

T. Prov. 23/158

T
15
138

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 4/5/00
ENTRADA NUM. 1643

Departamento de Física Aplicada

**DESARROLLO DE UN INMUNO-ENSAYO ÓPTICO
DE AGLUTINACIÓN COLOIDAL.
ESTUDIO CINÉTICO Y MORFOLÓGICO**

José Manuel Delgado Calvo-Flores

Tesis Doctoral

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 51968468x
Nº Copia 21235405

**DESARROLLO DE UN INMUNO-ENSAYO ÓPTICO
DE AGLUTINACIÓN COLOIDAL.
ESTUDIO CINÉTICO Y MORFOLÓGICO**

por

José Manuel Delgado Calvo-Flores

Directores de la Tesis

Dr. José Callejas Fernández
Prof. Titular Dpto. Física Aplicada



Dr. Josep Puig i Oriol
Departamento I&D Biokit S.A



Trabajo presentado para aspirar al

GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FÍSICAS



José Manuel Delgado Calvo-Flores
Granada, julio 2000

A mis padres
y a Charo

Quisiera en primer lugar agradecer toda el ánimo y apoyo que me han dado mis directores de Tesis, Dr. D. José Callejas Fernández y Dr. D. Josep Puig i Oriol. Les agradezco la paciencia que han tenido conmigo y el gran número de ideas que han brindado para la mejora de este trabajo.

Quiero agradecer la ayuda que siempre me han prestado mis compañeros del Departamento de Investigación y Desarrollo (Sección látex) de Biokit S.A y a los de Látex Producción. Dentro de este último quisiera destacar a Teodora Sánchez (“Teo”), cuyas medidas de la curva patrón para el cálculo de diámetros han sido de gran utilidad en el desarrollo de esta Memoria.

Doy también las gracias a dos personas sin las cuales no hubiera sido posible la realización de esta Tesis, que son Josep Serra y Angels Díez. A ambos les debo estar en Biokit y mi introducción en el mundo de los inmuno-ensayos.

No me gustaría olvidar a otros compañeros, como es el caso de Enric Garcia, artífice de todos los cromatogramas de la Tesis y de que haya aprendido algo sobre la purificación de proteínas.

Quisiera también agradecer a Roque Hidalgo Álvarez el interés que ha mostrado siempre por la escritura de esta Tesis, al igual a que los miembros del Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides (Universidad de Granada), con los que pasé mis primeros años como investigador.

Finalmente agradezco a Biokit S.A y al Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada por haber permitido la realización de este trabajo.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

| | |
|-------------------------|----|
| 1.1. Introducción | 3 |
| 1.2. Bibliografía | 13 |

CAPÍTULO 2

TEORIAS DE DISPERSIÓN DE LUZ: RAYLEIGH, RAYLEIGH-GANS-DEBYE Y MIE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Introducción | 19 |
| 2.2. Teoría de Rayleigh | 19 |
| 2.2.1. Luz radiada por una esfera. Sección eficaz de dispersión | 19 |
| 2.3. Teoría de Rayleigh-Gans-Debye | 23 |
| 2.3.1. Hipótesis de partida. Intensidad de luz dispersada por una esfera | 23 |
| 2.3.2. Sección eficaz de dispersión y factor óptico. Monómeros y dímeros | 24 |
| 2.4. Teoría de Mie | 26 |
| 2.5. Luz dispersada por una colectividad de esferas | 28 |
| 2.6. Comparación entre las tres teorías | 31 |
| 2.7. Bibliografía | 34 |

CAPÍTULO 3

PROCESOS CONTROLADOS POR DIFUSIÓN. REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Introducción | 37 |
| 3.2. Procesos controlados por difusión | 38 |
| 3.2.1. Estado estacionario. Límite de Smoluchowski | 41 |
| 3.3. Restricción en la orientación. Interacciones de corto alcance | 44 |
| 3.3.1. Un lugar reactivo por molécula | 46 |
| 3.3.2. Receptores sobre una superficie esférica | 47 |
| 3.3.3. Receptores sobre una superficie esférica. Inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal. | 48 |
| 3.4. Ecuación cinética de Smoluchowski | 50 |
| 3.4.1. Formación de dímeros. Reacción Ag-Ac | 51 |
| 3.5. Inmuno-ensayos de soporte coloidal. Límite de detección y zona de equivalencia . | 53 |
| 3.5.1. Límite de detección | 53 |
| 3.5.2. Punto de equivalencia. Máxima concentración de aglutinante | 57 |
| 3.5.2.1. Punto de equivalencia | 57 |
| 3.5.2.2. Máxima concentración de aglutinante | 60 |
| 3.6. Morfología de los agregados: dimensión fractal. | 61 |
| 3.7. Determinación de la dimensión fractal por turbidimetría | 65 |
| 3.8. Bibliografía | 71 |

CAPÍTULO 4

MATERIAL

| | |
|-------------------------|----|
| 4.1. Introducción | 79 |
| 4.2. Material | 80 |

| | |
|------------------------------------------------------|---------|
| 4.2.1. Partículas de látex | 80 |
| 4.2.1.1. Tamaño de partícula | 81 |
| 4.2.1.2. Grupos superficiales | 86 |
| 4.2.1.3. Carga superficial | 86 |
| 4.2.1.4. Limpieza | 88 |
| 4.2.2. Antígeno-Anticuerpo Paul-Bunnell | 89 |
| 4.2.2.1. Antígeno de Paul-Bunnell | 89 |
| 4.2.2.2. Anticuerpo heterófilo de Paul-Bunnell | 91 |
| 4.2.3. Albúmina bovina (BSA) | 97 |
| 4.3 Instrumentación | 99 |
| 4.3.1. Introducción | 99 |
| 4.3.2. Monarch 2000 I.L | 101 |
| 4.3.3. Shimadzu UV-2101 PC | 106 |
| 4.3.4. Malvern 4700. PCS | 107 |
| 4.3.5. Viscosímetro Ubbelohde-Schoot | 109 |
| 4.3.6. Refractómetro Abbe ATAGO | 111 |
| 4.4. Bibliografía | 113 |

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

| | |
|--------------------------------------------------------------------|---------|
| 5.1. Introducción | 119 |
| 5.2. Obtención de los complejos látex-Ag P-B | 119 |
| 5.2.1. Sensibilización | 119 |
| 5.2.2. Bloqueo. | 120 |
| 5.2.3. Centrifugación. Grado de recubrimiento | 121 |
| 5.2.4. Sonicación | 125 |
| 5.2.5. Concentración Crítica de Coagulación (c.c.c) | 126 |
| 5.3. Medida de la reactividad | 129 |
| 5.4. Determinación del tamaño de partícula por turbidimetría | 130 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5. Ajuste matemático de la curva experimental absorbancia-tiempo | 135 |
| 5.5.1. Repetitividad. Criterios de aceptación de un ajuste | 142 |
| 5.6. Bibliografía | 155 |

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.1. Introducción | 161 |
| 6.2. Parámetros propios del reactivo: adsorción del Ag P-B | 166 |
| 6.2.1. Isotermas de adsorción. Partícula RP-130, SN9 y RP-214 | 167 |
| 6.2.1.1. Partícula RP-130 | 167 |
| 6.2.1.2. Partícula SN9 | 168 |
| 6.2.1.3. Partícula RP-214 | 169 |
| 6.2.1.4. Análisis comparativo de las partículas RP-130, SN9 y RP-214 . | 170 |
| 6.3. Parámetros propios del reactivo:efecto del grado de recubrimiento en la inmuno-reactividad | 172 |
| 6.3.1. Partícula RP-130 | 173 |
| 6.3.2. Partícula RP-214 | 177 |
| 6.3.3. Partícula SN9 | 179 |
| 6.3.4. Variación del grado de recubrimiento. Análisis comparativo de la reactividad de los complejos RP-130-Ag P-B y RP-214-Ag P-B | 183 |
| 6.4. Parámetros propios del reactivo:efecto del número inicial de partículas en la inmuno-reactividad | 186 |
| 6.4.1. Partícula RP-130 | 186 |
| 6.4.2. Partícula RP-214 | 192 |
| 6.4.3. Variación del número de partículas. Análisis comparativo de la reactividad de los complejos RP-130-Ag P-B y RP-214-Ag P-B | 196 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.5. Parámetros ópticos: estudio de la inmuno-aglutinación a distinta longitud de onda | 199 |
| 6.5.1. RP-130 | 200 |
| 6.5.2. RP-214 | 202 |
| 6.6. Parámetros del medio de reacción: interacción primaria y secundaria | 204 |
| 6.6.1. Introducción: la reacción Ag-Ac | 204 |
| 6.6.2. Interacción primaria | 205 |
| 6.6.3. Interacción secundaria | 210 |
| 6.6.4. Factores que afectan a la unión Ag-Ac | 211 |
| 6.7. Parámetros del medio de reacción: efecto del pH , naturaleza del electrolito y la fuerza iónica en la inmuno-reactividad | 214 |
| 6.7.1. pH de reacción. Naturaleza del electrolito | 214 |
| 6.7.1.1. Comparación entre los distintos pH | 227 |
| 6.7.2. Variación de la fuerza iónica del medio | 229 |
| 6.8. Cinética de reacción: obtención de la constante de formación de dímeros | 233 |
| 6.8.1. Condiciones experimentales | 234 |
| 6.8.2. Fundamento teórico | 237 |
| 6.8.3. Variación de V_0 con el número de partículas (N) | 238 |
| 6.8.4. Variación de V_0 con N^2 | 241 |
| 6.8.5. Variación de k_f con la viscosidad | 243 |
| 6.9. Morfología de los agregados: obtención de la dimensión fractal | 246 |
| 6.9.1. Introducción | 246 |
| 6.9.2. Condiciones de medida | 246 |
| 6.9.3. Efecto de la concentración y naturaleza del aglutinante | 254 |
| 6.9.3.1. Obtención de la dimensión fractal. Agregante IgM | 255 |
| 6.9.3.2. Obtención de la dimensión fractal. Agregante IgG | 259 |
| 6.10. Bibliografía | 271 |

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

| | |
|-------------------------|-----|
| 7.1. Conclusiones | 283 |
|-------------------------|-----|

APÉNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------------|-----|
| A.1. Símbolos y abreviaturas | 287 |
|------------------------------------|-----|

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

1.2 Bibliografía

1.1 Introducción

La Inmunología es una ciencia del ámbito de la salud y puede considerarse, simultáneamente, una rama de la Biología y de la Medicina. Su progreso a lo largo de este último siglo ha sido enorme, pasando de ser una actividad/ámbito de estudio relacionada con la vacunación y ciertas actividades serológicas, a una ciencia interdisciplinaria con una problemática y técnicas propias (1).

No existe un acuerdo general a la hora de determinar en que momento se inicia la inmunología, ya que algunos autores consideran que comienza con la primera vacunación de viruela realizada por Edward Jenner en 1796 (2), mientras que otros dan este honor a Jaques Pasteur (1822-1895). Este investigador fue el primero que sentó las bases de la respuesta inmunitaria, por lo que la inmunología entendida como una disciplina científica es muy reciente y tiene aproximadamente un siglo antigüedad.

Desde 1910 hasta 1950 los esfuerzos se centraron principalmente en la búsqueda de sueros inmunitarios y reactivos de diagnóstico: la llamada terapia sérica. Los sueros dejarían más tarde paso a las vacunas y antibióticos. Faltaba sin embargo, una síntesis unificadora que aclarase los procesos subyacentes a la respuesta inmune. A mitad de los cincuenta, la bioquímica y la genética conformaron la nueva ciencia de la biología molecular, de la que se ha beneficiado en gran medida la inmunología. En la actualidad no se considera como una simple rama de la medicina o de la biología, sino que se trata de una disciplina por derecho propio. Es potencialmente capaz de hacer una ingente aportación a la comprensión de los problemas centrales de la biología, especialmente a los concernientes a la naturaleza de la información genética y los mecanismos de síntesis de proteínas.

Una de las aplicaciones más importantes que tiene la inmunología son los denominados test inmunológicos o inmuno-ensayos, que en esta Memoria se denominarán también como ensayos, reactivos, diagnósticos o inmuno-diagnósticos. Estas pruebas surgen por la necesidad de saber si un individuo tiene o ha tenido una determinada enfermedad. Se trata por tanto de un método analítico basado en la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac) (3).

El anticuerpo es una proteína globular del plasma sanguíneo, mientras que un antígeno puede ser parte de un virus, bacteria o también un fragmento de una proteína o de un polisacárido. Cada Ac tiene una afinidad muy específica con el Ag concreto que estimula su producción. Ambas son normalmente moléculas de gran tamaño (4), aunque los lugares

de actividad química que ponen en combinación al antígeno y el anticuerpo, representan porciones relativamente pequeñas. Estas regiones de unión activa se denominan determinantes antigénicos o epítomos en el Ag y fragmentos específicos en el Ac. En la mayoría de los casos no existe una sola zona activa por molécula, sino que son multivalentes.

A la hora de estudiar la reacción Ag-Ac es necesario conocer cuales son las distintas interacciones que intervienen en la misma. Normalmente se dividen en dos grandes grupos (5), a) primarias, dentro de las cuales se encuentran las fuerzas de carácter culombiano y de van der Waals y b) secundarias, que están formadas por las hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y nuevamente las de van der Waals. Las primarias al ser de mayor alcance (más de 100 Å) tienen lugar de una manera relativamente rápida (segundos, minutos). Esta energía de unión sólo constituye un pequeño porcentaje del total. Por el contrario las secundarias, además de contribuir mayoritariamente a la energía de enlace, tienen un tiempo de acción muy prolongado, que puede ser de horas o incluso días. De la evaluación de la interacción primaria y secundaria se obtiene una información más o menos completa de la unión antígeno-anticuerpo. A la hora de estudiar esta reacción se definen los siguientes conceptos (6):

- ▶ Especificidad del anticuerpo. Se dice que un Ac es específico de un Ag, cuando los fragmentos específicos del anticuerpo sólo son complementarios de determinados epítomos de ese antígeno. La especificidad de un antisuero es la suma de la actuación de varios anticuerpos que reaccionan con distintas partes de la molécula de antígeno y también con diferentes zonas del mismo determinante.

