-4.

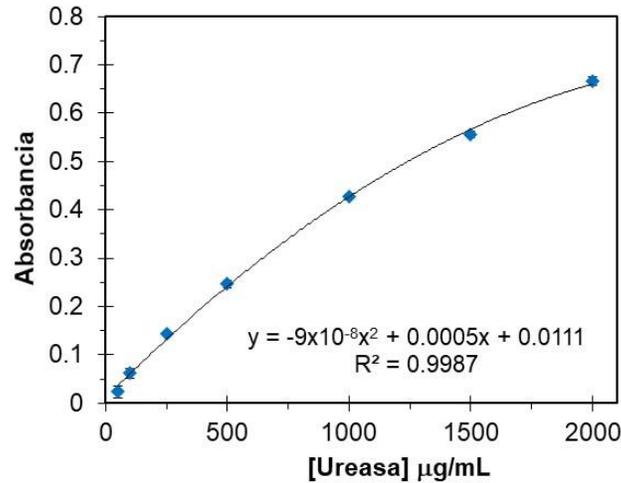


Figura 5-7 Curva de calibración para la cuantificación de ureasa (URS) por medio del ensayo de Lowry. Intervalo lineal 50 a 2000 µg/mL (n = 3).

Tabla 5-3. Resultados para la cuantificación de la concentración de URS conjugada con las MNPs (n = 3).

Muestra	[URS] µg/mL ± S	[URS conjugada] µg/mL ± S
Inicio	6290.67 ± 457.95	
Final	4865.80 ± 165.16	1424.87 ± 421.60

$$\frac{[URS \text{ conjugada}] \mu\text{g/mL}}{[MNPs] \text{ mg/mL}} = \frac{1424.87 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} = 142.49 \mu\text{g URS/mg MNPs} \quad \text{Ecuación 5-4}$$

Posteriormente se determinaron las unidades de enzima por mg de MNPs considerando que la enzima contiene 40 150 U/g, por lo tanto, se tienen 142.49 µg/mg MNPs = 5.72 U/mg MNPs.

### 5.5.3 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El comportamiento observado al analizar las imágenes es muy similar al descrito para la conjugación de MNPs-CCP (Capítulo II sección 2.5.5). Las nanopartículas magnéticas que se encontraban sin conjugación con ureasa (Figura 5-8(a)) poseen un menor tamaño (aproximadamente 10 nm) y se observan bien definidas, lo que significa que es fácil distinguirlas entre sí. Las MNPs conjugadas con URS mostraron la encapsulación de las nanopartículas, formando una especie de vesículas donde la enzima se unió a la superficie (Figura 5-8(b)), lo que provocó un aumento en su tamaño hasta aproximadamente 200 nm, corroborándose así la correcta conjugación de ureasa con las MNPs para la formación del MNPs-URS.

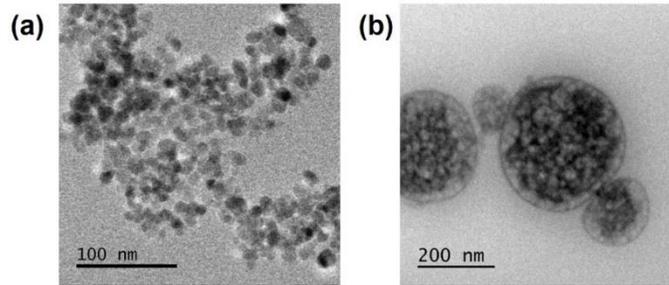


Figura 5-8. Imágenes TEM de las nanopartículas magnéticas. (a) MNPs sin conjugación. (b) MNPs-URS.

#### 5.5.4 Diseño y caracterización de los microdispositivos

El microdispositivo de PDMS construido se muestra en la Figura 5-9(a). El diseño de los microcanales se efectuó considerando dos partes principales (Figura 5-9(b)): (1) zona de reacción enzimática, donde se introdujeron las MNPs-URS y se retuvieron dentro de los microcanales empleando imanes, para la posterior adición del estándar de urea diluido en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 mol/L pH 7.0 empleando agua destilada como acarreador. Esta zona abarca hasta antes de la entrada de la solución de hipoclorito de sodio; y (2) zona de reacción de detección, donde se incorporaron la solución de hipoclorito y salicilato/nitroprusiato en medio alcalino para el desarrollo del producto de reacción colorido que es recolectado para su posterior detección espectrofotométrica.

Las medidas de ancho y profundidad de los microcanales fueron  $176 \pm 6 \mu\text{m}$  y  $92 \pm 6 \mu\text{m}$ , respectivamente (en la Figura 5-9(c)) se aprecia una imagen de la sección transversal de los microcanales). Con una longitud de microcanal de zona de reacción enzimática y zona de reacción de detección de 26.1 cm para cada una, que equivale a un volumen aproximado de  $4.2 \mu\text{L}$ . De tal manera que la longitud total de los microcanales fue 52.2 cm con un volumen total de  $8.4 \mu\text{L}$ .

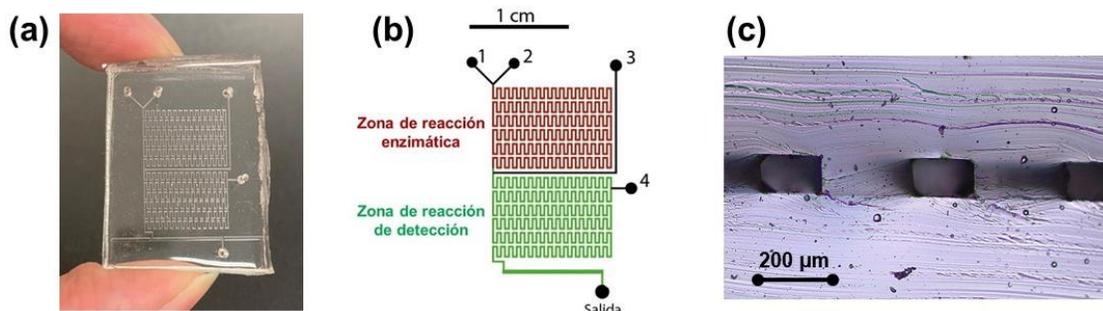
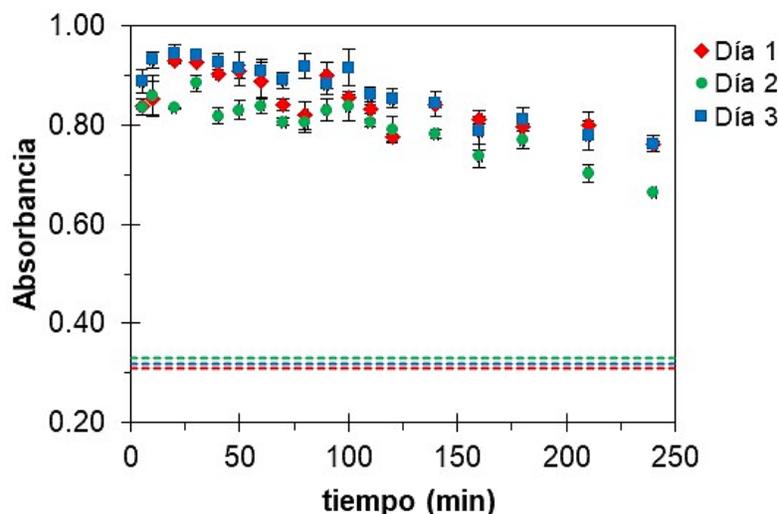


Figura 5-9. (a) Microdispositivo de PDMS fabricado. (b) Diseño del microdispositivos fabricado para la cuantificación de urea por medio de la reacción modificada de Berthelot. Se identifican dos zonas principales: zona de reacción enzimática y de reacción de detección. (c) Vista de la sección transversal de los microcanales ancho =  $176 \pm 6 \mu\text{m}$ , profundidad =  $92 \pm 6 \mu\text{m}$ , volumen total  $8.4 \mu\text{L}$ .

## 5.5.5 Establecimiento de las condiciones de reacción

### 5.5.5.1 Estudio del tiempo de vida de la enzima

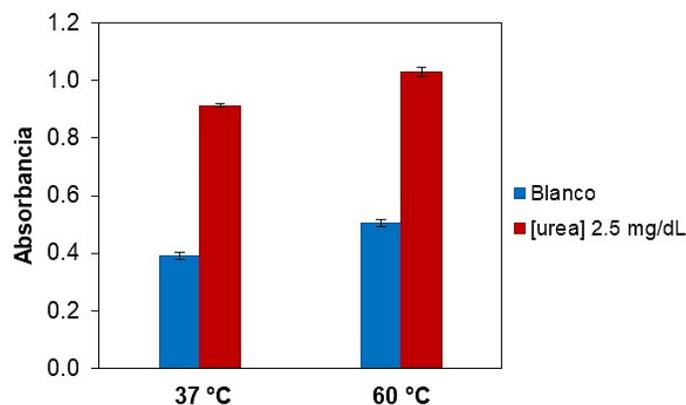
La Figura 5-10 muestra los promedios de absorbancia al realizar la cuantificación de un estándar de urea de 2.5 mg/dL en función del tiempo por un periodo de cuatro horas durante tres días. Como se observa, la absorbancia se mantuvo prácticamente constante hasta un tiempo de 100 min (promedio de los tres días:  $0.877 \pm 0.043$ ) después de este tiempo los valores de absorbancia comenzaron a disminuir paulatinamente (promedio de los tres días:  $0.730 \pm 0.057$ ) perdiendo en promedio un 16.8 % de la señal analítica inicial. Por lo tanto, la actividad de la enzima disminuye en función del tiempo y para los estudios posteriores sólo se consideró un tiempo de análisis máximo de 100 min (1 h 40 min), después de dicho tiempo las MNPs-URS retenidas dentro del microcanal debían ser remplazadas por nuevas para evitar variaciones en las señales. Es importante recalcar que dentro de este intervalo de tiempo es posible realizar 60 mediciones de una sola muestra en flujo continuo (considerando que el tiempo de recolección de muestra es de 40 s y la detección tarda aproximadamente 60 s). Si se desean analizar diferentes muestras hay que considerar que se requiere un tiempo extra de 4 min (240 s) entre cada cambio de muestra para la limpieza de los microcanales, por lo que durante 100 min es posible analizar un aproximado de 11 muestras por triplicado empleando únicamente 8  $\mu$ L de MNPs-URS que equivalen a 0.46 U de enzima (tiempo de análisis por muestra por triplicado 9 min (540 s)).



**Figura 5-10.** Medidas de absorbancia para un estándar de urea en SAF de 2.5 mg/dL analizado en flujo continuo en un periodo de tiempo de 5 a 240 min empleando 8  $\mu$ L de MNPs-URS (0.46 U de enzima) en tres días diferentes. La línea punteada corresponde al promedio de la medición del blanco de reacción ( $n = 3$ ).

### 5.5.5.2 Influencia de la temperatura sobre la reacción enzimática

Los resultados mostraron un ligero aumento en la señal analítica al aumentar la temperatura de reacción a 60 °C tanto para la medida del blanco de reacción ( $0.503 \pm 0.012$ ) como para el estándar de urea en SAF de concentración 2.5 mg/dL ( $1.029 \pm 0.016$ ), en comparación con las medidas de absorbancia registradas para el blanco ( $0.391 \pm 0.013$ ) y estándar de urea ( $0.912 \pm 0.006$ ) a 37 °C como se muestra en la Figura 5-11. Sin embargo, este aumento no es significativo, ya que la relación entre la señal del blanco de reacción y el estándar es muy similar, 2.05 a 60 °C y 2.33 a 37 °C por lo que no se tiene un aumento en la sensibilidad del método. Por lo que se seleccionó la temperatura de 37 °C para realizar los posteriores análisis.



