

21 marzo, 2014

Diagnóstico bioquímico con micropartículas

[Bioq. Carina Tallano \(carina.tallano@wiener-lab.com\)](mailto:carina.tallano@wiener-lab.com)

Wiener Laboratorios SAIC, Rosario – Argentina

Introducción a Métodos inmunturbidimétricos con micropartículas (PET)

Existen en la actualidad un gran número de métodos cuantitativos para la determinación de proteínas basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Así, cuando a una solución diluida de antígeno, se le agrega una solución con su anticuerpo específico, se produce la formación de inmunocomplejos que precipitan provocando una turbidez proporcional a la cantidad de antígeno en la solución, que puede ser medida turbidimétricamente.

La elección del método de cuantificación de una proteína en particular, requiere del conocimiento del tamaño y concentración plasmática de la misma. En general, proteínas de elevado peso molecular y alta concentración plasmática, pueden ser dosadas por métodos tradicionales de inmunoprecipitación: inmunodifusión radial, nefelometría, turbidimetría, etc.

Sin embargo, proteínas de menor peso molecular o de baja concentración plasmática, no pueden ser medidas por los métodos tradicionales anteriores ya que requieren de mayor sensibilidad. En las últimas décadas, el desarrollo de metodologías que unen covalentemente anticuerpos a micropartículas ha permitido aumentar la sensibilidad de los métodos turbidimétricos. De esta manera, los anticuerpos unidos a las partículas dan lugar a redes de inmunocomplejos de mayor tamaño, que provocan mayor dispersión de la luz incidente y por lo tanto, mayor señal resultante. Estos métodos, más sensibles que los métodos tradicionales turbidimétricos, son conocidos como PET (Particle Enhanced Turbidimetry) y son utilizados en determinaciones de: Proteína C Reactiva (CRP/ hsCRP), Ferritina, Dímero D (DD), Antitrombina (AT), Lipoproteína A (LpA), β 2 Microglobulina (β M), Inmunoglobulina E (IgE), etc.

Micropartículas: características y propiedades

El uso de partículas para visualizar reacciones inmunológicas data de 1896, cuando Widal, Von Gruber y Durham descubrieron la aglutinación de bacterias con el suero de pacientes enfermos. La utilización de partículas artificiales, conocidas como partículas de “látex”, ocurrió años después (1956) cuando Singer y Plotz utilizaron dichas partículas de poliestireno en la determinación de Factor Reumatoideo.

Desde entonces, las partículas fueron gradualmente empleadas tanto en el campo diagnóstico como en diferentes áreas de investigación. En los últimos años, con la reciente explosión de la nanotecnología, el tamaño de las partículas se redujo en 2 a 3 órdenes de magnitud y las aplicaciones de las partículas se expandieron notablemente. En el diseño de un test diagnóstico que emplea partículas o micropartículas, es esencial conocer las demandas de la aplicación para poder realizar una selección adecuada de la partícula más conveniente. La composición química de las partículas puede ser tan variada como su forma. Pueden estar constituidas de materiales orgánicos (polímeros), inorgánicos, metálicos, semiconductores, superparamagnéticos, etc.

Las propiedades físicas y ópticas de la partícula elegida, deben ser totalmente conocidas para poder definir el proceso de manipulación y también, poder ajustar los parámetros del sistema de detección. Las micropartículas poliméricas son sintetizadas por polimerización a partir de diferentes combinaciones de monómeros o copolímeros. Algunas de las partículas más comunes son las compuestas de poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxietilmetacrilato (pHEMA), etc.

Además, por agregado de monómeros funcionales durante la reacción de síntesis, puede lograrse la exposición de grupos reactivos sobre su superficie que actúan en el acople covalente del ligando de unión y en la estabilización de las mismas. Las partículas que no presentan grupos reactivos son conocidas como micropartículas no funcionalizadas y las que disponen diferentes grupos reactivos son conocidas como partículas funcionalizadas. En el caso de algunos test diagnósticos, el tamaño de la partícula puede ser crítico para cumplir su función apropiada como en el caso de los test de flujo lateral o puede ser un parámetro secundario a otras propiedades como en el caso de técnicas de separación biológica. En los métodos PET, el diámetro de la partícula incide marcadamente en la fase de detección turbidimétrica y también, en la performance de la determinación. Esto se debe a que el tamaño de la micropartícula determina la cantidad de superficie expuesta para llevar a cabo la reacción inmunológica.

Así, las micropartículas más pequeñas presentan mayor superficie por unidad de peso, que las de mayor tamaño y requieren mayor cantidad de reactante (antígeno o anticuerpo) para su sensibilización. También a medida que se reduce el diámetro de las partículas se vuelve más complicado su procesamiento durante los lavados o cambios de medio circundante (centrifugación, diálisis o diafiltración). +

Sensibilización de micropartículas

Las micropartículas pueden ser cubiertas por moléculas de captura, tales como anticuerpos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, etc. para ser usadas en diferentes aplicaciones diagnósticas. Básicamente, las micropartículas pueden ser sensibilizadas por adsorción, unión covalente o afinidad. La adsorción pasiva se establece básicamente por interacciones hidrofóbicas entre la biomolécula y la partícula polimérica. Las estrategias de adsorción suelen ser más sencillas, relativamente rápidas y requieren menor optimización.

Debido a que la adsorción requiere de múltiples puntos de contacto entre la molécula y la partícula, esta estrategia se reserva generalmente para proteínas y micropartículas poliméricas no funcionalizadas. La unión covalente requiere el uso de micropartículas funcionalizadas con grupos carboxílicos o aminos que permiten formar un enlace covalente con la molécula que se requiere acoplar. Si bien estas estrategias suelen requerir una mayor grado de optimización, permiten obtener productos más estables para el desarrollo de reactivos comerciales.

La afinidad de ligando se emplea para inmovilizar anticuerpos primarios a través de proteína A, proteína G o anticuerpos anti-Fc, como así también, para moléculas biotiniladas a través de partículas con estreptavidina. Para lograr la optimización de esta etapa de sensibilización de micropartículas dentro de la obtención de un reactivo inmunoturbidimétrico PET, será necesario:

- ajustar la cantidad de ligando unido
- conservar la estructura del ligando que permita llevar a cabo el reconocimiento específico de la molécula de interés
- minimizar las interacciones inespecíficas
- lograr que la unión formada sea estable en el tiempo
- mantener las micropartículas sensibilizadas en suspensión, para obtener un reactivo líquido homogéneo.

El alcance de estos requisitos básicos es el objetivo central dentro de la estrategia inicial de sensibilización de micropartículas y constituye el marco para el diseño particular de un reactivo PET.

Perspectivas

Los métodos inmunoturbidimétricos basadas en micropartículas han comenzado a desplazar paulatinamente otras determinaciones inmunológicas dentro del laboratorio bioquímico, por su amplia versatilidad metodológica, rapidez, sensibilidad y posibilidad de automatización, prometiendo expandirse a nuevas y más sensibles determinaciones.