- ▶ Afinidad del anticuerpo. Informa sobre la magnitud de la unión entre el epítomo de un Ag y un fragmento específico de un Ac. Se define como la sumatoria de todas las fuerzas atractivas y repulsivas puestas en juego. Para medir la afinidad de la unión determinante antigénico-fragmento específico, es necesario utilizar un antígeno monovalente y un epítomo aislado (hapteno).

- ▶ Avidéz. El Ag y el Ac son multivalentes en la mayoría de los casos. La avidéz es por tanto una medida de la afinidad que tiene en cuenta todas las uniones epítomo-fragmento específico.

Las interacciones, tanto primaria como secundaria, pueden variar dependiendo de las condiciones (pH, fuerza iónica, temperatura, etc) del medio de reacción. Todos estos parámetros deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar un inmuno-diagnóstico (3).

Actualmente, gracias a los grandes avances en biología molecular, informática, productos derivados del petróleo, tecnología láser, etc, los inmuno-ensayos se han diversificado enormemente. No se emplean sólo para detectar enfermedades, sino también para determinar drogas en sangre, hormonas, enzimas, proteínas del suero, pesticidas, etc.

Es posible clasificar y caracterizar a los inmuno-ensayos de acuerdo con un gran número de factores (7) aunque en la actualidad (8) los inmuno-diagnósticos se consideran divididos en cuatro grandes grupos, que son a) tipo de análisis (pruebas cuantitativas y cualitativas), b) muestra analizada (detección de antígenos o anticuerpos), c) condiciones del ensayo (fase líquida o líquida-sólida, lectura manual o automática) y finalmente d) sistema del inmuno-diagnóstico. Dentro de este último grupo están aquellos que utilizan una sustancia para detectar o aumentar la reacción, como partículas de poliestireno, eritrocitos humanos o de animales, ciertos colorantes, liposomas, enzimas, isótopos radiactivos, partículas radioactivas o magnéticas, etc. Esta clasificación no es excluyente, de manera que un diagnóstico puede estar incluido en más de un grupo, como es el caso de los inmuno-ensayos ópticos de soporte coloidal.

El hecho de que un antígeno y su anticuerpo correspondiente formen un agregado visible (ojo humano o instrumento óptico), es algo que se conoce desde principios de siglo (9). Inicialmente se trataban de unas pruebas donde el estado de agregación era determinado a "simple vista". Esto suponía utilizar una gran cantidad tanto de Ag como de Ac, por lo que se comenzó a emplear instrumentos ópticos (nefelómetros, turbidímetros, etc) para medir la reacción (10). Esto no sólo permite un ahorro importante de muestra, sino también la posibilidad de detectar niveles de agregación mucho menores. Sin embargo, hasta el año 1938 no hubo dispositivos lo suficientemente precisos (11-12) como para estudiar las reacciones inmunológicas.

A pesar de la gran ventaja que suponía el empleo de los instrumentos ópticos, aun era necesario un gran cantidad de muestra para detectar la aglutinación. Se planteó por tanto introducir algún agente externo capaz de incrementar la señal de respuesta. Como se dijo con anterioridad, una de estas sustancias es el látex (Ix) o más concretamente una suspensión coloidal de partículas de poliestireno, cuya primera utilización en un inmuno-ensayo data del año 1956 (13). La idea consiste en unir el Ag/Ac a las partículas de látex, de manera que en presencia del Ac/Ag correspondiente, los agregados que se forman son de mayor tamaño, por lo que resultan más fáciles de visualizar (dispersan más luz).

En todo inmuno-diagnóstico de lectura óptica, a la hora de analizar la respuesta suministrada por el instrumento (turbidez, intensidad, fluctuación de la luz, etc), no sólo es importante conocer los aspectos inmunológicos de la reacción (especificidad, afinidad,

avidez) sino también las distintas leyes físicas que rigen la dispersión de la luz. Como ya se verá más adelante (capítulo 2) dependiendo de las distintas condiciones ópticas de medida (tamaño de partícula, longitud de onda, índice de refracción, etc) las leyes aplicadas pueden ser diferentes (14, 15).

Otro aspecto interesante de analizar es el mecanismo de reacción que controla el proceso de agregación de las partículas y concretamente el de los complejos Ix-proteína. Este tema suscita un gran interés en la actualidad, tanto en el ámbito de la Física Coloidal como en el de la Inmunología (16, 17), sobre todo por el hecho de que en los sistemas coloidales los agregados crecen formando estructuras que pueden ser descritas mediante la teoría fractal (18). Se distinguen dos tipos de mecanismos, difusión o DLCA ("Diffusion Limit Cluster Aggregation") y reacción o RLCA ("Reaction Limit Cluster Aggregation"). Se dice que un proceso de agregación coloidal está controlado por difusión, cuando las fuerzas repulsivas entre las partículas son despreciables y la aglutinación está limitada por el tiempo que las partículas/agregados tardan en encontrarse por difusión. Por el contrario un proceso está controlado por reacción, cuando todavía existen fuerzas repulsivas entre las partículas. La aglutinación se encuentra limitada por el tiempo que utilizan los agregados en superar la barrera de energía repulsiva mediante activación térmica.

De todo lo anterior se deduce que un inmuno-ensayo óptico de soporte coloidal, es un sistema complejo de analizar ya que en él confluyen un gran número de factores, como son los inmunológicos, los ópticos o los relacionados con la estabilidad coloidal. Este es el propósito principal de la presente Tesis, que es intentar diferenciar la contribución que tienen los distintos parámetros del sistema.

El trabajo que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral, está incluido en un proyecto de investigación desarrollado entre Biokit S.A y el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, denominado "Diseño de un sistema óptico para inmuno-ensayos de aglutinación". El objetivo de este proyecto es estudiar las distintas variables ópticas, inmunológicas, del medio de reacción, etc que pueden afectar a la respuesta de un inmuno-diagnóstico óptico de soporte coloidal. El sistema elegido para llevar a cabo este estudio, es el del antígeno-anticuerpo heterófilo de Paul-Bunnell (Ac P-B). Mediante la detección del Ac P-B se puede saber si un individuo se encuentra afectado por la mononucleosis infecciosa (M.N.I). Seguidamente se presentan las principales características de esta enfermedad, como origen, síntomas, ruta de infección, etc, para a continuación pasar a describir las líneas de trabajo de esta Memoria y el contenido de cada uno de los capítulos.

La mononucleosis infecciosa está provocada por el virus de Epstein-Barr (19), que fue descubierto en el año 1964 por M. A. Epstein, B. G. Achong e Y. M. Barr. Se trata de un virus de la familia de los herpes y su distribución es prácticamente universal, por lo que la mayoría de los humanos tienen anticuerpos contra ese virus. En ciertas condiciones de inmuno-depresión puede también provocar dos tipos de cáncer, el linfoma de Burkitt o el carcinoma nasofaríngeo (20). Igualmente este virus está relacionado con ciertas enfermedades autoinmunes (21,22). En su forma clásica, la mononucleosis infecciosa provoca fiebre, amigdalitis, hinchazón de los nódulos linfáticos y engrosamiento de hígado y bazo. A pesar de su nombre no es altamente infecciosa, ya que no se han descrito epidemias de importancia. La mayoría de los enfermos son jóvenes; en los casos sin complicaciones, sigue un curso de una a cuatro semanas con una recuperación completa. Los enfermos que presentan complicaciones (encefalitis, neumonía y fallo renal) no llegan al uno por ciento y los fallos fatales son muy raros. El interés diagnóstico de la mononucleosis reside en que sus síntomas se asemejan al de muchas enfermedades, algunas graves, otras que precisan de una intervención quirúrgica o con implicaciones muy serias.

La ruta de infección a individuos no inmunes es a través de la boca y el tracto respiratorio, ya sea por el uso de vasos, cubiertos, etc contaminados, contacto oral íntimo (en el lenguaje coloquial se la denomina "enfermedad del beso") o por la inhalación de partículas víricas. En el curso de su evolución, el virus de Epstein-Barr ha establecido una simbiosis casi perfecta con su huésped humano, asegurando la supervivencia de ambos. Aunque la infección provoca una inmunidad permanente, el virus persiste en un estado latente en los linfocitos B del sistema linfático y se activa de manera espontánea en algunas células. Periódicamente son liberados en la saliva, lo que asegura la llegada del virus a los individuos no inmunes.

En muchas partes del mundo las infecciones del virus de Epstein-Barr ocurren en la primera edad; entonces no producen ninguna enfermedad significativa debido quizás a la inmadurez del sistema inmune. En un ambiente privilegiado con mejores condiciones higiénicas y un modo de vida propio del mundo desarrollado, las infecciones primarias por el virus se retrasan hasta el final de la infancia e incluso la adolescencia. Por este motivo la mononucleosis es una enfermedad propia de los países económicamente avanzados.

Una de las características más interesantes de la M.N.I es que en la mayoría de los casos (23), además de los anticuerpos frente a los antígenos del virus, los afectados desarrollan anticuerpos heterófilos. Reciben este nombre ya que son capaces de dar reacciones cruzadas con antígenos no relacionados procedentes de especies animales distintas. Los anticuerpos heterófilos específicos de la mononucleosis fueron descubiertos en 1932 por John R. Paul y W. W. Bunnell. Son de tipo IgM (capítulo 4), tienen la capacidad

de aglutinar los eritrocitos de ciertos mamíferos (buey, cordero, vaca, etc) y su presencia asegura casi en un 100% la existencia de mononucleosis infecciosa. A pesar de esto, la aparición del anticuerpo heterófilo es una cuestión que todavía no está clara, ya que no se ha encontrado relación entre su antígeno correspondiente (Ag P-B) y el virus de Epstein-Barr.

Cabe decir que los Ac de Paul-Bunnell no son los únicos heterófilos que existen, sino que hay de otros dos tipos, los Forsmann (24) y los Hanganutziu-Deicher (25).

Tal y como se dijo anteriormente, el objetivo de esta Tesis Doctoral es el análisis de las variables ópticas, inmunológicas y del medio de reacción que afectan a la agregación de los complejos Ix-Ag P-B. El antígeno está adsorbido sobre la superficie de las partículas de poliestireno, por lo que estas aglutinarán en presencia de los anticuerpos heterófilos de Paul-Bunnell. Para llevar a cabo este estudio, no sólo hay que tener en cuenta el fundamento inmunológico de la técnica, sino también las teorías físicas de dispersión de luz, estabilidad coloidal y de agregación. Por esta razón la unión entre los complejos Ix-Ag P-B y el Ac P-B se ha examinado desde dos puntos de vista diferentes:

La curva absorbancia-tiempo: variables del sistema

A partir de los datos generados por el turbidímetro, se ha encontrado un modelo matemático que permite determinar el valor asintótico de la reactividad (incremento de la absorbancia óptica) R_{\max} y la velocidad inicial de la reacción V_0 . Mediante este modelo es posible obtener la máxima información de las curvas absorbancia-tiempo. Los parámetros de ajuste R_{\max} y V_0 definen la reactividad del sistema, el primero a tiempo largo (valor asintótico) y el segundo en los primeros instantes de la reacción. Con el valor de R_{\max} se construyen las denominadas curvas de inmuno-aglutinación, con las que es posible evaluar el efecto que tienen las distintas variables que definen el sistema, como las propias del reactivo (tamaño de partícula, número de dispersores y recubrimiento), ópticas (longitud onda e índice de refracción) y del medio de reacción (pH, naturaleza del electrolito, fuerza iónica y viscosidad). Con la velocidad inicial V_0 , el estudio de las variables se realiza mediante una expresión teórica obtenida a partir de la cinética de Smoluchowski, donde los factores biológicos (recubrimiento y cantidad de aglutinante) están recogidos en el denominado factor de colisiones eficaces.

Todos estos experimentos y comprobaciones han sido previamente realizados por otros autores, como por ejemplo A. Kondo (26, 27), P. Price y J. Newman (28, 29), W. Norde (30), el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides (Universidad de Granada) (31, 32), etc, con distintos sistemas proteicos (IgG, albúmina, $F(ab)'_2$, etc) , tal y como se puede ver en las reseñas bibliográficas de este capítulo o a lo largo de la Memoria. Sin embargo, la mayor

novedad respecto a todos estos trabajos, es que en la presente Tesis casi todos los análisis (excepto el de la longitud de onda) se han llevado a cabo a partir del ajuste matemático de la curva absorbancia-tiempo. En ciertas condiciones, fijar un tiempo de medida supone un exceso de información, debido a que la reacción ya está terminada y en otros una falta, ya que todavía no ha acabado. Por tanto, al eliminar la variable tiempo se consigue obtener la máxima información de la curva de absorbancias. Como se verá en el capítulo 5, el ajuste teórico de los datos experimentales está siendo muy utilizado en la actualidad para todo tipo de inmuno-diagnósticos, aunque no se han podido encontrar trabajos para el caso concreto de un inmuno-ensayo óptico de soporte coloidal. Otra novedad, ha sido incluir el efecto del índice de refracción y de la viscosidad en el estudio de las variables del medio de reacción. Estos dos factores no se tienen en cuenta en la mayoría de los casos (29), aunque su contribución a la respuesta del sistema puede cambiar en gran medida los resultados.