**Figura 5-11.** Comparación de las medidas de absorbancia para un estándar de urea en SAF de 2.5 mg/dL y blanco de reacción a 37 °C y 60 °C (n = 3).

### 5.5.5.3 Diseño de experimentos factorial completo 2<sup>3</sup> con 3 puntos centrales

Los resultados de los 11 experimentos se localizan en la Tabla 5-4. Con dichos datos se realizó el tratamiento estadístico con el programa *STATGRAPHICS* buscando maximizar la respuesta analítica (A). Con el diagrama de Pareto estandarizado se determinó, con un nivel de significancia de 95 %, qué factores influyen de manera positiva o negativa sobre la respuesta. Aquellos factores que no afectan significativamente se localizan por debajo de la línea perpendicular a las barras, mientras que aquellos que sobrepasan dicho límite son considerados estadísticamente significativos (Figura 5-12).

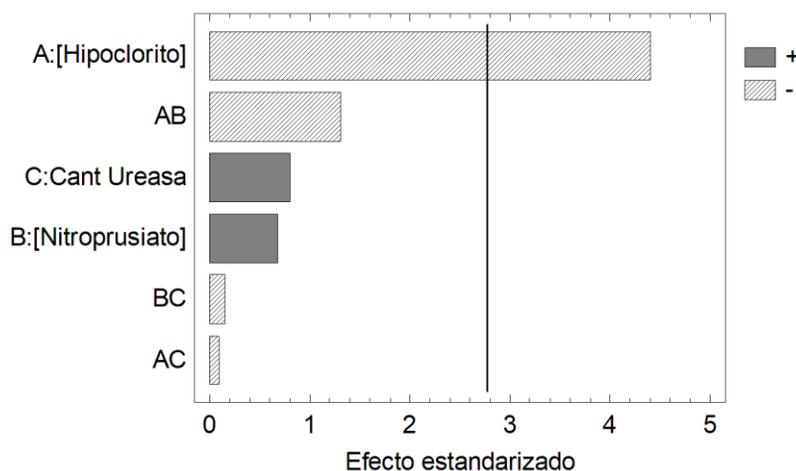
En este caso, el único factor que afectó significativamente la señal analítica fue la concentración del estándar de hipoclorito de sodio, tal que mientras mayor fue su concentración, menor fue la absorbancia, es decir tuvo un efecto negativo sobre la respuesta. En cuanto a la cantidad de enzima y la concentración del catalizador nitroprusiato, vemos que, aunque no son

estadísticamente significativos, tuvieron un efecto positivo sobre la señal analítica, de tal manera que al aumentar sus valores aumentó también la absorbancia. El comportamiento del cambio en la señal analítica en función de la variación de los parámetros estudiados puede apreciarse visualmente en la Figura 5-13, en donde se muestra un diagrama de cubo con la absorbancia esperada dependiendo de la modificación de los parámetros. Con base en lo anterior se seleccionaron como condiciones de reacción: hipoclorito 0.1 %, nitroprusiato 0.05 mol/L y cantidad de ureasa = 0.46 U (lo que equivale a tomar 8 µL de la solución de MNPs-URS), que se suman a las condiciones previamente seleccionadas salicilato 0.25 mol/L y temperatura de reacción de 37 °C, con las que se predice un valor máximo de absorbancia de 0.960.

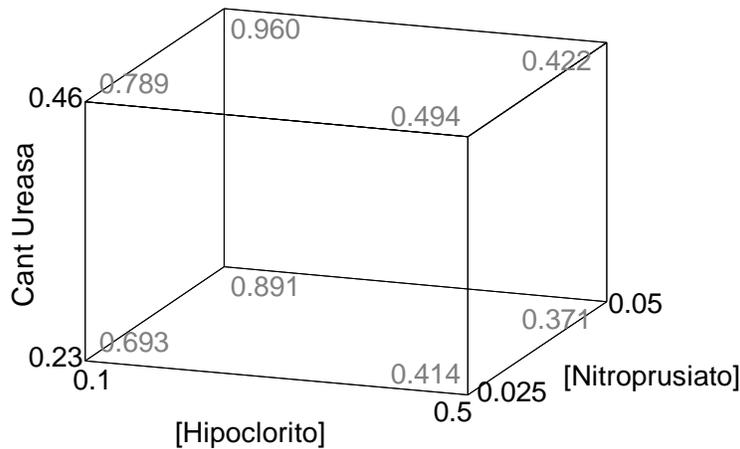
**Tabla 5-4.** Resultados del diseño de experimentos factorial completo  $2^3$  con 3 puntos centrales

No. Exp.	[Hipoclorito] % v/v	[Nitroprusiato] mol/L	Cant. Ureasa U	A*
1	0.1	0.025	0.23	0.726
2	0.3	0.0375	0.345	0.541
3	0.5	0.050	0.46	0.414
4	0.5	0.025	0.46	0.584
5	0.1	0.050	0.46	0.900
6	0.1	0.050	0.23	0.730
7	0.1	0.025	0.46	0.728
8	0.3	0.0375	0.345	0.508
9	0.5	0.0250	0.23	0.406
10	0.3	0.0375	0.345	0.514
11	0.5	0.050	0.23	0.461

A\* corresponde al valor de la absorbancia corregida, al restar el blanco de reacción.



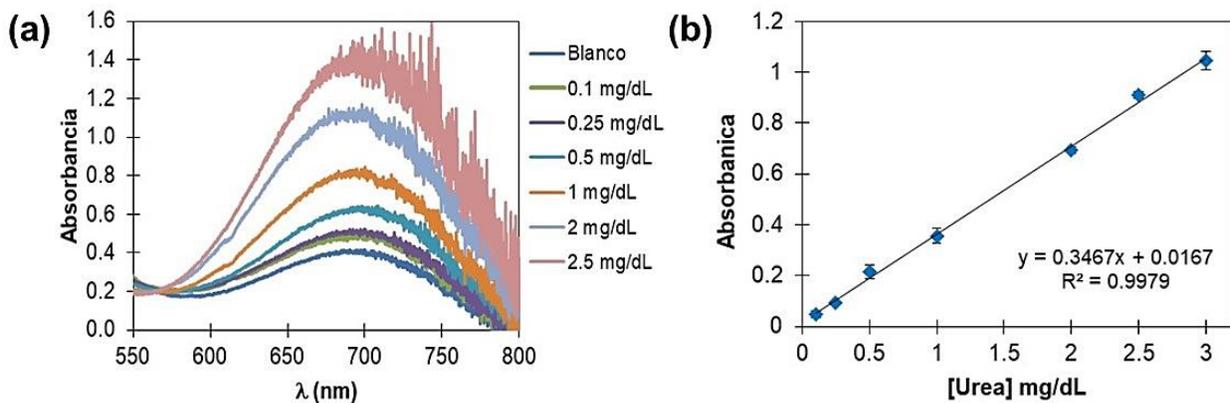
**Figura 5-12.** Diagrama de Pareto estandarizado del diseño de experimentos factorial completo  $2^3$  con 3 puntos centrales para la optimización de la cuantificación de urea en el microdispositivo.



**Figura 5-13.** Diagrama de cubo obtenido a partir del diseño de experimentos factorial completo  $2^3$  con 3 puntos centrales para la optimización de la cuantificación de urea en el microdispositivo. [Salicilato] = 0.25 mol/L a una temperatura de 37 °C.

### 5.5.6 Construcción de la curva de calibración

El ejemplo de las señales analíticas obtenidas para la construcción la curva de calibración tanto del blanco de reacción como de los estándares de urea en SAF se muestran en la Figura 5-14(a), en donde se puede apreciar que los espectros de absorción poseen un máximo de absorbancia a  $\lambda = 690$  nm. El intervalo lineal de la curva de calibración abarcó concentraciones de 0.12 a 3 mg/dL (Figura 5-14(b)). Los valores de LOD y LOQ calculados fueron 0.04 y 0.12 mg/dL, respectivamente.



**Figura 5-14.** Construcción de la curva de calibración para la cuantificación de urea. (a) Ejemplo de las señales analíticas registradas (espectro de absorción) del blanco de reacción y del producto de reacción a diferente concentración de urea en SAF. B) Curva de calibración construida, intervalo lineal de 0.12 a 3 mg/dL, LOD = 0.04 mg/dL, LOQ = 0.12 mg/dL (n = 3).

### 5.5.7 Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Se evaluó la repetibilidad, es decir, la variación de la señal analítica de un estándar de urea obtenida por el mismo analista, instrumento y día, así como la variación entre siete días diferentes, conocida como reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia). Los resultados de la cuantificación por duplicad se localizan en la Tabla 5-5.

**Tabla 5-5.** Resultados para la medición de la precisión del método analítico al medir por duplicado la absorbancia de un estándar de urea en SAF de 1.5 mg/dL durante siete días.

Día	$A_{\lambda=690\text{ nm}} \pm S$		Promedio
	Medición 1	Medición 2	
1	0.593	0.600	0.597
2	0.559	0.545	0.552
3	0.612	0.611	0.612
4	0.600	0.599	0.600
5	0.551	0.557	0.554
6	0.613	0.616	0.615
7	0.567	0.577	0.572
<b>PROMEDIO TOTAL</b>			0.586

Con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor se obtuvo la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y el cuadrado medio (CM) de la variación de las absorbancias entre días y dentro de días (Tabla 5-6) que serán de utilidad para el cálculo de la precisión.

**Tabla 5-6.** Análisis de varianza de un factor para la determinación de la precisión de la metodología.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM
Entre días	0.008260857	6	0.00137681
Dentro de días	0.000196	7	$2.8 \times 10^{-5}$
Total	0.008456857	13	

Aplicando las Ecuaciones 2-2 a 2-6 (Capítulo II, sección 2.5.7) la repetibilidad obtenida fue 0.90 %, mientras que la reproducibilidad fue de 4.52 %.

### 5.5.8 Estudios de exactitud: porcentajes de recuperación

La medición de los porcentajes de recuperación se empleó como una forma de evaluar la exactitud del método analítico al comparar la cantidad de analito teóricamente adicionado a las muestras de orina y plasma con la cantidad recuperada experimentalmente.

En las Tablas 5-7 y 5-8 se muestran los resultados obtenidos para el cálculo de los porcentajes de recuperación empleando las muestras de orina y plasma, respectivamente. Los porcentajes que se determinaron fueron de  $101.48 \pm 1.69$  % utilizando la muestra de orina y de  $100.81 \pm 1.19$  % para la muestra de plasma. Lo que demuestra que la matriz de ambas muestras no interfiere en la cuantificación, teniendo resultados con alta exactitud al emplear el método desarrollado. Además, los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del intervalo permitido para método espectrofotométricos (97 – 103 %).<sup>187</sup>

**Tabla 5-7.** Resultados registrados para la determinación de los porcentajes de recuperación empleando la muestra de orina y adicionando 1 mg/dL de estándar de urea en SAF.