Cinética y estructura de los agregados

Se determinará qué mecanismo, difusión o reacción, controla la unión entre los complejos [Ix-Ag P-B]-Ac P-B, tanto a tiempo corto (variación de V_0 con el número de partículas y la viscosidad) como largo (dimensión fractal). En el primer caso, a partir del modelo teórico que relaciona V_0 con los distintos parámetros del sistema, es posible calcular la constante de formación de dímeros k_f , y estudiar el cambio de esta constante con la viscosidad del medio de reacción. En el cálculo de la dimensión fractal se ha utilizado un método turbidimétrico que evalúa la variación de la absorbancia óptica durante la reacción con la longitud de onda.

Existe muy poca bibliografía sobre temas cinéticos y de morfología en un inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal, lo que ha supuesto modificar otros modelos para adecuarlos al caso concreto de la reacción [Ix-Ag P-B]-Ac P-B. Cuando la agregación se debe a la unión específica de un Ag y un Ac, la manera de analizar los sistemas cambia, ya que las teorías de estabilidad coloidal o de agregación dejan en muchos casos de cumplirse. Los complejos formados por el soporte y la proteína no se comportan como una partícula sola o una proteína aislada, sino que su unión confiere al complejo unas propiedades que pueden cambiar en función de la naturaleza de los materiales o de las características del medio. Por tanto, a la hora de evaluar los resultados cinéticos o de agregación, es necesario contemplar una serie de variables, como son la carga superficial del soporte o de la proteína, pH y fuerza iónica del medio, punto isoeléctrico de la proteína y naturaleza de la misma, tipo de electrolito, etc.

Esta Tesis Doctoral está dividida en los siguientes capítulos y apéndices:

- Capítulo 1.** Introducción.
- Capítulo 2.** Descripción de las leyes que rigen la dispersión de la luz: Rayleigh, Rayleigh-Gans-Debye y Mie. Sirven para interpretar correctamente los resultados obtenidos en un inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal.
- Capítulo 3.** Estudio de los mecanismos de reacción para el sistema [Ix-Ag P-B]-Ac P-B. Obtención de una ecuación cinética que permite evaluar el efecto que tienen los factores físicos-químicos (tamaño de partícula, viscosidad del medio, temperatura, etc) y biológicos (grado de recubrimiento, cantidad de aglutinante) sobre la velocidad inicial de las curvas absorbancia-tiempo. También se describe un método turbidimétrico para calcular la dimensión fractal de los agregados.
- Capítulo 4.** En este capítulo se describen todos los materiales e instrumentos utilizados a lo largo de esta Memoria.
- Capítulo 5.** Se exponen las técnicas de trabajo desarrolladas para la obtención de los complejos Ix-Ag P-B (sensibilización, bloqueo, sonicación, etc), así como también la puesta punto de los protocolos específicos de esta Tesis, como son el método turbidimétrico para la determinación del diámetro de partícula/agregado(razón de la absorbancia óptica a 340 y 600 nm) y el modelo matemático de las curvas de variación de la absorbancia óptica con el tiempo para distintas cantidades de anticuerpo. Gracias a este ajuste matemático se han obtenido dos parámetros, R_{max} y V_0 cuyo significado ya se ha comentado anteriormente.
- Capítulo 6.** En este capítulo se presentan y discuten los resultados experimentales de esta Memoria, que en líneas generales se pueden dividir en los siguientes bloques:

- ▶ Parámetros propios del reactivo. Estudio de la variación de R_{\max} y V_0 con el tamaño inicial de monómero, grado de recubrimiento y número de partículas. De todas estas condiciones se escogen aquellas consideradas como óptimas, elección que se realiza en base a la estabilidad coloidal de los complejos, especificidad, respuesta a baja concentración de aglutinante y rango de trabajo.
- ▶ Parámetros ópticos. Se examina el cambio de la reactividad con la longitud de onda y se busca la relación entre el tamaño de agregado y la longitud de onda (parámetro α) que de lugar a la máxima respuesta.
- ▶ Parámetros del medio de reacción. Se estudia como afectan a la coagulación los distintos parámetros del medio de reacción: pH, fuerza iónica y naturaleza del electrolito. Las fuerzas repulsivas de carácter coulombiano y las atractivas de van der Waals e hidrofóbicas entre otras, son las que determinan la unión antígeno-anticuerpo. Todas estas interacciones dependen directamente del pH, número de iones en el medio de reacción, tipo de sal del tampón, de la presencia de agentes que aumentan la velocidad de agregación, temperatura, etc. Dentro de este apartado también se ha puesto de manifiesto la importancia que tienen, a la hora de analizar los resultados, el índice de refracción y la viscosidad del medio.
- ▶ Cinética de reacción. Con los valores de V_0 y mediante la ecuación cinética deducida en el capítulo 3, se obtiene la denominada constante de agregación κ_f . Esta constante depende de factores tales como la temperatura, viscosidad del medio, grado de recubrimiento, cantidad de anticuerpo, etc y es una manera de expresar la probabilidad de unión entre dos monómeros para formar un dímero. La variación de κ_f con la viscosidad determina si la reacción entre el Ix-Ag P-B y Ac P-B está controlada por difusión o por reacción, al menos en los primeros instantes.
- ▶ Morfología de los agregados. Se ha calculado la dimensión fractal por el método turbidimétrico descrito en el capítulo 3. El valor de d_f determina cual es el mecanismo de aglutinación para tiempos elevados de medida. Dentro de este apartado se ha evaluado el efecto de la cantidad de agregante presente y de la naturaleza del mismo sobre la estructura de los agregados.

Capítulo 7. Se presentan los principales resultados de este trabajo y las conclusiones que se pueden extraer de los mismos.

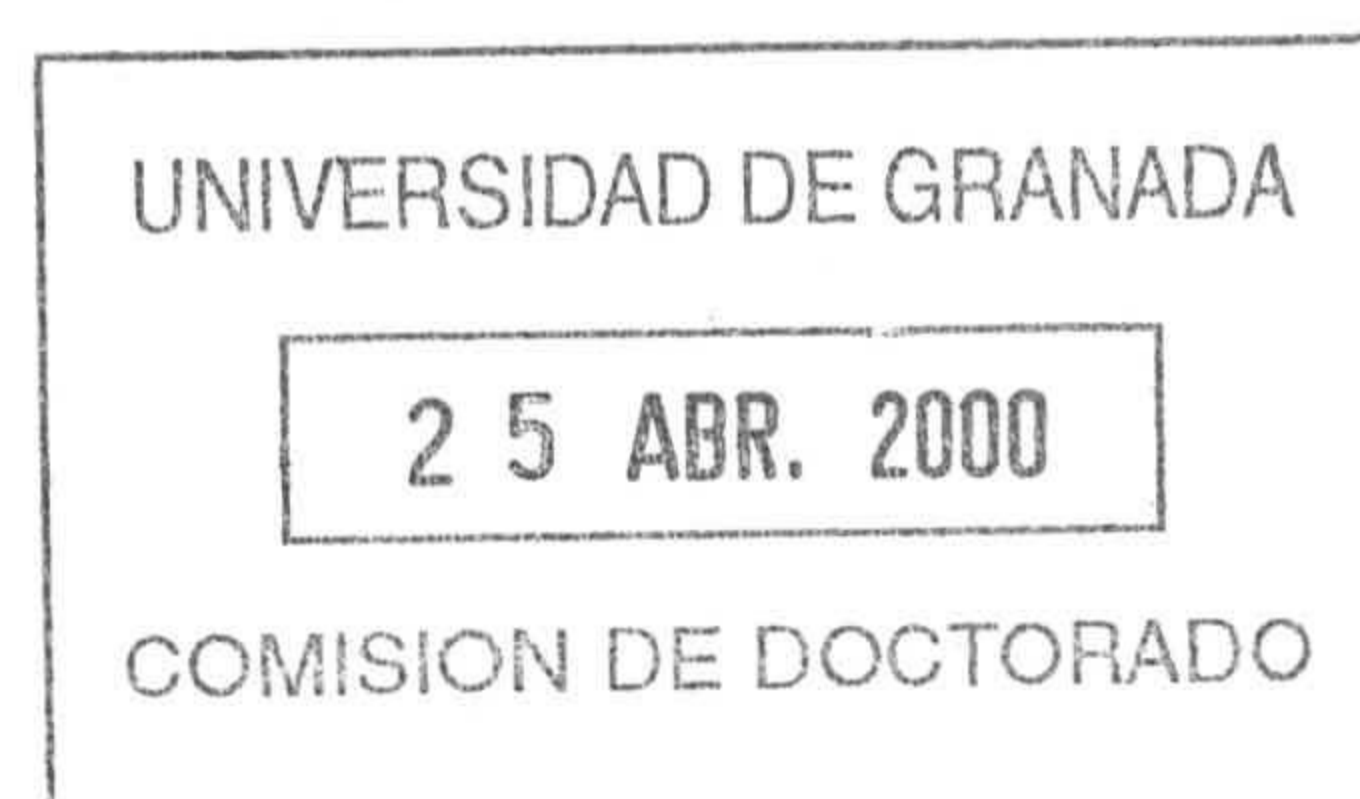
Apéndice 1. Lista de palabras clave y de símbolos.

1.2 Bibliografía

- (1) Stuman, O. Inmunología. Colección Nuevas Tendencias, C.S.I.C. Madrid, (1987).
- (2) Jenner, E: An Inquiry into the causes and effects of the variole vaccinae, disease discovered in some of the western countries of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the Cow Pox. Escrito del autor impreso por Samson Low, London, (1978).
- (3) Ekins, R. Immunoassay design and optimisation. In: Principles and Practice of Immunoassay. (Eds Price, C; Newman, D) 96, Stokton Press. New York, (1991).
- (4) Hasemann, C.A. Capra, J.D. Immunoglobulins: Structure and Function. Fundamental Immunology, 20 Edición, ed Raven Press Ltd, New York, (1989).
- (5) Van Oss, C.J; Good, R.J; Chaudhury, M.K. Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. J. Chromatog; 376, 111, (1986).
- (6) Roitt, I. M; Brostoff, J; Male, D. K. Immunology. Gover Medical Publishing. London - New York. 6.1, (1985).
- (7) Gosling, J.P. A decade of development in immunoassay methodology. Clin. Chem; 36, 1406, (1990).
- (8) Miyai, K. Classification of Immunoassay. In: Principles and Practice of Immunoassay. (Eds Price, C; Newman, D). 246, Stokton Press. New York, (1991).
- (9) Kraus, R. Ueber spezifische Reactionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus und Pestbouillonculturen, erzeugt durch homologes Serum. Wein Klin. Wochenschr; 10, 736, (1897).
- (10) McFarland, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and vaccines. J. Am. Med. Assoc; 69, 1176, (1907).

-
- (11) Libby, R. L. A new rapid quantitative technic for the determination of the potency of types I and II antipneumococcal serum. *J. Immunol*; 34, 269, (1938).
- (12) Libby, R.L. The photonreflectometer: an instrument for the measurement of turbid systems. *J. Immunol*; 34, 71, (1938).
- (13) Singer, J.M; Plotz, C.M. The latex fixation test I. application to the serologic diagnosis of rhemautoid arthritis. *Am. J. Med*; 21, 888, (1956).
- (14) Debye, P. Zerstreung Von Rontgerstrahlen. *Ann. Physik*; 46, 809, (1915).
- (15) Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, Speziell kolloidaler Metallosungen. *Ann :Physik*; 25, 377, (1908).
- (16) Shea, L. D; Omann, G. M; Linderman, J. J. Calculating of Diffusion-Limited Kinetics for the Reactions in Collision Coupling and Receptor Cross-Linking. *Biophysical J.* 73, 2494, (1997).
- (17) Stenberg, M. S; Werthen, M; Theander, S; Nygren, H. A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay. *J. Immunol. Meth*; 112, 23, (1988).
- (18) Sutaria, M; Sadana, A. Dual-Fractal Analysis for Antigen-Antibody Binding Kinetics for Biosensors Applications. *Biotechnol. Prog*; 13, 464, (1997).
- (19) Henle, G; Henle, W; Diehl V. Relation of Burkitt tumour associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc.Nat. Acad. Sci; USA* 59, 94, (1968).
- (20) Henle, W; Henle, G. Epstein-Barr virus and human malignancies. *Cancer*; 34, 1368, (1974).
- (21) Henle, W; Henle, G; Lennette, E.T. (1979). El virus de Epstein-Barr. *Inmunología. Libros de Investigación y Ciencia*; 261, Ed. Labor. Barcelona, (1983).
- (22) Vaughan, J. H; Valbracht, J.R; Nguyen M. N; Handley, H. H; Smith, R. S; Patrick, K; Rhodes, G.H. Epstein-Barr Virus-induce autoimmune Responses. I. Immunoglobulin M Autoantibodies to proteins Mimicking and Not Mimicking Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1. *J. Clin. Invest*; 95, 1306, (1995).

- (23) Paul J.R; Bunnell W.W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med. Sci*; 183, 80, (1932).
- (24) Forsman, J. Die Herstellung hochwertiger spezifischer Schäfähämolysine ohne Verwendung von Schafblut. *Biochem Z*; 37, 78, (1911).
- (25) Hanganutziu, M. Hemagglutinines heterogenetiques apres injection de serum de cheval. *C.R. Soc. Biol*; 91, 1457, (1929).
- (26) Kondo, A; Kawano, T; Fumio, I; Higashitani, K. Immunological agglutination kinetics of latex particles with physically adsorbed antigens. *J. Immunol. Meth*; 135, 111, (1990).
- (27) Kondo, A; Uchimura, S; Higashitani, K. Immunological Agglutination Behaviour of Latex Particles with Covalently Immobilized Antibodies. *J. Ferment. Bioeng*; 2, 164, (1994).
- (28) Newman, D. J; Henneberry, H; Price, P. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann. Clin. Biochem*, 29,22, (1992).
- (29) Morgan, C. L; Newman, D. J; Burrin, J. M; Price, C. P. The matrix effects on kinetics rate constants of antibody-antigen interactions reflects solvent viscosity. *J. Immunol. Meth*; 217, 51, (1998).
- (30) Norde, W; Zoungrana, T. Surface-induced changes in the structure and activity of enzymes physically immobilized at solid/liquid interfaces. *Biotechnol. Appl. Biochem*; 28, 133, (1998).
- (31) Molina-Bolivar, J. A. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, (1999).
- (32) Peula-Garcia, J.M. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, (1995).