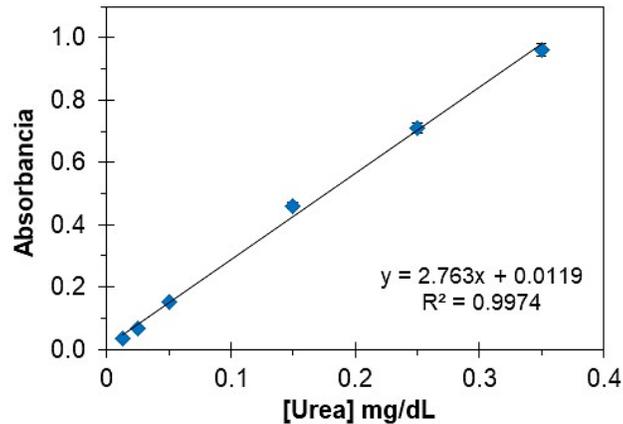
Medición	Muestra sin fortificar		Muestra fortificada		Recuperación	% Recuperación
	A $\lambda=690$ nm	[Urea] mg/dL	A $\lambda=690$ nm	[Urea] mg/dL	[Urea] mg/dL	
1	0.200	0.529	0.548	1.532	1.004	100.37
2	0.204	0.540	0.558	1.561	1.021	102.11
3	0.199	0.526	0.541	1.512	0.986	98.64
4	0.193	0.509	0.550	1.538	1.030	102.97
5	0.190	0.500	0.543	1.518	1.018	101.82
6	0.196	0.517	0.553	1.547	1.030	102.97
<b>Promedio</b>	<b>0.197</b>	<b>0.520</b>	<b>0.549</b>	<b>1.535</b>	<b>1.015</b>	<b>101.48</b>
<b>S</b>	<b>0.005</b>	<b>0.015</b>	<b>0.006</b>	<b>0.018</b>	<b>0.017</b>	<b>1.69</b>

**Tabla 5-8.** Resultados registrados para la determinación de los % recuperación empleando la muestra de plasma y adicionando 1 mg/dL de estándar de urea en SAF.

Medición	Muestra sin fortificar		Muestra fortificada		Recuperación	% Recuperación
	A $\lambda=690$ nm	[Urea] mg/dL	A $\lambda=690$ nm	[Urea] mg/dL	[Urea] mg/dL	
1	0.310	0.85	0.658	1.85	1.00	100.37
2	0.305	0.83	0.661	1.86	1.03	102.68
3	0.296	0.81	0.643	1.81	1.00	100.09
4	0.310	0.85	0.655	1.84	1.00	99.51
5	0.309	0.84	0.657	1.85	1.00	100.37
6	0.295	0.80	0.648	1.82	1.02	101.82
<b>Promedio</b>	<b>0.304</b>	<b>0.8292</b>	<b>0.6537</b>	<b>1.8372</b>	<b>1.0081</b>	<b>100.81</b>
<b>S</b>	<b>0.007</b>	<b>0.0201</b>	<b>0.0068</b>	<b>0.0196</b>	<b>0.0119</b>	<b>1.19</b>

### 5.5.9 Comparación de metodologías: Microdispositivo vs. lote

La curva de calibración construida a través de la metodología en lote se muestra en la Figura 5-15. Ésta presentó un intervalo lineal de concentración de urea diluida en SAF de 0.013 a 0.35 mg/dL ( $R^2 = 0.9974$ ) con LOD = 0.006 mg/dL y LOQ = 0.020 mg/dL.



**Figura 5-15.** Curva de calibración construida para la cuantificación de urea por el método el lote, intervalo lineal de 0.013 a 0.35 mg/dL, LOD = 0.006 mg/dL, LOQ = 0.02 mg/dL (n = 3).

Comparando los parámetros de la curva de calibración construida empleando el microdispositivo con la curva de calibración en lote (Tabla 5-9), se observa que el método en lote posee una mayor sensibilidad presentando una pendiente aproximadamente ocho veces mayor que la pendiente de la curva de calibración con el microdispositivo (2.76 vs. 0.34); lo que se traduce en la cuantificación de concentraciones de urea menores para el método en lote (menor LOD y LOQ). Sin embargo, esto no se considera como una desventaja de la metodología desarrollada, ya que, pese a tener menor sensibilidad, el intervalo de cuantificación empleando el microdispositivo es el adecuado para cuantificar urea en muestras de orina y plasma.

En cuanto a la exactitud de ambas metodologías, se observan porcentajes de repetibilidad y reproducibilidad muy cercanos entre sí, únicamente la reproducibilidad tiende a ser ligeramente mayor al emplear el microdispositivo debido posiblemente al error implicado en la inmovilización de las MNPs-URS dentro del microcanal durante diferentes días y al manejo de volúmenes mucho menores. Pese a lo anterior, el porcentaje de reproducibilidad obtenido para el microdispositivo es bastante bajo y aceptable si se considera que se trata de un método miniaturizado. Asimismo, los porcentajes de recuperación entre ambas metodologías fueron prácticamente iguales estadísticamente.

**Tabla 5-9.** Comparación de las metodologías para la cuantificación de urea.

Parámetro	Microdispositivo	Lote
Intervalo lineal	0.12 – 3 mg/dL	0.013 – 0.35 mg/dL
Ecuación lineal	$y = 0.3467x + 0.0167$ $R^2 = 0.9979$	$y = 2.763x + 0.00119$ $R^2 = 0.9974$
LOD	0.04 mg/dL	0.006 mg/dL
LOQ	0.12 mg/dL	0.02 mg/dL
Repetibilidad	0.90 %	0.88 %
Reproducibilidad	4.52 %	2.83 %
% Recuperación	Muestra plasma: $101.81 \pm 1.19$ % Muestra orina: $101.48 \pm 1.69$ %	Muestra plasma: $102.23 \pm 2.37$ % Muestra orina: $101.73 \pm 1.94$ %

### 5.5.10 Cuantificación de muestras

La concentración de urea en las tres muestras de plasma y orina empleando tanto el microdispositivo desarrollado en este trabajo como el método en lote con microtubos se muestra en la Tabla 5-10. Dado que la concentración típica de urea en plasma oscila entre 15 a 45 mg/dL, mientras que en orina puede encontrarse hasta 50 veces más concentrada de lo que se encuentra en plasma (750 – 2250 mg/dL),<sup>111</sup> los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores normales para este análisis clínico. Por lo que los pacientes, cuyas muestras fueron analizadas, no presentan ningún tipo de complicación renal o hepática.

**Tabla 5-10.** Comparación de la cuantificación de urea en muestras de plasma y orina empleando el método de cuantificación en microdispositivo y en lote.

Muestra	[Urea] mg/dL	
	En microdispositivo	En lote
Plasma 1	$23.14 \pm 0.89$	$22.57 \pm 0.69$
Plasma 2	$19.08 \pm 0.68$	$19.10 \pm 0.58$
Plasma 3	$20.36 \pm 0.79$	$19.96 \pm 0.62$
Orina 1	$1489.92 \pm 71.56$	$1453.91 \pm 56.66$
Orina 2	$870.73 \pm 42.12$	$845.44 \pm 33.12$
Orina 3	$1735.55 \pm 82.60$	$1705.18 \pm 69.20$

## 5.6 CONCLUSIONES

Se diseñó, caracterizó y evaluó un microdispositivo reutilizable de PDMS para la cuantificación de urea con detección espectrofotométrica empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con la enzima ureasa. La reacción se llevó a cabo en flujo continuo con un promedio de análisis por muestra por triplicado de 9 min empleando tan sólo 8  $\mu\text{L}$  de MNPs-URS (0.46 U de enzima) con un tiempo de vida de la enzima conjugada de 100 min. La curva de calibración de urea en SAF tuvo un intervalo lineal de 0.12 a 3 mg/dL, con límite de detección de 0.04 mg/dL y de cuantificación de 0.12 mg/dL. Se evaluó la precisión de la metodología en términos de reproducibilidad y repetibilidad, obteniendo como resultado 0.90 % y 4.52 %, respectivamente. Mientras que los porcentajes de recuperación tuvieron valores cercanos al 100 %, corroborando la exactitud del método. Se analizaron muestras de orina plasma, cuya cuantificación se encuentra dentro de los valores normales de cuantificación. La metodología desarrollada se comparó con una metodología en lote presentando resultados similares, sin embargo, el microdispositivo tiene la ventaja de sólo requerir 1.33  $\mu\text{L}$  de muestra y reactivos por análisis con un tiempo de 40 s, mejorando las características de medición de otros microdispositivos desarrollados con una tasa de análisis de 36 mediciones por hora.

**CONCLUSIONES GLOBALES**

En este trabajo se demostró el potencial que los dispositivos de microfluídica poseen para su uso en el área de diagnóstico clínico, logrando realizar la separación de plasma sanguíneo con dilución en el mismo microdispositivo, así como la cuantificación de algunos biomarcadores relevantes como anti-CCP para el diagnóstico diferencial de AR y urea para la valoración de una falla renal o hepática. En general, los cuatro microdispositivos fabricados y estudiados demostraron tener ventajas frente a métodos convencionales de análisis, las cuales están estrictamente relacionadas con las características que los hacen tan llamativos, como lo es el consumo mínimo de reactivos y muestras, integración de pasos múltiples, así como cortos tiempos de análisis. En la Tabla CG, se resumen las principales ventajas y desventajas encontradas para cada uno de los microdispositivos.

**Tabla CG.** Principales ventajas y desventajas para los microdispositivos fabricados y estudiados.

Propósito del microdispositivo	Ventajas	Desventajas
<b>Cuantificación de anti-CCP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menor volumen de muestras y reactivos</li> <li>Menor tiempo de análisis</li> <li>Excelente precisión</li> <li>Menor LOD</li> <li>Diseño sencillo</li> <li>Cuantificación equiparable con un método convencional</li> <li>Reutilizables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Puede ser complicado acostumbrarse a la manipulación en microescala.</li> <li>Variación en los resultados si las MNPs-CCP no son correctamente resuspendidas antes del análisis</li> </ul>
<b>Dilución y separación de plasma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dilución incorporada dentro del mismo microdispositivo</li> <li>Menor manipulación de la muestra</li> <li>Alta purea de separación</li> <li>Eficiencia de separación adecuada para trabajar con inmunoensayos en microdispositivos</li> <li>Caudal de separación de 25 a 100 <math>\mu\text{L}/\text{min}</math></li> <li>Reutilizables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Limitado a análisis que requieran una dilución de plasma de al menos 1:100 v/v</li> </ul>
<b>Detección de H5-HA VIA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta sensibilidad y selectividad</li> <li>Menor tiempo de análisis</li> <li>Bajo consumo de reactivos</li> <li>Una vez construida la inmuno-pared es estable por 3 meses en refrigeración a 4 °C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fragilidad de la inmuno-pared, puede deformarse al realizar lavados bruscos.</li> <li>No son reutilizables</li> </ul>
<b>Cuantificación de urea</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo de análisis equiparable al del método en lote, pero empleando tan sólo 1.33 <math>\mu\text{L}</math> de muestras/reactivos.</li> <li>Fácil manipulación</li> <li>Excelente precisión y exactitud</li> <li>Con tal sólo 8 <math>\mu\text{L}</math> de MNPs-URS (0.46 U de enzima) se pueden realizar análisis durante 100 min.</li> <li>Reutilizables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Variación en los resultados si las MNPs-URS no son correctamente resuspendidas e inmovilizadas</li> <li>Las MNPs-URS pueden desplazarse dentro del microcanal si se emplean caudales más altos a 8 <math>\mu\text{L}/\text{min}</math></li> </ul>