CAPÍTULO 2

TEORÍAS DE DISPERSIÓN DE LUZ: RAYLEIGH, RAYLEIGH-GANS-DEBYE Y MIE

2.1 Introducción

2.2 Teoría de Rayleigh

2.3 Teoría de Rayleigh-Gans-Debye

2.4 Teoría de Mie

2.5 Luz dispersada por una colectividad de esferas

2.6 Comparación entre las tres teorías

2.7 Bibliografía

2.1 Introducción

Para poder interpretar correctamente los resultados de un inmuno-diagnóstico de soporte coloidal, es necesario conocer cuales son las leyes que rigen la dispersión de luz en este tipo de sistemas. Este es el objetivo del presente capítulo, donde se mostrarán brevemente las tres teorías clásicas de dispersión, Rayleigh, Rayleigh-Gans-Debye (RGD) y Mie. Aunque todas se deducen a partir de las ecuaciones de Maxwell, las hipótesis de partida son diferentes en cada caso, lo que determina los rangos de validez de las mismas (1).

Como punto de partida de las tres teorías se estudia la dispersión de luz de una esfera no conductora, isotrópica y homogénea, cuando es iluminada con un haz de luz monocromática y polarizada plana. La radiación está producida por la inducción de dipolos (desplazamiento de los electrones) en la superficie de la esfera.

2.2 Teoría de Rayleigh

2.2.1. Luz radiada por una esfera. Sección eficaz de dispersión

La hipótesis fundamental es que las partículas tienen un tamaño mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente (1). De esta forma el campo electromagnético instantáneo es uniforme en toda la esfera. En este caso se estudia solo el campo eléctrico, ya que la onda dispersada así como la incidente son transversales electromagnéticas (T.E.M). En este tipo de radiación, el campo eléctrico y magnético están relacionados mediante la impedancia característica del medio Z_0

$$Z_0 = \frac{|\vec{E}|}{|\vec{H}|} \quad [2.1]$$

donde \vec{E} y \vec{H} son los vectores campo eléctrico y magnético respectivamente. Z_0 se relaciona con la permeabilidad magnética μ y la constante dieléctrica ϵ_c mediante la

expresión

$$Z_0 = \sqrt{\frac{\mu}{\epsilon_c}}, \quad \epsilon_c = \epsilon \left(1 - \frac{i\sigma}{\omega\epsilon}\right) \quad [2.2]$$

siendo ϵ la constante dieléctrica del medio a altas frecuencias, σ la conductividad y ω la frecuencia angular de la onda.

Dentro de la esfera aparecerá un campo \vec{E}_p uniforme y paralelo al externo \vec{E}_0 dado por

$$\vec{E}_p = \frac{3 \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2 \epsilon_2} \vec{E}_0 \quad [2.3]$$

donde ϵ_1 y ϵ_2 son las constantes dieléctricas de la esfera y del medio respectivamente, mientras que en el exterior, el campo eléctrico está compuesto de dos partes, del inicial \vec{E}_0 más el inducido por la esfera. Este último se debe a la variación temporal del momento dipolar \vec{P} , que se expresa como:

$$\vec{P} = 4\pi\epsilon_2 R^3 \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2} \vec{E}_0 \quad [2.4]$$

siendo R el radio de la partícula. Las expresiones del campo eléctrico y magnético de radiación resultan:

$$\vec{E} = \frac{\mu_0}{4\pi r} \left(\frac{d^2\vec{P}}{d^2t} \wedge \vec{n} \right) \quad [2.5]$$

$$\vec{H} = \frac{1}{4\pi r} \left(\frac{d^2\vec{P}}{d^2t} \wedge \vec{n} \right)$$

donde v es la velocidad de propagación, \vec{n} un vector unitario en el sentido y dirección de la propagación de la radiación y r el módulo del vector de posición, tal y como se puede ver en la figura 2.1. En esta figura se presenta un esquema de la dispersión de Rayleigh, donde la esfera está centrada en un sistema de coordenadas esféricas y la radiación incidente se propaga a lo largo del eje Z . La dirección de la onda dispersada está definida por los ángulos polares θ y ϕ .

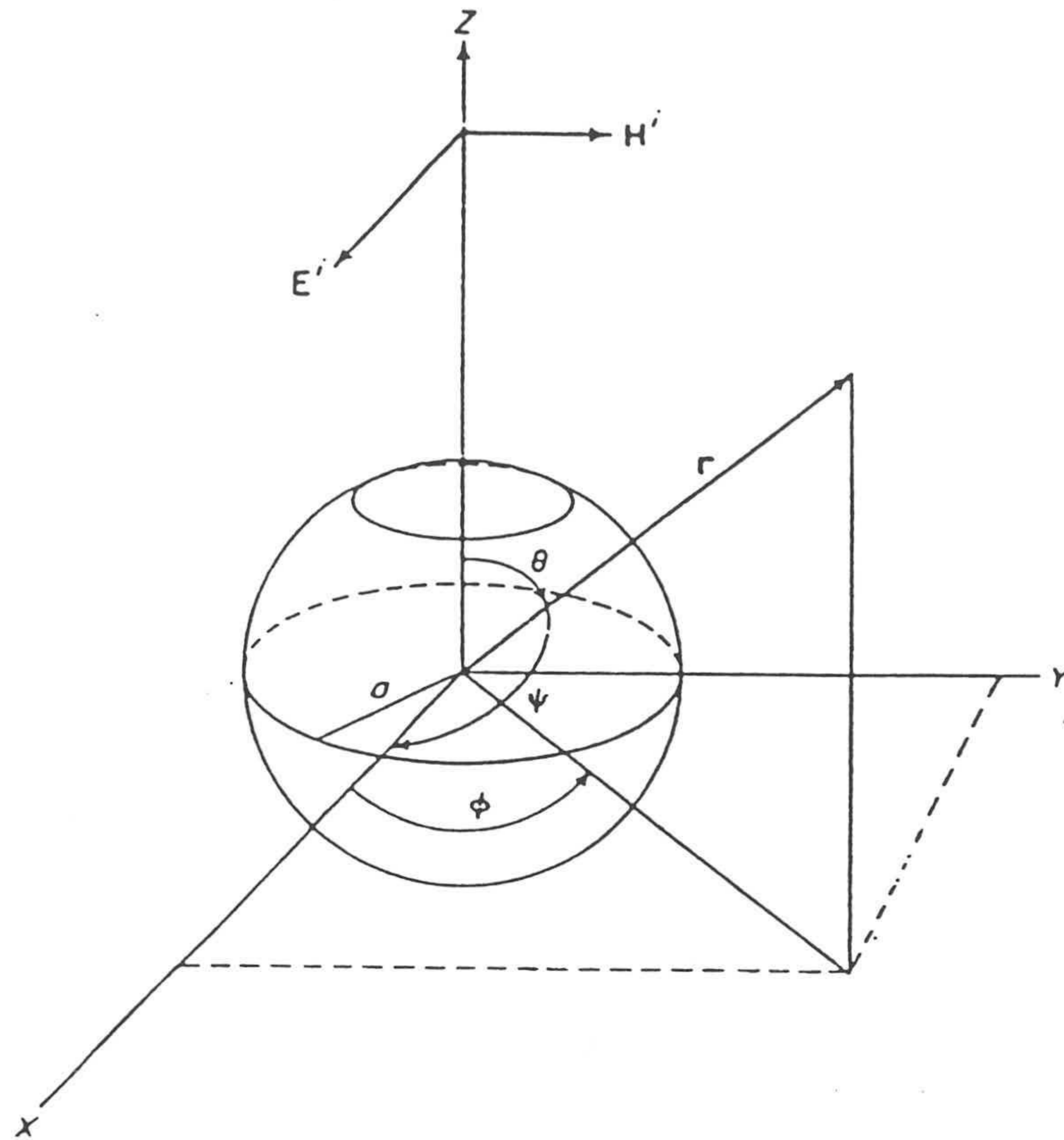


Figura 2.1. Esfera dispersora centrada en un sistema de coordenadas esféricas (1).

A la hora estudiar la dispersión, más que el campo eléctrico se utiliza la intensidad de la luz dispersada I , cuya relación con \vec{E} viene dada por:

$$I = (2 Z_0)^{-1} |\vec{E}|^2 \tag{2.6}$$

A partir de las expresiones [2.5] y [2.6] se obtiene

$$I = \frac{16\pi^4 R^6}{r^2 \lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \text{sen}^2 \psi \tag{2.7}$$

donde R es el radio de la esfera, λ la longitud de la onda incidente en el medio y ψ el ángulo formado por el eje de coordenadas paralelo al vector eléctrico de la onda incidente y la

dirección de observación (figura 2.1). n se define como el cociente entre el índice de refracción de la esfera n_e y el del medio n_m . En la mayoría de los experimentos de esta Memoria, n es aproximadamente igual a 1.20, ya que el índice de refracción del poliestireno y del agua a 570 nm es 1.592 y 1.333 respectivamente. λ es igual al cociente entre la longitud de onda en el vacío λ_0 y n_m .

Para calcular la energía total radiada por una esfera en todas las direcciones, se integra la expresión [2.6] empleando una superficie esférica centrada en el dispersor y situada lejos del mismo

$$C_{sca} = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} I r^2 \sin\psi \, d\phi d\psi \quad [2.8]$$

donde C_{sca} recibe el nombre de sección eficaz de dispersión de la partícula (tiene dimensiones de superficie). Tras la integración resulta

$$C_{sca} = \frac{24\pi V^2}{\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad [2.9]$$

siendo V el volumen de la partícula. El producto de C_{sca} por la intensidad de la luz incidente da como resultado la energía total dispersada por la esfera.

El factor de eficacia Q_{sca} de dispersión se obtiene dividiendo C_{sca} por la sección geométrica de la partícula (πR^2). Q_{sca} representa la fracción de energía por unidad de superficie que se dispersa en todas las direcciones. Para un dispersor de Rayleigh queda

$$Q_{sca} = \frac{8}{3} \alpha^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad [2.10]$$

donde α es un factor adimensional definido como $2\pi R/\lambda$ o $2\pi R n_m/\lambda_0$. α será de gran utilidad a la hora de estudiar los rangos de validez de las distintas teorías. C_{sca} y Q_{sca} son características del dispersor que no dependen de la radiación incidente (polarizada o no polarizada).

2.3 Teoría de Rayleigh-Gans-Debye

2.3.1 Hipótesis de partida. Intensidad de luz dispersada por una esfera

En la teoría de Rayleigh-Gans-Debye (RGD) las hipótesis de partida son las siguientes (1):

- ▶ La esfera dispersora es extensa respecto a la longitud de onda de la radiación incidente, por lo que se inducen un gran número de dipolos.
- ▶ El índice de refracción complejo m de las esferas relativo al medio se aproxima a 1 ($m-1 \ll 1$) y por tanto

$$\frac{4\pi R}{\lambda_0} |m-1| \ll 1 \quad [2.11]$$

En la teoría de Rayleigh se utilizaba n , la parte real de m .

- ▶ La fase asociada a cada centro dispersor está determinada únicamente por la posición de cada elemento de volumen y es independiente de la naturaleza del objeto dispersor.

Para calcular la luz dispersada por una partícula, se divide la esfera en varios elementos de volumen. De estos se eligen dos, a los que se aplica la teoría de Rayleigh. Suponemos que ambos elementos no están perturbados por los demás. Al igual que antes, la radiación emitida depende de la posición del plano de observación respecto de la luz incidente (ver figura 2.1). La luz dispersada viene dada en este caso mediante la expresión:

$$I = \frac{K^4 V^2}{4\pi^2 r^2} (m-1)^2 \sin^2 \psi P(\theta) \quad [2.12]$$

donde K es igual a $2\pi/\lambda$ y $P(\theta)$ el denominado factor de forma (3),

$$P(\theta) = \frac{1}{V^2} \left| \int e^{i\delta} dV \right|^2 \quad [2.13]$$

cuya expresión en el caso de esferas homogéneas se presentará a continuación.

2.3.2 Sección eficaz de dispersión y factor óptico. Monómeros y dímeros.

La teoría RGD permite calcular la sección eficaz de dispersión de los monómeros y de otras especies superiores, sin aplicar ningún tipo de aproximación, como puede ser la de coalescencia. La coalescencia supone que los dímeros tienen un volumen doble que el de los monómeros, por lo que su radio es 1.26 veces el del monómero. Esta aproximación se puede utilizar en un rango de α relativamente alto, tal y como se verá al comparar el factor óptico para la teoría RGD y la de Mie (apartado 2.6).