## REFERENCIAS

1. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
2. MICROCHEM. SU-8 3000 Permanent Epoxy Negative Photoresist. *Product Datasheet* <https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-8-3000-Data-Sheet.pdf>.
3. Zaouk, R., Park, B. Y. & Madou, M. J. Fabrication of polydimethylsiloxane microfluidics using SU-8 molds. *Methods Mol. Biol.* **321**, 17–21 (2006).
4. Xia, Y. & Whitesides, G. M. Soft Lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 153–184 (1998).
5. Ren, K., Zhou, J. & Wu, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Acc. Chem. Res.* **46**, 2396–2406 (2013).
6. Haeberle, S. & Zengerle, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* **7**, 1094–1110 (2007).
7. Eicher, D. & Merten, C. A. Microfluidic devices for diagnostic applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**, 505–519 (2011).
8. Lei, K. F. Microfluidic Systems for Diagnostic Applications: A Review. *J. Lab. Autom.* **17**, 330–347 (2012).
9. Yager, P. *et al.* Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* **442**, 412–418 (2006).
10. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181–189 (2014).
11. Coltro, T., Cheng, C., Carrilho, E. & Jesus, D. P. De. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. *Electrophoresis* **35**, 2309–2324 (2014).
12. Foudeh, A. M., Fatanat Didar, T., Veres, T. & Tabrizian, M. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* **12**, 3249–3266 (2012).
13. Han, K. N., Li, C. A. & Seong, G. H. Microfluidic Chips for Immunoassays. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **6**, 119–141 (2013).
14. Lin, C. *et al.* Microfluidic Immunoassays. *J. Lab. Autom.* **15**, 253–274 (2010).
15. Kasama, T. *et al.* Rapid, highly sensitive, and simultaneous detection of staphylococcal enterotoxins in milk by using immuno-pillar devices. *Anal. Methods* **7**, 5092–5095 (2015).
16. Chávez-Ramos, K. *et al.* Rapid, Sensitive, and Selective Detection of H5 Hemagglutinin from Avian Influenza Virus Using an Immunowall Device. *ACS Omega* **4**, 16683–16688 (2019).
17. Nishiyama, K. *et al.* Ultrasensitive detection of disease biomarkers using an immuno-wall device with enzymatic amplification. *Analyst* **144**, 4589–4595 (2019).
18. Talha, J. *et al.* Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *Trends Anal. Chem.* **79**, 344–362 (2016).
19. Chávez-Ramos, K. & Cañizares-Macías, M. del P. Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection. *Talanta* **224**, 121801 (2021).
20. Toner, M. & Irimia, D. Blood-on-a-chip. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **7**, 77–103 (2005).
21. Kersaudy-Kerhoas, M. & Sollier, E. Micro-scale blood plasma separation: from acoustophoresis to egg-beaters. *Lab Chip* **13**, 3323–3346 (2013).
22. Pamme, N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab Chip* **7**, 1644–1659 (2007).
23. Tripathi, S., Kumar, Y. V. B., Agrawal, A., Prabhakar, A. & Joshi, S. S. Microdevice for plasma separation from whole human blood using bio-physical and geometrical effects. *Sci. Rep.* **6**, 26749 (2016).
24. Yang, S., Ündar, A. & Zahn, J. D. A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation.

- Lab Chip* **6**, 871–880 (2006).
25. Rafeie, M., Zhang, J., Asadnia, M., Li, W. & Warkiani, M. E. Multiplexing slanted spiral microchannels for ultra-fast blood plasma separation. *Lab Chip* **16**, 2791–2802 (2016).
  26. Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R., Desmulliez, M. P. Y. & Jovet, L. Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels. *Microfluid. Nanofluidics* **8**, 105–114 (2010).
  27. Srivastava, S. *et al.* A self assembled monolayer based microfluidic sensor for urea detection. *Nanoscale* **3**, 2971–2977 (2011).
  28. Srivastava, S. *et al.* Mediator-free microfluidics biosensor based on titania-zirconia nanocomposite for urea detection. *RSC Adv.* **3**, 228–235 (2013).
  29. Remiszewska, E. *et al.* Enzymatic method of urea determination in LTCC microfluidic system based on absorption photometry. *Sensors Actuators B Chem.* **285**, 375–384 (2019).
  30. DeMello, A. J. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature* **442**, 394–402 (2006).
  31. Shames, I. H. Principios básicos de mecánica de fluidos. in *Mecánica de Fluidos* 2–35 (McGraw-Hill, 1995).
  32. Kalsi, A. & Balani, N. Fluid dynamics: laminar and -turbulent flow. in *Physics for the Anaesthetic Viva* (ed. Cambridge) 27–28 (Cambridge University Press, 2016).
  33. Chakraborty, D. & Chakraborty, S. Microfluidic Transport and Micro-scale Flow Physics : An Overview. in *Microfluidics and Microfabrication* (ed. Chakraborty, S.) 1–85 (Springer Science+Business Media, LLC, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-1543-6.
  34. Morini, G. L. Scaling Effects for Liquid Flows in Microchannels. *Heat Transf. Eng.* **27**, 64–73 (2006).
  35. Mott, R. L. *Mecánica de fluidos*. (PEARSON EDUCACIÓN, 2006).
  36. Ríos, Á., Zougagh, M. & Avila, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Anal. Chim. Acta* **740**, 1–11 (2012).
  37. Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V. & Delamarche, E. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectron. Eng.* **132**, 156–175 (2015).
  38. Nguyen, N.-T. & Wereley, S. T. *Fundamentals and applications of microfluidics*. (2006).
  39. Lim, Y. C., Kouzani, A. Z. & Duan, W. Lab-on-a-chip: A component view. *Microsyst. Technol.* **16**, 1995–2015 (2010).
  40. Ohno, K. I., Tachikawa, K. & Manz, A. Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis* **29**, 4443–4453 (2008).
  41. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., Stetten, F. Von & Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1153–1182 (2010).
  42. Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Micro-and nanofabrication methods in nanotechnological medical and pharmaceutical devices. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 483–495 (2006).
  43. Zaouk, R. *et al.* Introduction to microfabrication techniques. *Methods Mol. Biol.* **321**, 5–15 (2006).
  44. Becker, H. & Locascio, L. E. Polymer microfluidic devices. *Talanta* **56**, 267–287 (2002).
  45. Jia, Z., Fang, Q. & Fang, Z. Bonding of Glass Microfluidic Chips at Room. *Anal. Chem.* **76**, 5597–5602 (2004).
  46. Provin, C., Fukuba, T., Okamura, K. & Fujii, T. An Integrated Microfluidic System for Manganese Anomaly Detection Based on Chemiluminescence: Description and Practical Use to Discover Hydrothermal Plumes Near the Okinawa Trough. *IEEE J. Ocean. Eng.* **38**, 178–185 (2013).
  47. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. & Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for

- Inexpensive, Low-Volume, Portable. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1318–1320 (2007).
48. Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. & Manz, A. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Anal. Chem.* **74**, 2623–2636 (2002).
  49. Mu, X., Liang, Q., Hu, P., Ren, K. & Luo, G. Laminar flow used as “liquid etch mask” in wet chemical etching to generate glass microstructures with an improved aspect ratio. *Lab Chip* **9**, 1994–1996 (2009).
  50. Woolley, A. T. & Mathies, R. A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11348–11352 (1994).
  51. Fluidics, M. *et al.* A Microfabricated Gas–Liquid Segmented Flow Reactor for High-Temperature Synthesis: The Case of CdSe Quantum Dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 5447–5451 (2005).
  52. Craighead, H. & Yang, P. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1183–1202 (2010).
  53. Gale, B. K. *et al.* Low-Cost MEMS Technologies. in *Comprehensive Microsystems* (eds. Gianchandani, Y. B., Tabata, O. & Zappe, H.) 341–378 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.00530-0.
  54. Lee, J. N., Park, C. & Whitesides, G. M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **75**, 6544–6554 (2003).
  55. Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N. & Hahn, J. H. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels. *Elec* **24**, 3607–3619 (2003).
  56. Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas, L., Astudillo, D. & Rojas, B. Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET. *Rev. Lat. Met. Mat.* **36**, 108–130 (2016).
  57. Domachuk, B. P., Tsioris, K., Omenetto, F. G. & Kaplan, L. Bio-microfluidics: Biomaterials and Biomimetic Designs. *Adv. Mater.* **22**, 249–260 (2010).
  58. Li, X. *et al.* A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics* **6**, 011301 (2012).
  59. Weng, X., Kang, Y., Guo, Q., Peng, B. & Jiang, H. Recent advances in thread-based microfluidics for diagnostic applications. *Biosens. Bioelectron.* **132**, 171–185 (2019).
  60. Darwish, I. A. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int. J. Biomed. Sci.* **2**, 217–235 (2006).
  61. Guzmán-vázquez, E. Las pruebas de ELISA. *Gac. Méd. Méx.* **140**, 48–49 (2004).
  62. Rossier, J. S. & Girault, H. H. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. *Lab Chip* **1**, 153–157 (2001).
  63. Nishiyama, K., Sugiura, K., Kaji, N., Tokeshi, M. & Baba, Y. Development of a microdevice for facile analysis of theophylline in whole blood by a cloned enzyme donor immunoassay. *Lab Chip* **19**, 233–240 (2019).
  64. Kong, J. *et al.* Integrated microfluidic immunoassay for the rapid determination of clenbuterol. *Lab Chip* **9**, 1541–1547 (2009).
  65. Dong, H., Li, C. M., Zhou, Q., Sun, J. B. & Miao, J. M. Sensitive electrochemical enzyme immunoassay microdevice based on architecture of dual ring electrodes with a sensing cavity chamber. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 621–626 (2006).
  66. Ghodbane, M. *et al.* Development and validation of a microfluidic immunoassay capable of multiplexing parallel samples in microliter volumes. *Lab Chip* **15**, 3211–3221 (2015).
  67. Kerman, K. *et al.* Label-free electrochemical immunoassay for the detection of human chorionic gonadotropin hormone. *Anal. Chem.* **78**, 5612–5616 (2006).
  68. Shirai, A., Sueyoshi, K., Endo, T. & Hisamoto, H. Graphene/polyethylene glycol hybrids for single-step

- immunoassay microdevice. *FlatChem* **13**, 34–39 (2019).
69. Bhattacharyya, A. & Klapperich, C. M. Design and testing of a disposable microfluidic chemiluminescent immunoassay for disease biomarkers in human serum samples. *Biomed. Microdevices* **9**, 245–251 (2007).
  70. Ikami, M. *et al.* Immuno-pillar chip: A new platform for rapid and easy-to-use immunoassay. *Lab Chip* **10**, 3335–3340 (2010).
  71. Chen, Y. *et al.* Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system. *Talanta* **186**, 299–305 (2018).
  72. Ng, A. H. C., Uddayasankar, U. & Wheeler, A. R. Immunoassays in microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 991–1007 (2010).
  73. Kasama, T., Baba, Y. & Tokeshi, M. Microfluidic Immunoassay Devices as Next-Generation Cancer and Medical Diagnostics Platform. in *Next Generation Point-of-care Biomedical Sensors Technologies for Cancer Diagnosis* (ed. Chandra, P.) 305–322 (Springer Nature Singapore, 2017). doi:10.1007/978-981-10-4726-8.
  74. Herrmann, M., Veres, T. & Tabrizian, M. Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic. *Lab Chip* **6**, 555–560 (2006).
  75. Holmes, D., She, J. K., Roach, L. & Morgan, H. Bead-based immunoassays using a micro-chip flow cytometer. *Lab Chip* **7**, 1048–1056 (2007).
  76. Lee, N. Y., Yang, Y., Kim, Y. S. & Park, S. Microfluidic Immunoassay Platform Using Antibody-immobilized Glass Beads and Its Application for Detection of Escherichia coli O157:H7. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 479–483 (2006).
  77. Ko, Y. *et al.* Microchip-based multiplex electro-immunosensing system for the detection of cancer biomarkers. *Electrophoresis* **29**, 3466–3476 (2008).
  78. Kasama, T. *et al.* Development of Immuno-Wall Devices and a Mobile Fluorescence Reader for On-Site Sample-To-Answer Immunoassay. in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* 935–937 (2014).
  79. Kasama, T. *et al.* Immuno-wall lab-on-chip companion diagnostic devices for rapid and low-cost detection of mutant epidermal growth factor receptors (EGFR) from cytological samples in lung cancer patients. in *19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science* 925–927 (2015).
  80. Sun, J. *et al.* Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **80**, 333–341 (2007).
  81. Urusov, A. E., Petrakova, A. V., Zherdev, A. V & Dzantiev, B. B. Application of Magnetic Nanoparticles in Immunoassay. *Nanotechnologies Russ.* **12**, 471–479 (2017).
  82. Moraes Silva, S., Tavallaie, R., Sandiford, L., Tilley, R. D. & Gooding, J. J. Gold coated magnetic nanoparticles: from preparation to surface modification for analytical and biomedical applications. *Chem. Commun.* **52**, 7528–7540 (2016).
  83. Lin, J. *et al.* Gold-coated iron (Fe@Au) nanoparticles: Synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly. *J. Solid State Chem.* **159**, 26–31 (2001).
  84. Cui, Y. *et al.* The synthesis of gold mag nano-particles and their application for antibody immobilization. *Biomed Microdev* **7**, 153–156 (2005).
  85. Li, S., Liu, H. & He, N. Covalent Binding of Streptavidin on Gold Magnetic Nanoparticles for Bead Array Fabrication. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 4875–4882 (2010).
  86. Qu, H., Ma, H., Zhou, W. & Connor, C. J. O. In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids. *Inorganica Chim. Acta* **389**, 60–65 (2012).
  87. Ali-cherif, A., Begolo, S., Descroix, S., Viovy, J. & Malaquin, L. Programmable Magnetic Tweezers and

- Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays. *Angew. Chemie* **124**, 10923–10927 (2012).
88. Fujii, K. *et al.* Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: Lung adenocarcinoma. *Proteomics* **5**, 1150–1159 (2005).
  89. Hou, H. W. *et al.* Microfluidic devices for blood fractionation. *Micromachines* **2**, 319–343 (2011).
  90. Kersaudy-Kerhoas, M. & Sollier, E. Micro-scale blood plasma separation: From acoustophoresis to egg-beaters. *Lab Chip* **13**, 3323–3346 (2013).
  91. Mielczarek, W. S., Obaje, E. A., Bachmann, T. T. & Kersaudy-Kerhoas, M. Microfluidic blood plasma separation for medical diagnostics: Is it worth it? *Lab Chip* **16**, 3441–3448 (2016).
  92. Yu, Z. T. F., Aw Yong, K. M. & Fu, J. Microfluidic blood cell sorting: Now and beyond. *Small* **10**, 1687–1703 (2014).
  93. Sowemimo-Coker, S. Red Blood Cell Hemolysis During Processing. *Transfus. Med. Rev.* **16**, 46–60 (2002).
  94. Tripathi, S., Kumar, Y. V. B. V., Prabhakar, A., Joshi, S. S. & Agrawal, A. Passive blood plasma separation at the microscale: a review of design principles and microdevices. *J. Micromechanics Microengineering* **25**, 083001 (2015).
  95. Choi, S., Song, S., Choi, C. & Park, J. Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration. *Lab Chip* **7**, 1532–1538 (2007).
  96. Sollier, E., Cubizolles, M., Fouillet, Y. & Achard, J. Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices. *Biomed Microdev* **12**, 485–497 (2010).
  97. Browne, A. W., Ramasamy, L., Cripe, T. P. & Ahn, C. H. A lab-on-a-chip for rapid blood separation and quantification of hematocrit and serum analytes. *Lab Chip* **11**, 2440–2446 (2011).
  98. Fan, R. *et al.* Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1373–1378 (2008).
  99. VanDelinder, V. & Groisman, A. Separation of plasma from whole human blood in a continuous cross-flow in a molded microfluidic device. *Anal. Chem.* **78**, 3765–3771 (2006).
  100. Doyeux, V., Podgorski, T., Peponas, S., Ismail, M. & Couplier, G. Spheres in the vicinity of a bifurcation: Elucidating the Zweifach-Fung effect. *J. Fluid Mech.* **674**, 359–388 (2011).
  101. Bhagat, A. A. S., Kuntaegowdanahalli, S. S. & Papautsky, I. Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration. *Lab Chip* **8**, 1906 (2008).
  102. Carlo, D. Di. Inertial microfluidics. *Lab Chip* **9**, 3038–3046 (2009).
  103. Sudarsan, A. P. & Ugaz, V. M. Multivortex micromixing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7228–7233 (2006).
  104. Segré, G. & Silberberg, A. Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions. *Nature* **189**, 209–210 (1961).
  105. Segré, G. & Silberberg, A. Behaviour of macroscopic rigid spheres in Poiseuille flow Part 2. Experimental results and interpretation. *J. Fluid Mech.* **14**, 136–157 (1962).
  106. Zhou, J. & Papautsky, I. Fundamentals of inertial focusing in microchannels. *Lab Chip* **13**, 1121–1132 (2013).
  107. Warkiani, M. E., Kah, A., Tay, P., Guan, G. & Han, J. Membrane-less microfiltration using inertial microfluidics. *Sci. Rep.* **5**, 11018 (2015).
  108. Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. S. & Papautsky, I. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip* **9**, 2973–2980 (2009).
  109. Wu, L., Guan, G., Hou, H. W., Bhagat, A. A. S. & Han, J. Separation of leukocytes from blood using spiral channel with trapezoid cross-section. *Anal. Chem.* **84**, 9324–9331 (2012).

110. Francis, P. S., Lewis, S. W. & Lim, K. F. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends Anal. Chem.* **21**, 389–400 (2002).
111. Taylor, A. J. & Vadgama, P. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of urea. *Ann. Clin. Biochem.* **29**, 245–264 (1992).
112. Ali, A. *et al.* Potentiometric urea biosensor utilizing nanobiocomposite of chitosan-iron oxide magnetic nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* **414**, 012024 (2013).
113. Searle, P. L. & Meta, I. The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen. *Analyst* **109**, 549–568 (1984).
114. Gordon, S. A., Fleck, A. & Bell, J. Optimal conditions for the estimation of ammonium by the Berthelot reaction. *Ann. Clin. Biochem.* **15**, 270–275.
115. Hashihama, F. *et al.* Liquid waveguide spectrophotometric measurement of nanomolar ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP). *Talanta* **143**, 374–380 (2015).
116. Asaoka, S. *et al.* A spot test for ammonium ion by the color band formation method. *Talanta* **72**, 1100–1105 (2007).
117. Liang, Y., Yan, C., Guo, Q., Xu, J. & Hu, H. Spectrophotometric determination of ammonia nitrogen in water by flow injection analysis based on NH<sub>3</sub>-o-phthalaldehyde-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> reaction. *Anal. Chem. Res.* **10**, 1–8 (2016).
118. Prieto-blanco, M. C., Jornet-martínez, N., Moliner-martínez, Y., Molins-legua, C. & Herráez-hernández, R. Development of a polydimethylsiloxane – thymol/nitroprusside composite based sensor involving thymol derivatization for ammonium monitoring in water samples. *Sci. Total Environ.* **504**, 105–112 (2015).
119. Limbut, W. *et al.* Microfluidic conductimetric bioreactor. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 3064–6071 (2007).
120. Daridon, A. *et al.* Chemical sensing using an integrated microfluidic system based on the Berthelot reaction. *Sensors Actuators B* **76**, 235–243 (2001).
121. Park, J.-S. *et al.* Design, fabrication and characterization of an integrated micro ammonia. *Sensors Actuators B* **117**, 516–522 (2006).
122. Sensor, A., Kimble, K. W., Walker, J. P., Finegold, D. N. & Asher, S. A. Progress toward the development of a point-of-care photonic crystal ammonia sensor. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 678–685 (2006).
123. Ramírz Quirós, F. Desinfección del agua con cloro y cloraminas. *Técnica Ind.* **260**, 54–63 (2005).
124. Huizenga, J. R., Tangerman, A. & Gips, C. H. Determination of ammonia in biological fluids. *Ann. Clin. Biochem.* **31**, 529–543 (1994).
125. Decker, J. L. *et al.* American rheumatism association nomenclature and classification of arthritis and rheumatism (1983). *Arthritis Rheum.* **26**, 1029–1032 (1983).
126. Lozano, J. A. Artritis reumatoide (I). Etiopatogenia, sintomatología, diagnóstico y pronóstico. *Offarm* **20**, 94–101 (2001).
127. Panoulas, V. F. *et al.* Target organ damage in patients with rheumatoid arthritis: The role of blood pressure and heart rate. *Atherosclerosis* **209**, 255–260 (2010).
128. Midtbø, H. *et al.* The association of hypertension with asymptomatic cardiovascular organ damage in rheumatoid arthritis. *Blood Press.* **25**, 298–304 (2016).
129. Alamanos, Y., Voulgari, P. V. & Drosos, A. A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Semin. Arthritis Rheum.* **36**, 182–188 (2006).
130. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62**, 2569–

- 2581 (2010).
131. Symmons, D. P. M. Classification criteria for rheumatoid arthritis — time to abandon rheumatoid factor? *Rheumatology* **46**, 725–726 (2007).
  132. Avouac, J., Gossec, L. & Dougados, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 845–851 (2006).
  133. Bi, G., Ciofu, C. & Stoica, V. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis , what is new ? *J. Med. Life* **9**, 144–148 (2016).
  134. György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A. & Buzás, E. I. Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1662–1677 (2006).
  135. Kinloch, A. *et al.* Synovial Fluid Is a Site of Citrullination of Autoantigens in Inflammatory Arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 2287–2295 (2008).
  136. Venrooij, W. J. Van, Beers, J. J. B. . Van & Pruijn, G. J. . Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 268–285 (2008).
  137. Lutteri, L., Malaise, M. & Chapelle, J. P. Comparison of second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies assays for detecting rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* **386**, 76–81 (2007).
  138. Mohammed, M. I., Haswell, S. & Gibson, I. Lab-on-a-chip or Chip-in-a-lab : Challenges of Commercialization Lost in translation. *Procedia Technol.* **20**, 54–59 (2015).
  139. Yamamichi, A. *et al.* An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **17**, 618–625 (2016).
  140. Sista, R. S., Eckhardt, A. E., Srinivasan, V., Pollack, M. G. & Pamula, V. K. Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform. *Lab Chip* **8**, 2188–2196 (2008).
  141. Fu, L. *et al.* A modified quick PETIA for detecting anti-CCP antibodies in human serum. *Anal. Methods* **7**, 3134–3140 (2015).
  142. Cai, B., Lanlan, W., Lui, J. & Weihua Feng. Performance evaluation of Elecsys analysis system for anti-cyclic citrullinated peptide detection in comparison with commercially available ELISA assays in rheumatoid arthritis diagnosis. *Clin. Biochem.* **44**, 889–993 (2011).
  143. Kim, S., Kim, J., Lee, J. & Kim, H. Evaluation of three automated enzyme immunoassays for detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in qualitative and quantitative aspects. *Rheumatology* **49**, 450–457 (2010).
  144. Dibekkaya, H., Saylan, Y., Yılmaz, F. & Derazshamshir, A. Surface plasmon resonance sensors for real-time detection of cyclic citrullinated peptide antibodies. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **53**, 585–594 (2016).
  145. Guerrero, S., Sánchez-tirado, E., Martínez-garcía, G. & González-cortés, A. Electrochemical biosensor for the simultaneous determination of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in human serum. *Analyst* **145**, 4680–4687 (2020).
  146. Chon, H. *et al.* Highly sensitive immunoassay of anti-cyclic citrullinated peptide marker using surface-enhanced Raman scattering detection. *Proc. SPIE* **9523**, 1–8 (2015).
  147. (NIBSC), N. I. for B. S. and C. WHO Reference Reagent Rheumatoid Arthritis Serum, Human NIBSC code: W1066. 1–10 (acceso 05-09-2021) <https://www.nibsc.org/documents/ifu/W1066.pdf> (2008).
  148. Jena, P. Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles. *Mater. Soc. Annu. Meet.* **8**, 2209–2211 (1996).
  149. Nanoimmunotech. LinkAmine kit MAGNETIC 200 nm - 5 mL. 1–14 (acceso 05-09-2021) <https://www.nanoimmunotech.eu/en/Shop/Bioconjugation-Kits-/Linkamine-kit-magnetic>.