Para esferas homogéneas, el factor de forma tiene la siguiente expresión

$$P(\theta) = \frac{9\pi}{2u^3} J_{3/2}^2(u) \quad [2.14]$$

donde $J_{3/2}(u)$ es la función de Bessel de orden 3/2 de u , siendo $u=2\alpha\text{sen}(\theta/2)$. Finalmente, la sección eficaz de dispersión de los monómeros (C_1) y los dímeros (C_2) viene dada por (2)

$$C_1 = \frac{4\pi R^2}{9} \alpha^4(m-1)^2 \int_0^\pi P(\theta) (1+\cos^2\theta) \text{sen}\theta \, d\theta \quad [2.15]$$

$$C_2 = \frac{8\pi R^2}{9} \alpha^4(m-1)^2 \int_0^\pi P(\theta) \left(1 + \frac{\text{sen}2u}{u}\right) (1+\cos^2\theta) \text{sen}\theta \, d\theta$$

A partir de C_1 y C_2 se define el factor óptico F_{op} como

$$F_{op} = \frac{C_2}{2C_1} - 1 \quad [2.16]$$

El factor óptico es una forma de comparar la luz dispersada por un dímero y la de un monómero. Es siempre menor que 1 y solo tiende a 0 para valores altos de α , donde la influencia del factor de forma es mucho menor y un dímero dispersa como dos veces un monómero. El factor óptico y más concretamente $C_1 \cdot F_{op}$, se utiliza en el cálculo de la constante de formación de dímeros k_f , como se verá en el capítulo siguiente y en el de resultados.

A partir de la expresión de C_1 , o lo que es lo mismo C_{sca} , se puede evaluar como varía la luz dispersada por un sistema en función del índice de refracción relativo al medio. En la figura 2.2 se presenta la variación de C_1 para tres valores diferentes de m , 1.1, 1.2 y 1.3. Se observa que la luz dispersada es creciente con m , por lo que un aumento de n_m del medio manteniendo constante n_e , implica un descenso del valor de la absorbancia óptica del sistema. Todo esto se ha podido comprobar a nivel experimental (capítulo de resultados), al trabajar con tampones de reacción de diferente n_m .

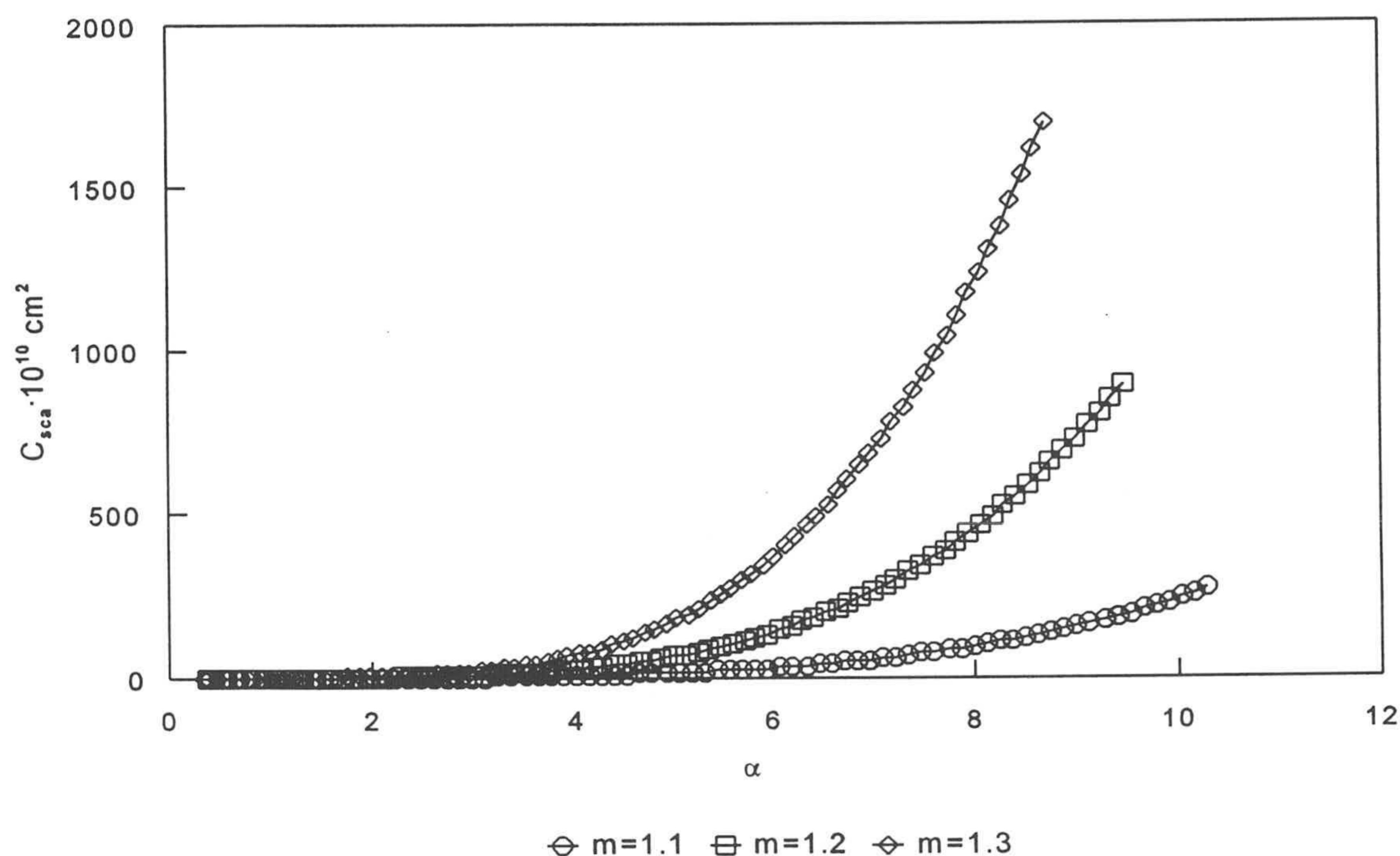


Figura 2.2. Teoría RGD. Variación de la sección eficaz de los monómeros (C_{sca}) en función del índice de refracción complejo del medio m (1.1, 1.2 y 1.3).

El rango de validez de la teoría RGD se establece al compararla con la de Mie (apartado 2.6), ya que esta última no tiene limitaciones sobre el tamaño del elemento dispersor o del índice de refracción del medio.

2.4 Teoría de Mie

Es la teoría de dispersión más general, ya que se establece a partir de la resolución directa de las ecuaciones de Maxwell para el campo electromagnético (1, 2), lo que supone realizar un gran número de cálculos. En este apartado no se presentan dichos cálculos, sólo los resultados que se consideran más importantes y que sirven para comparar esta teoría con las otras dos.

Aplicando una serie de condiciones de contorno (1), se encuentra la solución exacta de la dispersión de una onda electromagnética plana provocada por una esfera homogénea, isotrópica y de tamaño arbitrario (figura 2.1). Las componentes perpendicular I_{per} y paralela I_{par} al plano de observación, definido por la dirección de observación y el plano de polarización de la luz incidente, tienen las siguientes expresiones

$$\begin{aligned} I_{per} &= \frac{\lambda^2}{4\pi^2 r^2} |S_1(\theta)|^2 \sin^2 \phi \\ I_{par} &= \frac{\lambda^2}{4\pi^2 r^2} |S_2(\theta)|^2 \cos^2 \phi \end{aligned} \quad [2.17]$$

donde θ y ϕ son los ángulos polares que definen la dirección de la onda dispersada (figura 2.1) y siendo

$$\begin{aligned} S_1(\theta) &= \frac{\lambda^2}{4\pi^2 r^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \left(a_n \frac{P_n^{(1)}(\cos\theta)}{\sin\theta} + b_n \frac{dP_n^{(1)}(\cos\theta)}{d\theta} \right) (-1)^{n+1} \\ S_2(\theta) &= \frac{\lambda^2}{4\pi^2 r^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \left(a_n \frac{dP_n^{(1)}(\cos\theta)}{d\theta} + b_n \frac{P_n^{(1)}(\cos\theta)}{\sin\theta} \right) (-1)^n \end{aligned} \quad [2.18]$$

$P_n^{(1)}(x)$ son las funciones asociadas de Legendre, mientras que a_n y b_n son dos funciones complejas cuya resolución implica a las funciones de Bessel y Neumann.

Si el índice de refracción del medio es complejo, las partículas, además de dispersar, absorben la luz. En este caso se utiliza la sección eficaz de extinción C_{ext} que es igual a la suma de la sección eficaz de dispersión C_{sca} y de absorción C_{abs} . Las expresiones para C_{sca} y C_{ext} son

$$C_{sca} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} 2(n+1)[|a_n|^2 + |b_n|^2] \tag{2.19}$$

$$C_{ext} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} 2(n+1)[Re(a_n + b_n)]$$

donde Re indica la parte real de la suma.

El factor de eficacia Q_{sca} (figura 2.3) para la teoría de Mie, muestra un comportamiento oscilatorio frente a α ($m=1.20$), fenómeno que no aparece en las dos otras teorías. A partir de un determinado valor de α (~ 10) la dispersión sube y baja hasta que tiende asintóticamente a 2, lo que indica que la sección eficaz de dispersión es dos veces la geométrica. De la figura 2.3 también se deduce que dos monómeros con tamaños diferentes pueden dar lugar a un misma absorbancia óptica (4). Esto se ha comprobado a nivel experimental, tal y como se observa en la figura 2.4 o en los resultados del capítulo 6 (apartado 6.4.1).

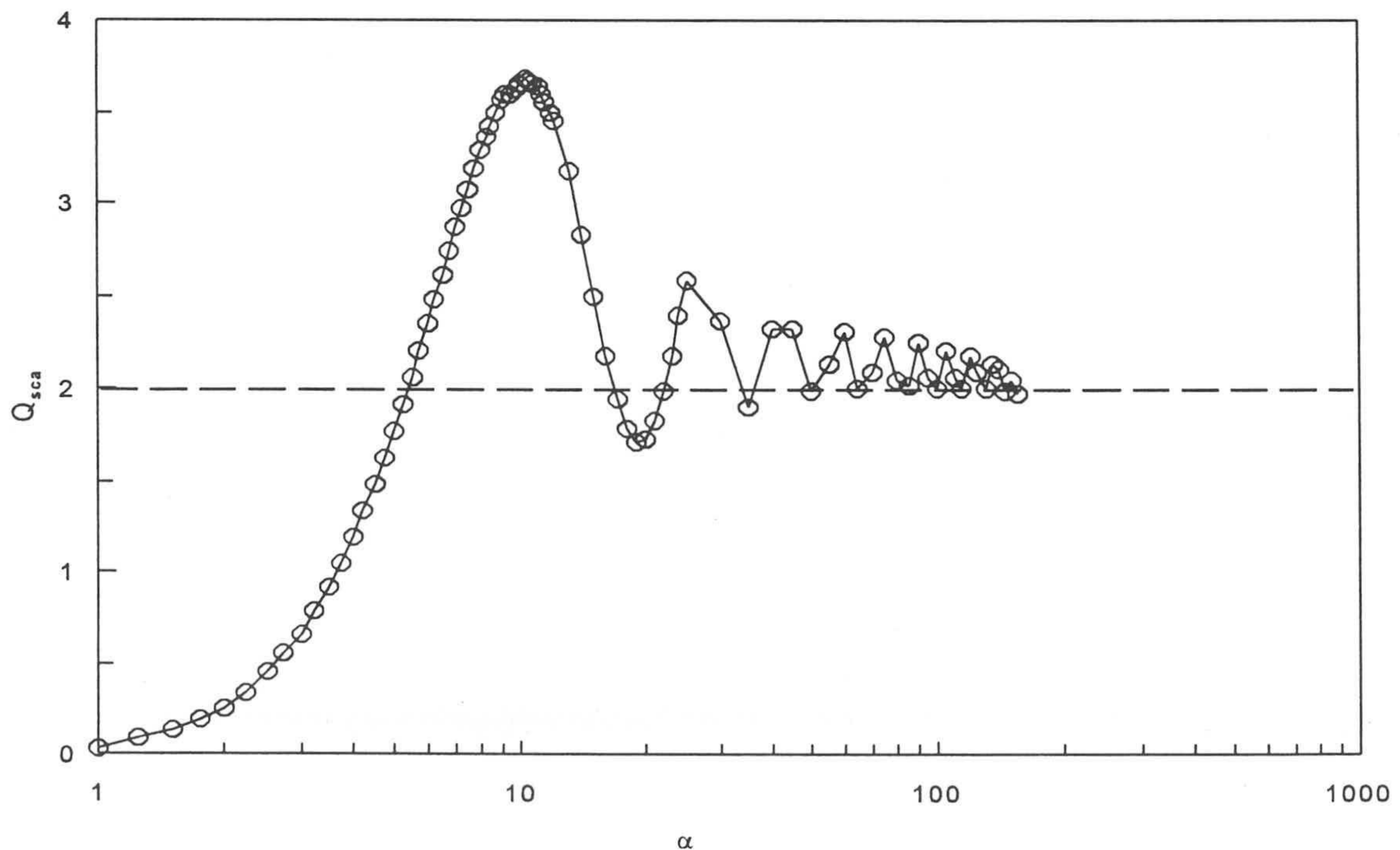


Figura 2.3. Teoría de Mie ($m=1.2$). Variación del factor de eficacia Q_{sca} con α .

2.5 Luz dispersada por una colectividad de esferas

Dentro de este apartado se presentarán varias maneras de evaluar la luz dispersada por una colectividad de esferas, como son la transmitancia óptica, turbidez y absorbancia óptica. En todas ellas se puede utilizar cualquiera de las teorías, basta con sustituir C_{sca} por su expresión correspondiente, tal y como se verá más adelante.