150. Only, U. S. E. Anti CCP ELISA. *GenWay* (acceso 05-09-2021) <https://www.genwaybio.com/media/pdf/products/GWB-521226.pdf> (2000).
151. Thermo Scientific. Crosslinking Technical Handbook. 1–54 (acceso 05-09-2021) <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf> (2009).
152. Bhagat, A. A. S., Kuntaegowdanahalli, S. S. & Papautsky, I. Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction. *Microfluid. Nanofluidics* **7**, 217–226 (2009).
153. Informatics, M., Sciences, M., Kumar, R. & Informatics, M. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for Medical Researchers. *Indian Pediatr.* **48**, 277–287 (2011).
154. Purev, D., Bayarmaa, J., Tselvelmaa, S. & Zolzaya, A. Biocatalytic properties of horseradish root extract peroxidase (HRP). *Mong. J. Chem.* **15**, 101–103 (2014).
155. Yeap, S. P., Lim, J., Ooi, B. S. & Ahmad, A. L. Agglomeration , colloidal stability , and magnetic separation of magnetic nanoparticles: collective influences on environmental engineering applications. *J. Nanoparticle Res.* **19**, 368 (2017).
156. Wittstock, A. *et al.* Surface Chemistry in Nanoscale Materials. *Materials* **2**, 2404–2428 (2009).
157. Niewold, T. B., Harrison, M. J. & Paget, S. A. Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *Q. J. Med.* **100**, 193–201 (2007).
158. Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R., Desmulliez, M. P. Y. & Jouvét, L. Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels. *Microfluid. Nanofluidics* **8**, 105–114 (2010).
159. Mukherjee, S., Kang, T. G., Chen, Y. & Kim, S. Plasma separation from blood: The lab-on-a-chip approach. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **37**, 517–529 (2009).
160. Rastogi, R. *et al.* Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **328**, 421–428 (2008).
161. Kim, S., Prasad, B. & Kim, J. K. Alignment of Microbeads Using Spinning Helical Minichannel Cartridge. *J. Korean Soc. Vis.* **14**, 38–45 (2016).
162. Sun, M., Khan, Z. S. & Vanapalli, S. A. Blood plasma separation in a long two-phase plug flowing through disposable tubing. *Lab Chip* **12**, 5225–5230 (2012).
163. Meyerstein, N., Mazor, D. & Dvilansky, A. Changes in Agglomeration of Human Red Blood Cells in Liquid Storage in CPD Media. *Transfusion* **17**, 115–122 (1977).
164. Tripathi, S., Prabhakar, A., Kumar, N., Singh, S. G. & Agrawal, A. Blood plasma separation in elevated dimension T-shaped microchannel. *Biomed. Microdevices* **15**, 415–425 (2013).
165. Blatter, C., Jurischka, R., Schoth, A., Kerth, P. & Menz, W. Separation of Blood in Microchannel Bends. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. -Proc.* **4**, 3388–3391 (2003).
166. Kersaudy-Kerhoas, M., Kavanagh, D. M., Dhariwal, R. S., Campbell, C. J. & Desmulliez, M. P. Y. Validation of a blood plasma separation system by biomarker detection. *Lab Chip* **10**, 1587–1595 (2010).
167. Prabhakar, A., Kumar, Y. V. B. V., Tripathi, S. & Agrawal, A. A novel, compact and efficient microchannel arrangement with multiple hydrodynamic effects for blood plasma separation. *Microfluid. Nanofluidics* **18**, 995–1006 (2015).
168. Peiris, J. S. M., Jong, M. D. De & Guan, Y. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 243–267 (2007).
169. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26S**, D49–D53 (2008).
170. Ligon, B. L. Avian Influenza Virus H5N1 : A Review of Its History and Information Regarding Its Potential to Cause the Next Pandemic. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **16**, 326–335 (2005).

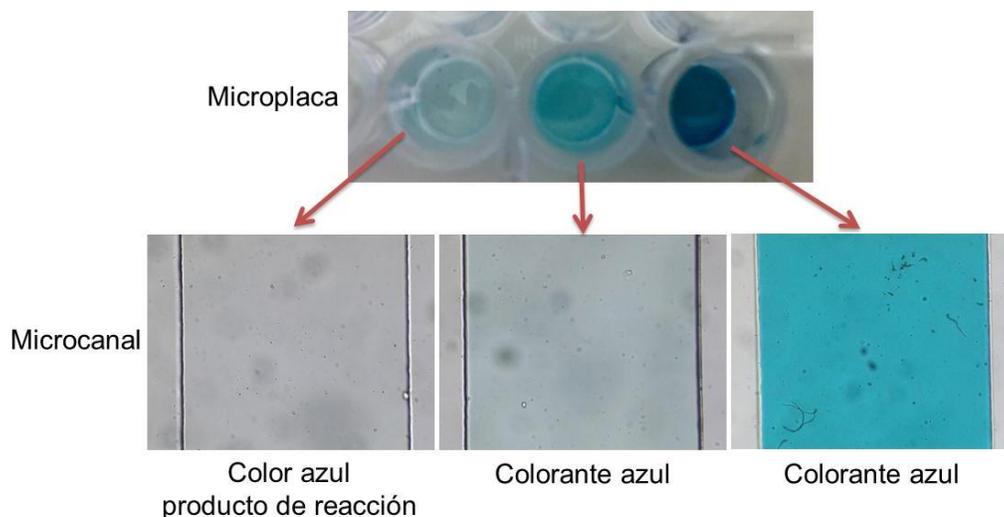
171. Mair, C. M., Ludwing, K., Herrmann, A. & Sieben, C. Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1153–1168 (2014).
172. Lai, S. *et al.* Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997–2015: a systematic review of individual case data. *Lancet Infect. Dis.* **16**, e108–e118 (2016).
173. Liu, J. *et al.* Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Migratory Birds. *Science* **309**, 1206 (2005).
174. Xu, X. *et al.* Simultaneous detection of novel H7N9 and other influenza A viruses in poultry by multiplex real-time RT-PCR. *Viol. J.* **12**, 69 (2015).
175. Amano, Y. & Cheng, Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 156–164 (2005).
176. Ho, H. *et al.* Rapid Detection of H5N1 Subtype Influenza Viruses by Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using H5- and N1-Specific Monoclonal Antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 726–732 (2009).
177. Nielsel, K. *et al.* Prototype Single Step Lateral Flow Technology for Detection of Avian Influenza Virus and Chicken Antibody to Avian Influenza Virus. *J. Immunoassay Immunochem.* **28**, 307–318 (2007).
178. Kubicki, W., Pajak, B., Kucharczyk, K., Walczak, R. & Dziuban, J. A. Rapid detection of highly pathogenic A(H7N7) avian influenza virus genetic markers in heterogenic samples utilizing on-chip SSCP-CE method. *Sensors Actuators B* **236**, 926–936 (2016).
179. Yu, X. *et al.* Zinc Oxide Nanorod Integrated Microdevice for Multiplex Virus Detection. *19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*. 850-853 (2017).
180. Dojindo Molecular Technologies. Biotin Labeling Kit - NH<sup>2</sup> (Acceso 05-09-2021) [file:///C:/Users/52552/Downloads/Manual\\_LK03.pdf](file:///C:/Users/52552/Downloads/Manual_LK03.pdf) (2013).
181. Nishiyama, K. *et al.* Simple Approach for Fluorescence Signal Amplification Utilizing a Poly(vinyl alcohol)-Based Polymer Structure in a Microchannel. *ACS Omega* **6**, 8340–8345 (2021).
182. Sino Biological. H5N1 (Avian Flu) Hemagglutinin ELISA Pair Set, Catalog Number: SEK002. vol. 1 1–10 (Acceso 05-09-2021) <https://www.sinobiologicalcdn.com/reagent/SEK002.pdf>.
183. Peiris, J. S. M. *et al.* Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* **363**, 617–619 (2004).
184. Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Muñoz-Montes, A. & Aguilar-Sánchez, L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Traspl.* **31**, 7–11 (2010).
185. Wiener lab. Urea Color. *Wiener Laboratorios*. (Acceso 05-09-2021) [https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum\\_espagnol/urea\\_color\\_2r\\_sp.pdf](https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum_espagnol/urea_color_2r_sp.pdf)
186. SPINREACT S.A. Urea-B. (Acceso 05-09-2021) [http://peramed.com/peramed/docs/1001329-1001331\\_EN.pdf](http://peramed.com/peramed/docs/1001329-1001331_EN.pdf).
187. García, M. A. *et al.* *Guía de validación de métodos analíticos*. (2002).

## ANEXOS

**ANEXO 1. Sistema de detección por análisis de imágenes**

Con la finalidad de tener un método de detección fácil y rápido, se probó el análisis de imágenes por medio de la toma de una fotografía del color desarrollado dentro del microcanal. Para ello, se realizó la reacción de detección de anti-CCP del control positivo empleando las nanopartículas magnéticas por medio del ensayo ELISA utilizando una microplaca. El producto de reacción, que presentaba un color azul claro, se introdujo al microdispositivo para poder apreciar el color observado una vez dentro del microcanal. Sin embargo, la sensibilidad era muy baja, y no se distinguía el color azul. Asimismo, se colocó colorante azul con dos diferentes tonalidades de color y se introdujeron al microdispositivo. En esta ocasión el color azul fue apenas perceptible, pese a que el colorante se mostraba bastante concentrado a simple vista (Figura A1).

Por lo tanto, la detección por medio de análisis de imágenes, a pesar de ser más práctica, presenta la gran desventaja de tener muy baja sensibilidad y no puede utilizarse en estos, ya que no es posible medir la intensidad de color del producto de reacción. Por este motivo se empleó el microdispositivo acoplado con fibras ópticas como sistema de detección.



**Figura A1.** Análisis de imágenes para la detección del producto de reacción para la cuantificación de anti-CCP empleando el inmunoensayo en microdispositivo.

## Anexo 2. Procedimiento del método convencional Anti-CCP ELISA (GWB-521226)

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo reportado en el instructivo del kit ELISA<sup>150</sup> y se resume en la Tabla A1. Los estándares de anti-CCP empleados (S1—S2) abarcaron concentraciones de 1 a 2000 U/mL. Una vez terminado el procedimiento, se realizó la lectura de la microplaca empleando un lector multimodal de microplacas (Synergy HT, BioTek).

**Tabla A1.** Procedimiento para realizar el método convencional en microplaca de titulación empleando el kit ELISA anti-CCP (GWB-521226).

<b>Reactivo</b>	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>	<b>Estándar</b>
<b>Estándar S1-S5</b>	—	—	100 µL
<b>Muestra diluida 1:100</b>	—	100 µL	—
<i>Incubar durante 60 min a temperatura ambiente (22—28 °C). Remover el contenido de cada pozo y lavar tres veces con 300 µL de solución de lavado.</i>			
<b>Anticuerpo conjugado</b>	—	100 µL	100 µL
<i>Incubar durante 30 min a temperatura ambiente (22—28 °C). Remover el contenido de cada pozo y lavar tres veces con 300 µL de solución de lavado.</i>			
<b>Sustrato cromogénico TMB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubar durante 15 min a temperatura ambiente (22—28 °C).</b>			
<b>Solución stop</b>	100 µL	100 µL	100 µL
<i>Agitar la microplaca gentilmente y medir la absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 5 min después de ser adicionada la solución stop.</i>			

### Anexo 3. Prueba *t* de Student: comparación de la cuantificación de anti-CCP

Primero se realizó una prueba *F* para corroborar si las medias de la cuantificación de anti-CCP por ambos métodos (inmunoensayo en microdispositivo y kit ELISA anti-CCP) tienen desviaciones estándar significativamente diferentes o no. La hipótesis nula ( $H_0$ ) establece que las varianzas son iguales, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) considera diferentes. Para el cálculo del estadístico *F*, se empleó la relación entre las dos varianzas dada por la Ecuación A1, en donde  $S_a^2$  y  $S_b^2$  se acomodan de tal manera que *F* sea siempre  $\geq 1$  (la varianza más pequeña se coloca en el denominador, mientras que la más grande en numerador).

$$F = \frac{S_a^2}{S_b^2} \quad \text{Ecuación A1}$$

El cálculo realizado se detalla a continuación:

$$H_0: \frac{S_{\text{microdispositivo}}^2}{S_{\text{Kit ELISA}}^2} = 1$$

$$H_1: \frac{S_{\text{microdispositivo}}^2}{S_{\text{Kit ELISA}}^2} \neq 1$$

$$F = \frac{(317.13)^2}{(173.24)^2} = 3.35$$

El valor de *F* calculada se comparó contra un valor de *F* crítica ( $F_c$ ), obtenido de una tabla de contraste para *F* de dos colas considerando un nivel de significancia  $\alpha = 5\%$  y los grados de libertad se determinaron como  $(n_a - 1)$  y  $(n_b - 1)$  en donde  $n = 3$ . Así,  $F_{c,2,2} = 39$ .

Dado que  $F < F_c$ , se acepta  $H_0$  y las varianzas se consideran iguales. Para realizar la comparación de medias por medio de la prueba *t*, primero se determinó una varianza combinada ( $S_{com}^2$ ) a partir de las varianzas individuales de acuerdo con la Ecuación A2.

$$S_{com}^2 = \frac{(n_a - 1)S_a^2 + (n_b - 1)S_b^2}{(n_a + n_b - 2)} \quad \text{Ecuación A2}$$

Posteriormente se calculó el estadístico  $|t|$  empleando la Ecuación A3. El resultado obtenido se comparó con el valor de  $t$  crítica  $|t_c|$  consultado en tablas para  $\alpha = 5\%$ , y grados de libertad  $n_a+n_b-2$ , en este caso, 4 grados de libertad. Bajo estas condiciones  $|t_c| = 2.78$ .

$$|t| = \frac{C_{promprom}^a - C_{promprom}^b}{\sqrt{S_{com}^2 \left( \frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b} \right)}} \quad \text{Ecuación A3}$$

Si se cumple que  $|t| < |t_c|$  las medias de la concentración de anti-CCP son estadísticamente iguales. A continuación se especifican los cálculos realizados:

$$S_{com}^2 = \frac{2(317.13)^2 + 2(173.24)^2}{3 + 3 - 2} = 65291.77$$

$$|t| = \frac{1505.19 - 1594.50}{\sqrt{65291.77 \left( \frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)}} = 0.43$$

Ya que  $|t| < |t_c|$  ( $0.42 < 2.78$ ), se asume que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las dos concentraciones de anti-CCP ( $\alpha = 5\%$ ), por lo que ambos métodos pueden considerarse iguales.

#### Anexo 4. Optimización de la detección en lote: Diseño de experimentos factorial fraccionado $2^{5-1}$ con 3 puntos centrales

Utilizando como base los resultados de los experimentos realizados en los experimentos iniciales (Capítulo V sección 5.4.2 y 5.5.1) se optimizó la cuantificación de urea empleando la metodología en lote. Con la finalidad de maximizar la medida de absorbancia, se realizó un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con 3 puntos centrales empleando una solución estándar de urea en SAF de concentración 0.5 mg/dL, manteniendo constante el tiempo de incubación de la reacción de Berthelot a 10 min con una temperatura de 37 °C. Se seleccionaron cinco factores que pueden influir en la reacción a los cuales se les asignó un valor alto (1), bajo (-1) y medio (0), como se muestra en la Tabla A2. Con ayuda del programa *STATGRAPHICS* se construyó la matriz del diseño aleatorizada obtiene un total de 19 experimentos, para cada uno de ellos se preparó un blanco de reacción para ajustar la absorbancia.

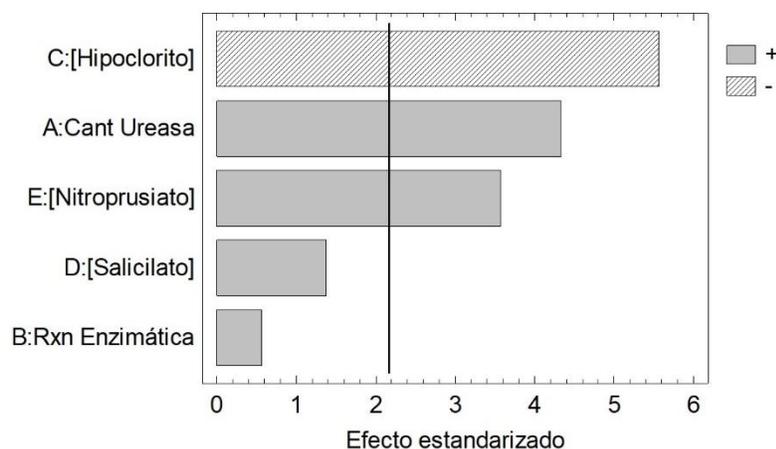
**Tabla A2.** Factores evaluados en el diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con 3 puntos centrales.

Factor	- 1	0	1
[Hipoclorito] % v/v	0.5	0.75	1
[Salicilato] mol/L	0.1	0.175	0.25
[Nitroprusiato] mol/L	0.01	0.0175	0.025
Rxn enzimática (min)	3	4	5
Cant. Ureasa (U)	0.83	1.24	1.65

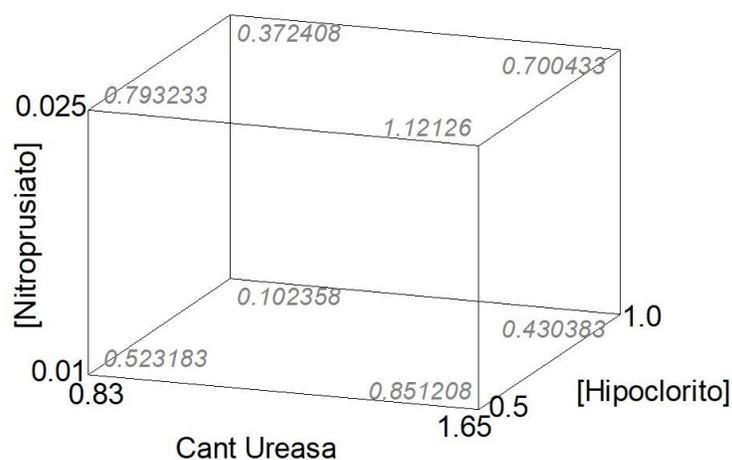
Los resultados de los 19 experimentos se localizan en la Tabla A3. Con dichos datos se realizó el tratamiento estadístico con el programa *STATGRAPHICS* buscando maximizar la respuesta analítica (A). Con el diagrama de Pareto estandarizado (Figura A2) se determinó, con un nivel de significancia de 95 %, qué factores influyen de manera positiva o negativa sobre la respuesta. Aquellos factores que no afectan significativamente se localizan por debajo de la línea perpendicular a las barras, mientras que aquellos que sobrepasan dicho límite son considerados estadísticamente significativos. En este caso, los factores que afectan significativamente la señal analítica son tres: la concentración de hipoclorito, la cantidad de enzima empleada, así como la concentración del catalizador nitroprusiato. Observando que el aumento en la concentración de hipoclorito tiene un efecto negativo sobre la respuesta, mientras que un aumento en la concentración de nitroprusiato y las unidades de enzima incrementa la absorbancia. En cuanto a la concentración de salicilato y el tiempo de incubación que la reacción enzimática, vemos que, aunque no son estadísticamente significativos, tienen un efecto positivo sobre la señal analítica, de tal manera que al aumentar sus valores aumenta también la absorbancia.

Tabla A3. Resultados del diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con 3 puntos centrales.

No. exp	Cant. Ureasa U	Rxn Enzimática min	[Hipoclorito] % v/v	[Salicilato] mol/L	[Nitroprusiato] mol/L	A
1	0.83	5	1	0.1	0.025	0.2157
2	1.65	3	1	0.1	0.025	0.3847
3	0.83	5	0.5	0.25	0.025	0.6598
4	0.83	3	0.5	0.25	0.01	0.4550
5	0.83	3	1	0.25	0.025	0.3392
6	0.83	5	0.5	0.1	0.01	0.3320
7	1.65	3	1	0.25	0.01	0.2185
8	1.65	3	0.5	0.25	0.025	1.2321
9	1.24	4	0.75	0.175	0.0175	0.7149
10	0.83	5	1	0.25	0.01	0.1518
11	1.65	5	1	0.1	0.01	0.2778
12	1.24	4	0.75	0.175	0.0175	0.7427
13	1.65	5	1	0.25	0.025	0.6626
14	0.83	3	0.5	0.1	0.025	0.4680
15	1.65	5	0.5	0.1	0.025	1.1733
16	1.65	5	0.5	0.25	0.01	0.7538
17	1.24	4	0.75	0.175	0.0175	0.6570
18	1.65	3	0.5	0.1	0.01	0.6645
19	0.83	3	1	0.1	0.01	0.1216

Figura A2. Diagrama de Pareto estandarizado del diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con 3 puntos centrales para la optimización de la cuantificación de urea empleando el método en lote.

El comportamiento de la modificación de la señal analítica en función de la variación de los parámetros estudiados puede apreciarse visualmente en la Figura A3, en donde se muestra un diagrama de cubo con la absorbancia esperada dependiendo de la modificación de los parámetros estadísticamente significativos, manteniendo un tiempo de reacción enzimática de 5 min y concentración de salicilato a 0.25 mol/L. Con base en lo anterior se seleccionaron como condiciones de reacción: hipoclorito 0.5 %, nitroprusiato 0.025 mol/L, cantidad de ureasa 1.65 U, salicilato 0.25 mol/L y tiempo de incubación de la reacción enzimática 5 min a 37 °C, con las que se predice un valor máximo de absorbancia de 1.12.