La luz dispersada por una colectividad de esferas es incoherente, ya que es el resultado de la superposición espacio temporal de la luz radiada por cada una de las partículas. En el caso concreto de una muestra de N monómeros iguales contenidos en una célula de medida de paso óptico l , la atenuación de la intensidad de luz por unidad de volumen debida a la dispersión se puede expresar como

$$-\frac{dI}{dx} = N C_{sca} I \quad [2.20]$$

donde x varía entre 0 y l . Integrando [2.20] resulta

$$I = I_0 \exp(-NC_{sca}l) \quad [2.21]$$

siendo I_0 la intensidad de la luz incidente e I la intensidad de la luz observada tras atravesar la muestra. A partir de aquí se pueden definir una serie de magnitudes, como son

► Transmitancia óptica (T). No es más que la razón entre la intensidad de la luz observada I y la incidente I_0

$$T = \frac{I}{I_0} = \exp(-NC_{sca}l) \quad [2.22]$$

► Turbidez (τ). Es el coeficiente de atenuación de la expresión [2.21] y se interpreta como la energía total dispersada por unidad de volumen para una intensidad de luz incidente unidad. Es una magnitud independiente del estado de polarización de la luz. La turbidez de una muestra de N esferas iguales se expresa en función de la transmitancia de la siguiente

manera

$$\tau = C_{sca} N = -\frac{1}{l} \ln T = \frac{1}{l} \ln \frac{I_0}{I} \quad [2.23]$$

mientras que en el caso de un sistema polidisperso viene dado por

$$\tau = \sum_i C_i N_i \quad [2.24]$$

donde C_i y N_i son la sección eficaz de dispersión de los agregados formados por i monómeros y su concentración respectivamente.

► Absorbancia óptica (A o Abs). Se trata del menos logaritmo decimal de la transmitancia

$$A = -\log T \quad [2.25]$$

Esta magnitud es de gran interés, ya que habitualmente es la que suministran los espectrofotómetros. Tal como se verá más adelante (capítulo de métodos y resultados), a partir de la curva absorbancia-tiempo es posible obtener una gran cantidad de información sobre el sistema reaccionante, como la reactividad (incremento de absorbancia), velocidad inicial, constante de formación de los dímeros, etc. Finalmente, la relación entre τ y A viene dada por:

$$\tau = \frac{1}{l} \ln 10^{-A} \approx \frac{2.3}{l} A \quad [2.26]$$

Vease que la turbidez y la absorbancia óptica expresan lo mismo, con la diferencia de que τ es por unidad de longitud (paso de luz de la cubeta) mientras que A es adimensional.

A partir de las ecuaciones [2.9] (Rayleigh), [2.15] (RGD) y [2.19] (Mie) resulta

$$\tau = \frac{24\pi^3 NV^2}{\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \text{ (Rayleigh)}$$

$$\tau = \frac{4\pi NR^2}{9} \alpha^4 (m-1)^2 \int_0^\pi P(\theta) (1 + \cos^2\theta) \sin\theta \, d\theta \text{ (RGD)} \quad [2.24]$$

$$\tau = \frac{\lambda^2 N}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} 2(n+1) [|a_n|^2 + |b_n|^2] \text{ (Mie)}$$

De estas expresiones se deduce que dos sistemas pueden tener la misma turbidez/absorbancia, aunque su distribución de tamaños sea diferente. Todo esto se ve con mayor claridad a partir de la expresión de Rayleigh, lo que también se comprueba con la RGD o la de Mie (ver figura 2.3). Si el aumento de diámetro está compensado por un descenso en número de partículas (NV^2 constante), la luz dispersada será la misma. Un ejemplo de esto es la figura 2.4, donde se presenta un experimento realizado a tres longitudes de onda diferentes, 400, 600 y 800 nm, con unas partículas de poliestireno cuyos diámetros varían entre 100 y 3000 nm (3). Vease como a una misma longitud de onda dos monómeros con distinta concentración pueden tener igual absorbancia. Este fenómeno sirve para interpretar la mayor parte de las curvas de reactividad de esta Memoria, como se comprobará en el capítulo de resultados.

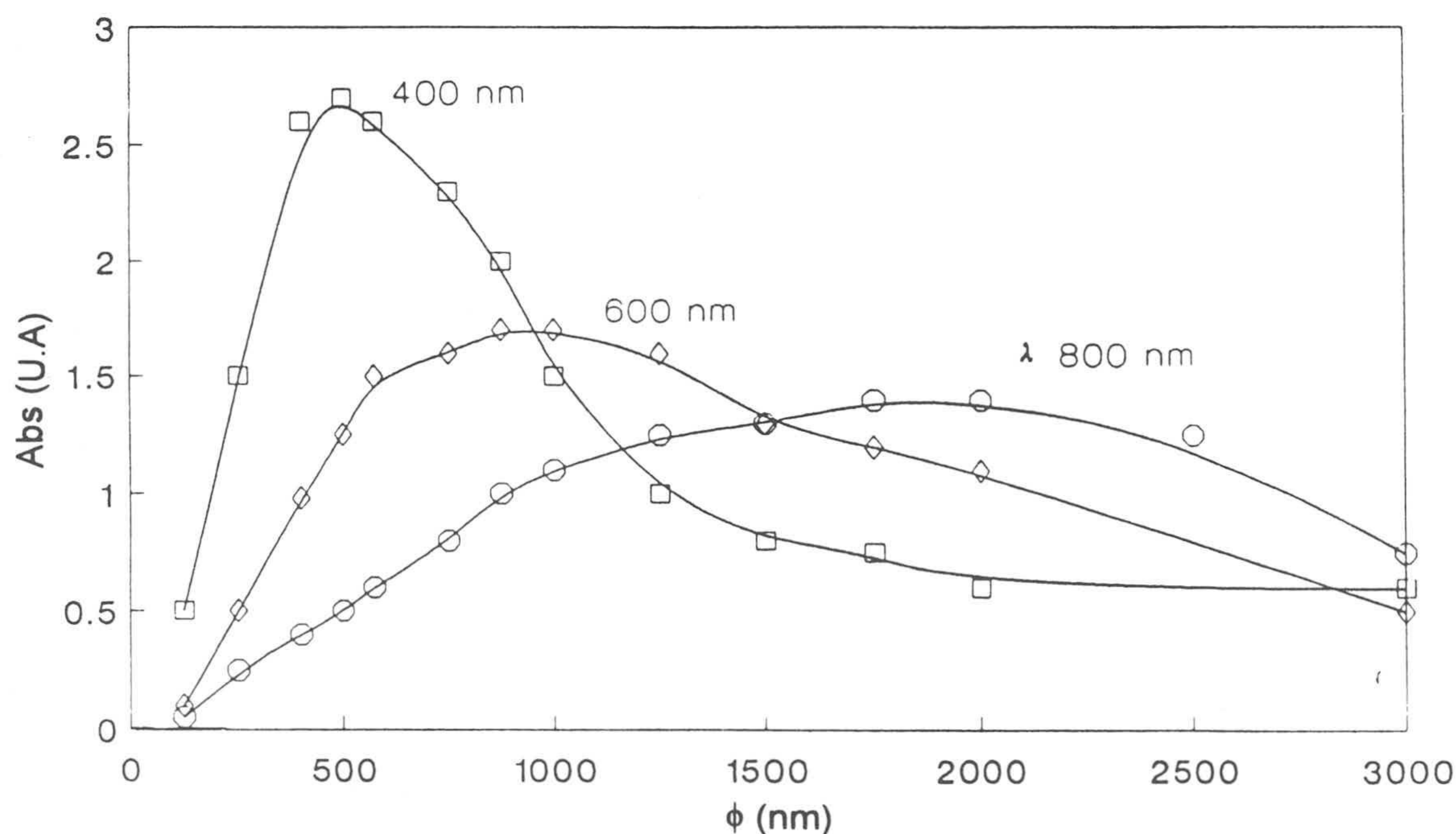


Figura 2.4. Variación de la luz dispersada a tres λ_0 , 400, 600 y 800 nm, para monómeros a distintas concentraciones, con tamaños comprendidos entre 100 y 3000 nm (3).

2.6 Comparación entre las tres teorías

Este apartado tiene por objetivo establecer el rango de validez de la teoría de Rayleigh y RGD respecto a la de Mie, debido a que esta última no tiene limitaciones con el diámetro del dispersor o con índice de refracción del medio. Se analizarán las variaciones de C_1 y C_2 con α , ya que estos dos parámetros son los más se utilizan en esta Memoria, como por ejemplo en el factor óptico (capítulos 3 y 6), en el método turbidimétrico para la determinación de tamaños (capítulo 5), etc.

En la gráfica 2.5 se presenta la sección eficaz de dispersión C_1 ($m=1.20$) en función de α (0.4-7) para las tres teorías, Rayleigh, Rayleigh-Gans-Debye y Mie. Vease como los valores de C_{sca} convergen conforme decrece α , lo que está de acuerdo con las hipótesis de partida de cada una de ellas. La teoría de Rayleigh es válida solo cuando la longitud de onda es mucho mayor que el tamaño de la partícula (α muy pequeñas), mientras que la RGD tiene un mayor acuerdo con la de Mie en un amplio rango de α (0.4 a ~5.5-6). Las diferencias en este tramo fluctúan alrededor del 15 % y son del 25% como máximo, lo que no se puede apreciar en la gráfica debido a la escala numérica. En este rango de α , la sección eficaz de dispersión de Mie es siempre mayor que la RGD (3), tendencia que se invierte cuando α llega a 5.5. La mayor desigualdad dentro del tramo 0.4~5.5 se produce para un α alrededor de 2, que es donde la teoría de Mie fluctúa más, como también han determinado otros autores (1, 3). A partir de $\alpha \sim 5.5$ la diferencia entre la RGD y la de Mie comienza a aumentar progresivamente, hasta llegar a ser del 50% cuando α vale 10 (último dato computado). A pesar de las variaciones en el tramo 0.4~5.5, se puede considerar que ambas teorías tienen una coincidencia relativamente buena, teniendo en cuenta que los valores de C_1 se han obtenido mediante una integración numérica en el caso de la RGD, o por interpolación no lineal de los datos de las tablas de Heller y Pangonis (4) para la teoría de Mie. Por consiguiente, la teoría RGD es suficiente como para estudiar los sistemas monodispersos con los que se ha trabajado en esta Memoria, ya que el mayor valor de α es 1.56 (RP-214, $\lambda_0=570$ nm).

Respecto a la sección eficaz de los dímeros (figura 2.6), el comportamiento es bastante diferente al de la gráfica 2.5. Con Rayleigh y Mie se ha aplicado la hipótesis de coalescencia, por lo que sólo en la teoría de Rayleigh-Gans-Debye se puede hablar de "dímeros reales", donde la luz dispersada depende del factor de forma. En casi todo el rango de α la C_2 real es mayor que la de coalescencia y sólo es similar para valores de α muy pequeños (<0.4). Tal y como sucedía con los monómeros, el rango de validez de la teoría de Rayleigh continúa siendo muy corto ($\alpha < 1$).

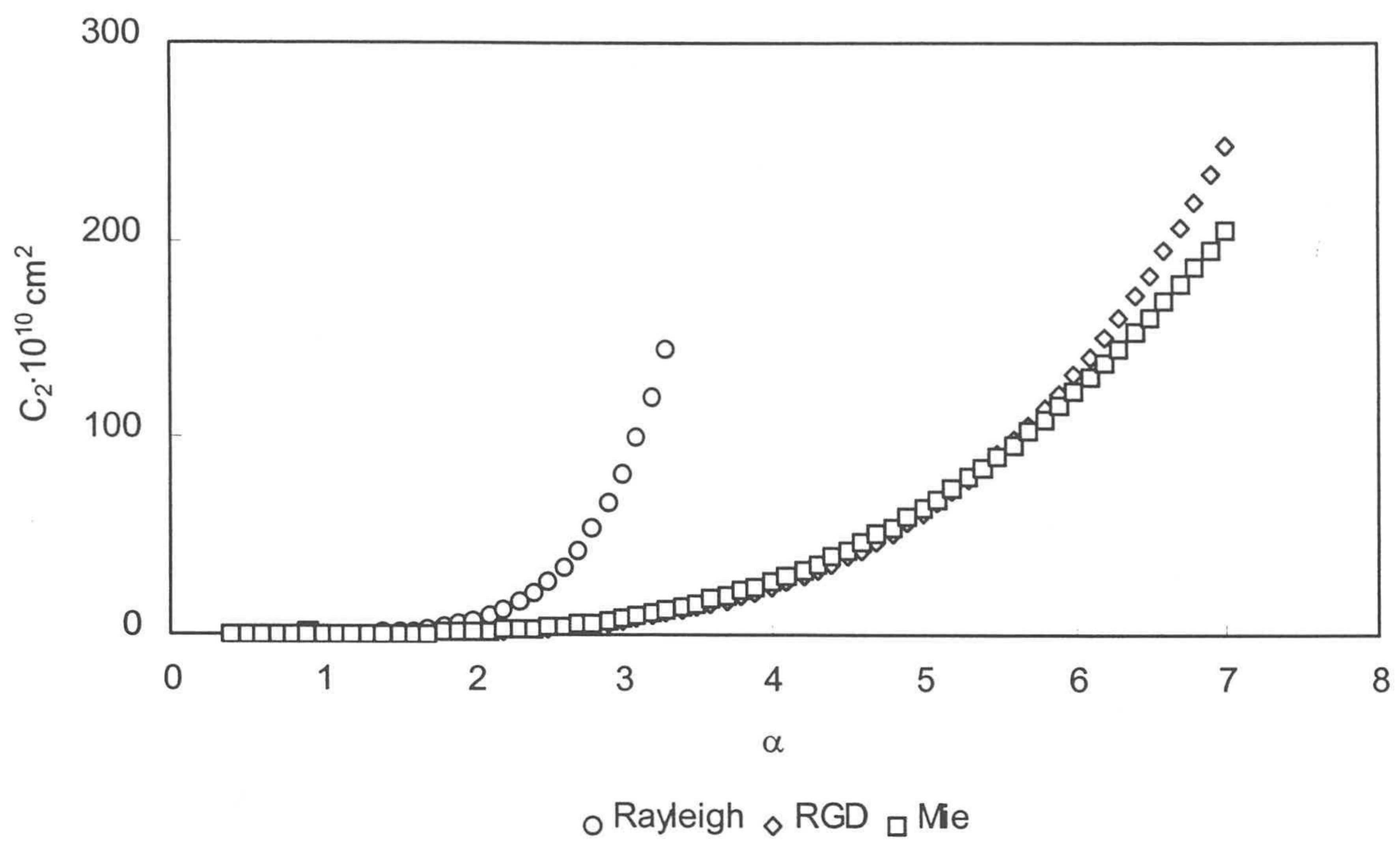


Figura 2.5. Sección eficaz de dispersión de los monómeros (C_1) para las teorías de Rayleigh, RGD y Mie ($m=1.2$).

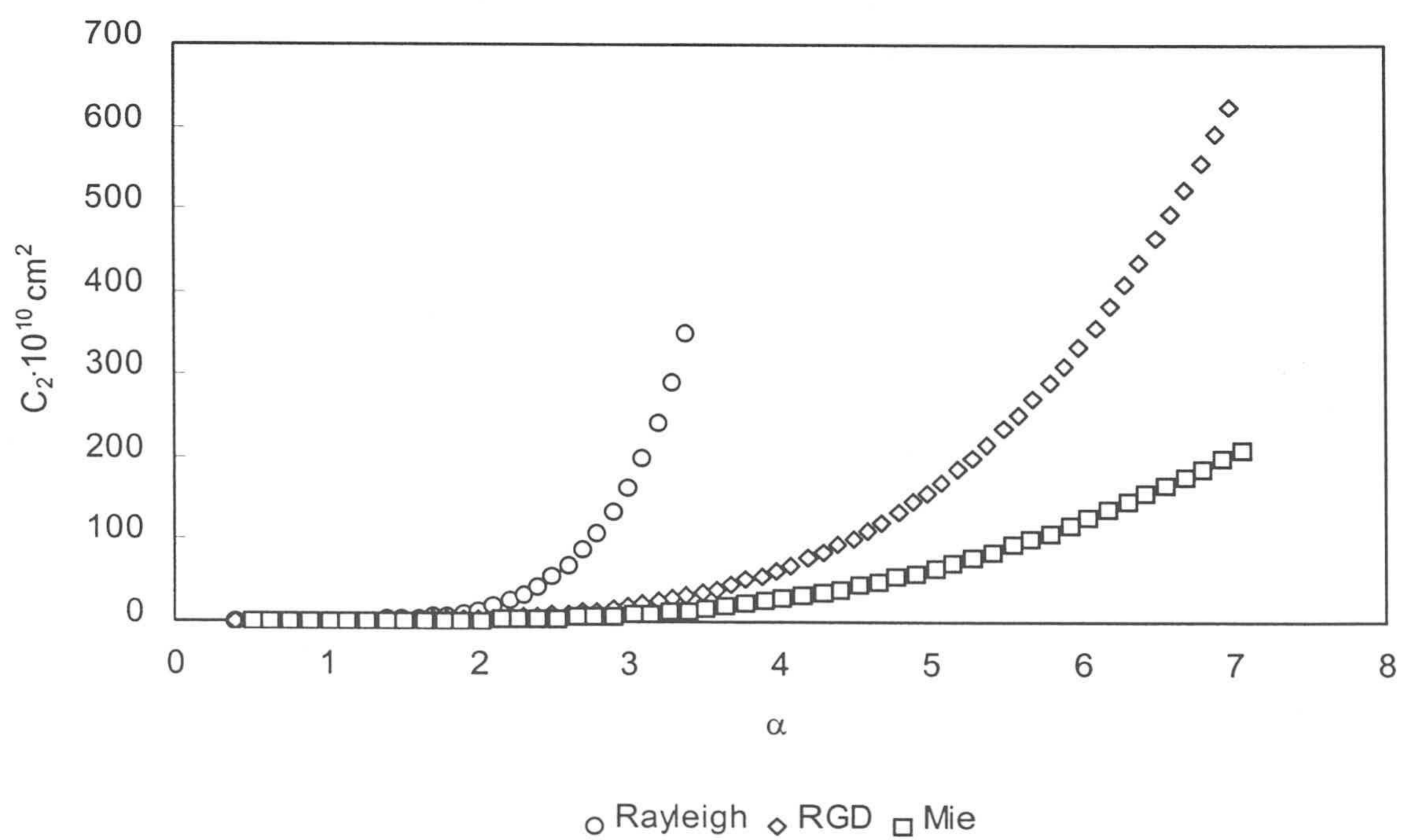


Figura 2.6 Sección eficaz de dispersión de los dímeros C_2 ($m=1.2$). Teoría de Rayleigh (coalescencia), RGD (reales) y Mie (coalescencia)

El mayor problema que conlleva emplear la teoría RGD o la de Mie, radica en el valor de la constante de formación de dímeros k_f . Como se verá en el siguiente capítulo o en el de resultados, en el cálculo de k_f se divide por $C_1 \cdot F_{op}$, factor que es diferente para cada teoría. Dependiendo del valor de α (0.4~5), k_f (RGD) puede llegar a ser incluso menos de la mitad que esa misma constante por la teoría de Mie (3), como se puede observar en la figura 2.7. En esta gráfica está representada la variación de $C_1 \cdot F_{op}$ para las dos teorías, en un intervalo de α entre 0.4 y 7.

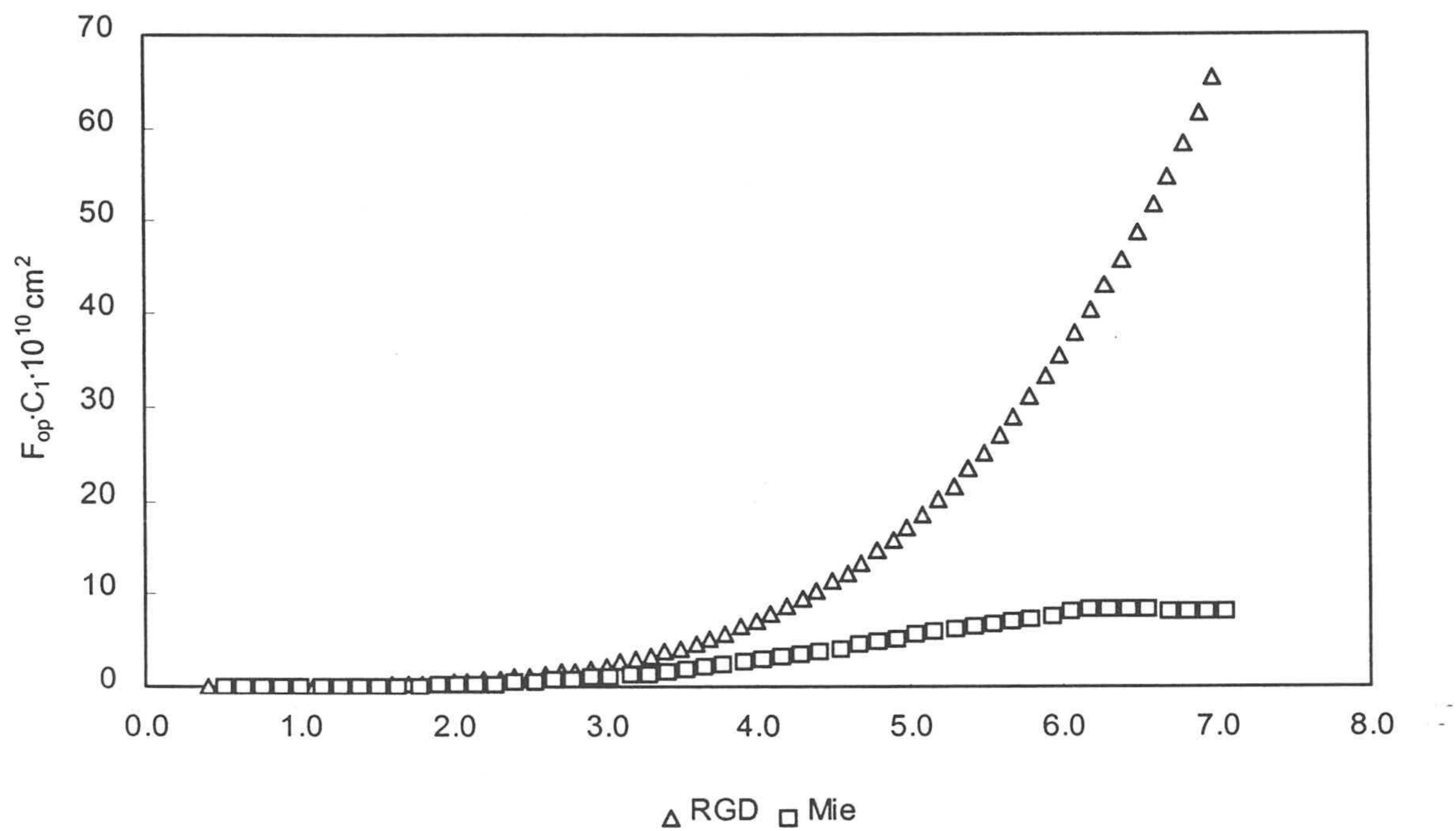


Figura 2.7. Variación de $C_1 \cdot F_{op}$ para las teorías de Rayleigh-Gans-Debye y Mie frente a α (0.4-7).

En el presente trabajo, el criterio que se ha seguido a la hora de obtener k_f , es considerar la formación de dímeros reales y tomar a $\alpha=5$ como el límite de validez de la teoría RGD. Esta última condición se ha podido comprobar a nivel experimental en la curva de la razón 340/600 frente al diámetro de partícula (figura 5.5).

2.7 Bibliografía

- (1) Kerker, M. The Scatter of Light and Other Electromagnetic Radiation. (Eds: Loebel, E. M). Academic Press, (1969).
- (2) Lichtenbelt, J. W. TH; Ras, H. J. M; Wiersema, P. H; Turbidity of Coagulating Lyophobic Sols. J. Colloid Interface Sci; 46, 522, (1974).
- (3) Fernández Barbero, A. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada. (1991).
- (4) Heller, W; Pangonis, W, J. Theoretical Investigations on the Light Scattering of Colloidal Spheres. I. The Specific Turbidity. J. Chem Phys; 26, 3, 498, (1957).

CAPÍTULO 3

PROCESOS CONTROLADOS POR DIFUSIÓN. REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

3.1 Introducción

3.2 Procesos controlados por difusión

3.3 Restricción en la orientación. Interacciones de corto alcance

3.4 Ecuación cinética de Smoluchowski

3.5 Inmuno-ensayos de soporte coloidal. Límite de detección y zona de equivalencia

3.6 Morfología de los agregados: dimensión fractal.

3.7 Determinación de la dimensión fractal por turbidimetría

3.8 Bibliografía



3.1 Introducción

Los procesos difusivos juegan un papel muy importante en la mayor parte de las interacciones biológicas. Este tipo de reacciones son normalmente la unión de ligandos con lugares específicos de grandes macromoléculas o complejos macromoleculares, tal y como sucede con la enzima-sustrato, hormona-receptor de membrana, DNA-proteína reguladora, etc. Aunque la reacción no esté en su totalidad controlada por difusión, su contribución es básica a la hora de analizar los distintos mecanismos que intervienen en la unión, así como para determinar la/s velocidad/es de reacción.

Cuándo se piensa en la difusión de una partícula en el seno de un líquido, la imagen asociada es la de las moléculas de un gas propagándose libremente, como se presentaba en los libros básicos de física y química. En realidad son las colisiones entre las moléculas del solvente y las partículas las que provocan un movimiento ("Browniano") de estas alrededor de su posición de equilibrio. Este desplazamiento (recorrido libre medio) es en la mayoría de los casos inferior al diámetro de la partícula, por lo que se puede hablar de un "volumen" de difusión alrededor de la misma. La distribución de probabilidad correspondiente a la posición de una partícula es una gaussiana esférica centrada en su punto de partida. Esta distribución se expresa en función del radio R de la partícula y de un parámetro D (cm^2/s), denominado coeficiente de difusión, del que se hablará más adelante. Una partícula de radio R , en cada traslación de su centro de masas alrededor de si misma, "cubrirá" un volumen $\approx 4\pi R^3/3$. Este movimiento se lleva a cabo en un tiempo medio igual a $R^2/6D$, por lo que en un instante τ correspondiente a un gran número de traslaciones, la partícula habrá cubierto un volumen $\approx (6D\tau/R^2) \cdot (4\pi R^3/3) = 8\pi DR\tau$. De aquí se deduce que la probabilidad por unidad de tiempo de chocar con un determinado punto de la solución es proporcional a DR . Destaca el hecho de que esta probabilidad dependa de la extensión lineal de la molécula y no de su superficie.

En un proceso de difusión entre macromoléculas, como es el caso de un inmuno-ensayo de soporte coloidal, hay que distinguir entre las macrocolisiones (dos partículas se unen por el azar) y las microcolisiones. Muchas de estas reacciones requieren que las moléculas tengan una orientación determinada para que los grupos potencialmente reactivos se puedan unir, por lo que las partículas sufrirán microcolisiones hasta que adquieran la orientación adecuada (1). La reorientación es también un proceso difusivo, donde la velocidad de reacción está limitada por el tamaño relativo de los grupos respecto de las moléculas (restricción orientativa), el tiempo que tardan en unirse y el tipo de interacción (atractiva o repulsiva) que existe entre los mismos.