**Figura A3.** Diagrama de cubo obtenido a partir del diseño de experimentos factoria fraccionado  $2^{5-1}$  con 3 puntos centrales para la optimización de la cuantificación de urea en lote. [Salicilato] = 0.025 mol/L a una temperatura de 37 °C.

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.



Cite This: ACS Omega 2019, 4, 16683–16688

http://pubs.acs.org/journal/acsodf

Article

## Rapid, Sensitive, and Selective Detection of H5 Hemagglutinin from Avian Influenza Virus Using an Immunowall Device

Kenia Chávez Ramos,<sup>†,¶</sup> Keine Nishiyama,<sup>‡,¶</sup> Masatoshi Maeki,<sup>§</sup> Akihiko Ishida,<sup>§</sup> Hirofumi Tani,<sup>§</sup> Toshihiro Kasama,<sup>¶,⊥</sup> Yoshinobu Baba,<sup>⊥,♯</sup> and Manabu Tokeshi<sup>\*,§,⊥,¶</sup>

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, School of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 3000, Mexico City 04510, Mexico

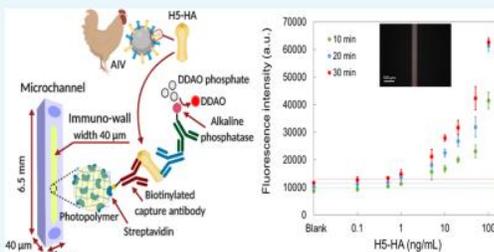
<sup>‡</sup>Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, and <sup>§</sup>Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita 13 Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan

<sup>¶</sup>Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Shinkawasaki, Saiwai-ku, Kanagawa 212-0032, Japan

<sup>⊥</sup>Institute of Nano-Life Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

<sup>♯</sup>Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-8603, Japan

**ABSTRACT:** Avian influenza virus (AIV) infection, caused by influenza virus type A, is an infectious, acute respiratory disease of birds related to influenza outbreaks worldwide. The highly pathogenic AIV subtype H5N1 has crossed species barriers to infect mammals, including humans, with fatal outcomes and has received attention as a potential pandemic threat. A rapid and timely detection in poultry is vitally important to prevent the virus spread. Despite their great sensitivity, conventional detection methods such as real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and the agar gel precipitation test are time-consuming and labor-intensive and require special training. In this work, an immunowall device was evaluated as an easier and faster way for detecting AIV H5-hemagglutinin (AIV H5-HA). For detection, fluorescence-labeled or enzyme-labeled antibody was employed as a labeling antibody in a sandwich immunoassay. Both were shown in this paper to be easier and faster assays for detection compared with the conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. In addition, high selectivity was achieved for AIV H5-HA detection after the evaluation of other different HA virus subtypes. The limit of detection was 0.23 ng/mL for the enzyme-labeled antibody. This value was equivalent to that of the conventional ELISA kit but 8 times faster (31 min compared to 260 min). The detection range was 0.23–100 ng/mL. The immunowall device with the enzyme-labeled antibody offers a rapid, sensitive, selective, and simple immunoassay system for future H5 AIV real sample detection.



### INTRODUCTION

Influenza, also known as “the flu”, is a contagious, acute respiratory illness caused by influenza viruses. There are three main types of influenza viruses: A, B, and C. Among them, type A influenza viruses infect a wide variety of avian species and mammals, and type A is the only type associated with influenza pandemics, making it the most significant for public health worldwide.<sup>1</sup> Influenza virus type A is further divided into subtypes based on the combinations of different virus surface glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). So far, 16 HAs (H1–H16) and 9 NAs (N1–N9) have been identified. The HA subtypes govern the ability of the virus to bind to and enter cells, where the epidemiologically most important multiplication of the virus then occurs.<sup>2–4</sup>

Avian influenza virus (AIV) infection is an infectious disease of birds that is caused by influenza virus type A. Wild

waterfowl, gulls, and shorebirds are known to be the natural reservoirs of this virus. Other bird species are also susceptible to being infected with a wide range of symptoms: from those of a mild illness to a highly contagious and rapidly fatal disease.<sup>5,6</sup> On the basis of their virulence, influenza A viruses are categorized into two groups: low pathogenic AIV (LPAIV) and highly pathogenic AIV. To date, highly pathogenic forms have been limited to those of the H5 and H7 subtypes. When two different viruses infect the same cell, some of their gene segments are easily exchanged because of the organization of the influenza virus into eight gene segments.<sup>5</sup> Thereby, LPAIVs can begin to evolve rapidly and can mutate into a

Received: August 28, 2019

Accepted: September 18, 2019

Published: September 27, 2019



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection

Kenia Chávez Ramos, María del Pilar Cañizares Macías\*

Laboratorio de Métodos de Flujo Continuo, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Microdevice  
Immunoassay  
Magnetic nanoparticles  
Rheumatoid arthritis  
Anti-Cyclic citrullinated peptide

## ABSTRACT

Anti-cyclic citrullinated peptide IgG antibodies (anti-CCP) are produced as an immune response in the presence of post-translational modified peptides known as cyclic citrullinated peptides (CCP). Anti-CCP have been considered as specific biomarkers for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA), and due to their high specificity, it is possible to make a differential diagnosis of other rheumatic diseases. These autoantibodies can be detected in the early stages of RA and even up to 10 years before presenting the first symptoms of the disease opening a window of opportunity for timely treatment. In this work, a simple straight channel microdevice and CCP conjugated magnetic nanoparticles (MNPs-CCP) as solid support was developed for quantifying anti-CCP. An additional microdevice with an optical flow Z cell design coupled with optical fibers was used to perform the spectrophotometric detection. The dynamic range of concentrations was determined between 0.70 and 2000 U mL<sup>-1</sup> with a limit of detection of 0.70 U mL<sup>-1</sup>. The developed microdevice immunoassay was probed using a positive control and a negative control of plasma employing only 6 µL of both samples and reagents. The results showed that the proposed microdevice was almost nine times faster than using a commercial anti-CCP ELISA kit obtaining equivalent results and being 16 times more sensitive. The microdevice immunoassay, with conjugated MNPs-CCP is a simple method for anti-CCP quantification being cheaper, faster, and more sensitive than the ELISA kit.

### 1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA), classified in 1983 by the American College of Rheumatology (ACR) as a diffuse connective tissue disease [1], is a chronic systemic disease that affects the joints, connective tissues, muscle, tendons, and fibrous tissue. It tends to strike during the most productive years of adulthood, between the ages of 20 and 40, and is a chronic disabling condition often causing pain, destruction, and deformity [2]. In addition, RA is known to be able to affect other major systems and organs [3–7]. The worldwide prevalence can vary between 0.3% and 1% being more common in women than men in developed countries [8].

According to the 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria (2010 ACR/EULAR), the rheumatoid factor (RF) and antibodies against cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) have a central role in the diagnosis and prognosis of RA [9]. Although RF can be detected in most patients with RA, it is not a specific biomarker (sensitivity 75–85% and specificity 80–90%) and is also present in many inflammatory diseases

and in healthy individuals (mainly the elderly). Conversely, as target of the detection, anti-CCP biomarkers present a better result in specificity for diagnosis (sensitivity 70–80% and specificity 95–98%). The high specificity of anti-CCP gives them a great value in the differential diagnosis of arthritic diseases [10–15]. Anti-CCP are IgG autoantibodies directed against cyclic citrullinated peptides (CCP). These peptides are produced by post-translational modification of arginine residues to citrulline (citrullination process) catalyzed by the Ca<sup>2+</sup> dependent enzyme peptidyl arginine deiminase (PAD). It results in a loss of net positive charge of the peptides causing significant biochemical changes which lead to its non-recognition, and subsequently induce an immune response [16,17]. The citrullination process is related to inflammation in general, but the development of pathogenic antibodies that recognize citrullinated proteins is a specific process of RA [18]. Also, anti-CCP are present in at least 55% of patients with early RA and can be detected on average 10 years prior to the appearance of the first symptoms of the disease, which could open a window of opportunity for timely treatment [19–22].

\* Corresponding author.

E-mail address: [pilarm@unam.mx](mailto:pilarm@unam.mx) (M.P.C. Macías).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121801>

Received 12 August 2020; Received in revised form 20 October 2020; Accepted 21 October 2020

Available online 23 October 2020

0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



# Microdevice based on centrifugal effect and bifurcation law for separation of plasma from on-line diluted whole blood

Kenia Chávez Ramos<sup>1</sup> · María del Pilar Cañizares Macías<sup>1</sup>

Received: 12 May 2021 / Revised: 24 June 2021 / Accepted: 28 June 2021

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

In recent decades, scientific interest in the development of devices capable of performing routine clinical analyses through the application of standardized traditional laboratory protocols in a miniaturized lab-on-a-chip device has increased. In the present work, an innovative microdevice for the on-line whole blood dilution with a phosphate buffer solution (PBS) and separation of plasma was designed, manufactured, and characterized. The microdevice was constructed with a rectangular cross-section and spiral-shaped microchannels by photolithography and soft lithography. Also, the widths of the diluted plasma and the remaining blood outlet microchannels were different to create a difference in the outlet flow rates to facilitate and achieve the plasma separation based on the combination of centrifugal effect (Dean drag force) and bifurcation law (Zweifach-Fung effect). The separation purity ( $\alpha$ ) under the separation conditions (total flow rates between 25 and 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , entrance flow rate ratio PBS/whole blood between 4 and 10, and hematocrit (% HCT) between 3 and 8) was around 100% for fresh blood samples, while the separation efficiency ( $\beta$ ) was between 8 and 13%. The concentration in the separated diluted plasma was between 0.1 and 0.7% (v/v) with plasma flow rates between 3 and 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ , respectively. The quality of the diluted and separated plasma from microdevice was corroborated from a blood sample from a patient diagnosed with rheumatoid arthritis through the quantification of anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies employing a microdevice immunoassay. The developed microdevice has a high potential to be coupled with the on-line detection of biomarkers.

**Keywords:** Microfluidics · On-line dilution · Separation · Plasma

## Introduction

Blood is considered one of the most important fluids used in medical laboratory diagnostics. Blood tests provide the opportunity to understand the correct performance of the human body and determine physiological and biochemical states, such as disease diagnosis [1, 2]. Whole blood is composed of erythrocytes (red blood cells), lymphocytes (white blood cells), platelets, and plasma. The lymphocytes and erythrocytes ratio is 1:600–1000 [3]. Red blood cells occupy approximately 45% of the total volume of blood in human adults also known as hematocrit percentage (%HCT) [4]. Blood plasma, which represents around 55% of the total volume of the whole

blood, is made up 95% water and various circulating biomarkers, nucleic acids, proteins, and metabolites [5]. Antibodies and antigens present in plasma allow the diagnosis of serious diseases. The quality of biomarkers depends strongly on the sample collection and preparation, being blood plasma separation a crucial step in diagnosis and disease monitoring [6].

Blood plasma separation is commonly carried out in clinic laboratories by centrifugation or membrane filtration. However, they are still limited by different factors such as component purity, clogging, damaging to cells if not used carefully, time-consuming, bulky, the amount of sample, and operation efficiency [6, 7]. Because of the possible disadvantages that conventional separations provide, microscale separation techniques have been considered as alternative methods by being potential tools to manipulate small volumes of sample. Portability, faster analysis, relative low cost, and multi-step integration (sample pre-treatment, separation, reactions, and detection) are some benefits of these “lab-on-a-chip” (LOC) systems. Additionally, microfluidic devices can offer

✉ María del Pilar Cañizares Macías  
pilarm@unam.mx

<sup>1</sup> Laboratorio de Métodos de Flujo Continuo, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México