Dentro de este capítulo, en primer lugar se obtendrá la expresión general de la constante de velocidad de formación de dímeros, denominada k_f , en el caso de dos esferas iguales y uniformemente reactivas contenidas en el seno de una solución. A continuación se modificará la expresión de k_f para adecuarla a distintos casos, en los que la aglutinación se debe a la unión entre los receptores de un soporte y los agregantes del medio de reacción. Estos últimos son normalmente proteínas específicas de las que están unidas a la superficie. Seguidamente se analizará el caso concreto de un inmuno-ensayo óptico de soporte coloidal, obteniéndose una expresión que relaciona la velocidad inicial V_0 de la curva absorbancia-tiempo, con los distintos parámetros biológicos (recubrimiento y cantidad de aglutinante), ópticos (tamaño de monómero y número de partículas) y del medio (viscosidad, índice de refracción y temperatura) que caracterizan al reactivo. Esta expresión no sirve sólo para evaluar como afectan estos parámetros a la velocidad inicial, sino que también permite calcular la constante de aglutinación k_f . Finalmente se explicará de manera breve lo que es la dimensión fractal d_f de los agregados y se presentará un método turbidimétrico para obtenerla.

En el capítulo de resultados se verá que la constante de formación de dímeros y la dimensión fractal sirven para distinguir entre los procesos limitados por difusión o por reacción. En el primer caso se realiza un análisis cinético de la inmuno-aglutinación, evaluando la relación entre k_f y la viscosidad del medio. Si k_f es inversamente proporcional a la viscosidad, la reacción está controlada por difusión (2), al menos en los primeros instantes. Por otro lado, en un estudio a tiempo elevado, el valor de d_f (3) define la morfología de los agregados y por tanto el mecanismo de formación de los mismos.

3.2 Procesos controlados por difusión

El objetivo de este apartado es determinar la constante de velocidad de formación de dímeros para dos partículas iguales y reactivas en toda su superficie.

Sea una solución de volumen infinito que contiene solutos A, B y C, tales que $A + B \rightleftharpoons C$ con concentraciones iniciales c_A^0 , c_B^0 y c_C^0 respectivamente (4, 5). Se considera que las partículas A y B son uniformemente reactivas. El estado promedio de este sistema durante el proceso de agregación se puede determinar tomando como "origen" a cualquiera de las tres moléculas. Por ejemplo, eligiendo las de tipo A, a un mismo tiempo t habrá distintas "imágenes" de la solución, donde están representadas las posiciones de las

partículas A, B, C alrededor de las todas las A. Haciendo que todas estas imágenes coincidan en un origen común, es posible determinar la concentración media de todas las moléculas alrededor de una misma partícula A. Esta manera de simular una reacción se emplea bastante en Mecánica Estadística y permite estudiar la evolución temporal de un sistema. Como cada A, B y C están en todas y cada una de las imágenes, en la superposición total la concentración media de cada soluto estará sobre valorada en un factor c_A^0 . Así por ejemplo, en la especie B la concentración a una distancia r del origen vendrá dada por:

$$c_B(r) = \frac{N^{\circ} \text{ de moléculas B en una superficie esférica } 4\pi r^2 dr}{c_A^0 4\pi r^2 dr} \quad [3.1]$$

Cuando una partícula B reacciona con una A, el par A-B desaparece y se crea una de tipo C. Por tanto se “eliminará” aquella imagen donde A y B estaban separadas, reemplazandola por otra con una nueva molécula C. Para extrapolar este resultado al conjunto total de reacciones que suceden dentro del seno de la solución, se emplea el teorema de Smoluchowski (ecuación de difusión) (4):

$$\frac{\partial c_B}{\partial t}(r,t) = (D_A + D_B) \nabla^2 c_B(r,t) + \nabla \cdot J_B^f(r,t) \quad [3.2]$$

donde D_A y D_B son los coeficientes de difusión de A, B respectivamente y $J_B^f(r, t)$ es la densidad de corriente de partículas B inducida por las fuerzas intermoleculares. El coeficiente de difusión se define como

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r'} \quad [3.3]$$

siendo κ_B la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio de reacción. r' representa el radio hidrodinámico de la partícula y habitualmente se hace igual al geométrico como se verá más adelante. En la expresión [3.2] no están incluidos los sumideros y fuentes de $c_B(r)$ cuando $r > R'$, donde R' es la distancia que ha de existir entre A y B para que se produzca la reacción. Normalmente $R' = R_A + R_B$, donde R_A y R_B son los radios

geométricos de A y B respectivamente. Para una reacción reversible, la condición de contorno (variación de $C_B(r)$) en un contorno situado en $r=R'$, se obtiene a partir de las siguientes consideraciones:

► Cuando $A + B \rightarrow C$, de la imagen superpuesta del sistema desaparecen todas aquellas donde la partícula B está a una distancia $r=R'$ del origen. Simultáneamente este conjunto entra a formar parte de las imágenes donde $C \rightarrow A + B$ y por tanto la velocidad de desaparición/aparición de imágenes ($\partial I_m / \partial t$) será igual al flujo neto total Φ (número total de reacciones directas menos el número de reacciones inversas por unidad de tiempo y volumen). Así

$$\frac{\partial I_m}{\partial t} = \Phi \quad [3.4]$$

► Φ es el número de partículas B que se difunden hacia el interior de la superficie de reacción por unidad de tiempo en la imagen superpuesta. Aplicando la primera ley de transporte de materia de Fick (6) resulta:

$$\Phi = c_A^0 4\pi R^2 D \frac{\partial c_B}{\partial r} (r) \Big|_{r=R'} \quad [3.5]$$

ecuación que relaciona el flujo de material a través de un contorno con el gradiente de concentración en dicha superficie.

► El flujo Φ se puede expresar como

$$\Phi = k_1 c_A^0 c_B(R') - k_2 c_c^0 \quad [3.6]$$

donde $c_B(R)$ corresponde a la concentración media de B en la superficie de reacción alrededor de A. κ_1 es una constante bimolecular que se utiliza conocida la concentración local media ($r=R$) de unos de los reactivos en la vecindad del otro. κ_2 es la constante unimolecular de formación del par A-B en la superficie de reacción. Combinando las ecuaciones de la [3.4] a la [3.6] se obtiene la condición de contorno

$$\left. \frac{\partial c_B(r)}{\partial r} \right|_{r=R'} = \frac{k_1}{4\pi R^2 D} c_B(R') - \frac{k_2}{4\pi R^2 D} \frac{c_C^0}{c_A^0} \quad [3.7]$$

3.2.1 Estado estacionario. Límite de Smoluchowski.

El estado estacionario (7) se caracteriza porque la densidad de corriente $J(r)$ de partículas B hacia las A es constante, lo que expresa como (8)

$$J(r) = -D\nabla c_B(r) - \mu c_B(r)\nabla U(r), \quad R' \leq r \leq \infty \quad [3.8]$$

donde $U(r)$ es un potencial correspondiente a una "fuerza media" de largo alcance (9), $D = D_A + D_B$ y $\mu = \mu_A + \mu_B = (D_A + D_B) / \kappa_B T$. μ recibe el nombre de movilidad mecánica y tiene dimensiones de velocidad por unidad de fuerza.

La corriente total, Φ_M , que pasa a través de una superficie esférica S situada a una distancia r del origen, es el flujo por unidad de concentración de A o también Φ/c_A^0 , de manera que a partir de las ecuaciones [3.4]-[3.6] y [3.8] resulta

$$\frac{\Phi_M}{4\pi R'^2 D} = \frac{\partial c_B(r)}{\partial r} + \frac{c_B(r)}{\kappa_B T} \frac{\partial U(r)}{\partial r} \quad [3.9]$$

cuya solución general (4) es

$$c_B(r) = \frac{\Phi_M}{4\pi D} e^{-\frac{U(r)}{\kappa_B T}} \int_{R'}^r e^{\frac{U(r')}{\kappa_B T}} \frac{dr'}{r'^2} + \bar{A} e^{-\frac{U(r)}{\kappa_B T}} \quad [3.10]$$

donde \bar{A} es una constante de integración. \bar{A} y Φ_M se determinan aplicando las dos condiciones de contorno siguientes

$$c_B(\infty) = c_B^0, \quad U(\infty) = 0, \quad (a)$$

$$\Phi_M = \frac{\Phi}{c_A^0} = \frac{k_1 c_A^0 c_B(r) - k_2 c_c^0}{c_A^0} \quad (b)$$

Finalmente queda

$$\Phi = c_A^0 \Phi_M = \frac{k_1 4\pi R'D c_A^0 c_B^0 - k_2 e^{\frac{U(r)}{\kappa_B T}} 4\pi R'D}{k_1 R' \int_{R'}^r e^{\frac{U(r)}{\kappa_B T}} + 4\pi R'D e^{\frac{U(r)}{\kappa_B T}}} \quad [3.11]$$

A partir de aquí se define la razón efectiva directa del estado estacionario k_f (constante de velocidad) como

$$k_f = \frac{k_D k_1}{fk_1 + gk_2} \quad [3.12]$$

y la razón efectiva inversa del estado estacionario k_b (constante de disociación)

$$k_b = \frac{k_D k_2 e^{\frac{U(r)}{\kappa_B T}}}{fk_1 + gk_2} \quad [3.13]$$

donde

$$k_D = 4\pi RD = 4\pi(R_A + R_B)(D_A + D_B) \quad [3.14]$$

$$g = e^{-\frac{U(R)}{\kappa_B T}} \quad [3.15]$$

$$f = R \int_R^{\infty} e^{-\frac{U(r)}{\kappa_B T}} \frac{dr}{r^2} \quad [3.16]$$

Cuando $U(R) \rightarrow 0$, entonces $f \rightarrow 1$ y $g \rightarrow 1$ y por tanto el coeficiente de difusión no está afectado por las fuerzas intermoleculares de largo alcance o por la proximidad de otras partículas. La unión se debe exclusivamente al movimiento Browniano de A y B. Este caso recibe el nombre de **límite de Smoluchowski** (10), y la constante directa de velocidad k_f queda:

$$k_f = 4\pi R' D = 4\pi(R_A + R_B)(D_A + D_B) \quad [3.17]$$

Si A y B son dos partículas idénticas, la expresión [3.17] resulta

$$k_f = 4\pi(R_A + R_B) \left(\frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r_A'} + \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r_B'} \right) = \frac{8 \kappa_B T}{3\eta} \quad [3.18]$$

donde se considera que los radios geométricos de las partículas (R_A, R_B) y los hidrodinámicos (r_A', r_B') son iguales. Factores tales como el tamaño de los reactantes, la superficie reactiva, las interacciones de naturaleza estérica, etc no tienen incidencia alguna sobre la agregación. Se trata por tanto del máximo valor que puede alcanzar la constante de velocidad para reactantes iguales. En un medio acuoso y una temperatura de 323 °K (37 °C), k_f equivale a $15 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$.

En el siguiente apartado se presentan varios procesos limitados por difusión, donde existen macromoléculas adsorbidas a un soporte. En cada caso, la expresión de la constante

de velocidad k_f varía en función de la capacidad reactiva de la superficie de las partículas (grado de recubrimiento), del tamaño de los grupos y de su número, etc. Para que estas expresiones estuviesen completas sería necesario incluir las interacciones de largo (culombianas) y corto alcance (hidrofóbicas, van der Waals). Las primeras son las responsables del acercamiento/distanciamiento de las partículas, mientras que las segundas prolongan la duración de las macrocolisiones y permiten que las moléculas adquieran una orientación apropiada para la reacción (11). Otras interacciones que tampoco se han tenido en cuenta son las de tipo hidrodinámico. Estas fuerzas miden cual es el efecto que tiene el desplazamiento de solvente debido al movimiento de una partícula sobre las que la rodean. Algunos autores (12) demuestran que la contribución relativa de estas interacciones es menor cuanto mayor sean las fuerzas atractivas entre las moléculas.

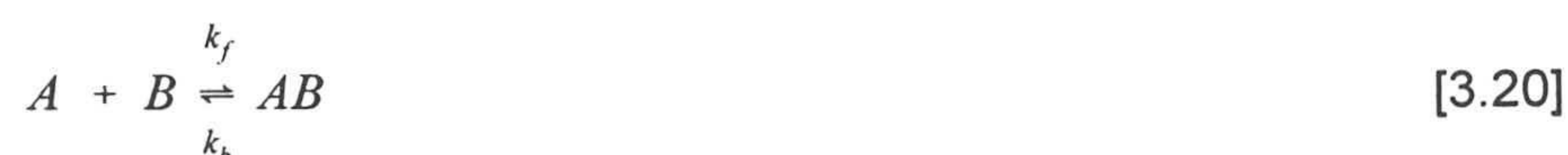
3.3 Restricción en la orientación. Interacciones de corto alcance

En general las macromoléculas no son reactivas en toda su superficie, sino que tienen una zona restringida (lugares activos) por donde puede unirse. Existirán por tanto limitaciones de carácter geométrico a la hora de calcular la constante de velocidad k_f (13). En este caso no existe una solución general del problema. La manera más simple de estimar las restricciones orientativas, es asumir que las moléculas se aproximan unas a otras con la constante de velocidad de la ecuación [3.17], de manera que sólo reaccionan aquellas partículas que tienen una posición relativa determinada. Si las orientaciones son "equilibradas" (sistema isotrópico), la constante de velocidad se reducirá en un factor igual a la fracción de moléculas posicionadas correctamente. Ahora bien, en un proceso controlado por difusión, las orientaciones no están equilibradas, por lo que las partículas sufrirán un gran número de microcolisiones antes de que la difusión las vuelva a separar. Durante el curso de estos encuentros la orientación puede cambiar y las moléculas adquirirán diferentes posiciones relativas. A este proceso es a lo que se denomina difusión rotacional y es la responsable de que los valores de k_f no sean tan bajos como en un principio cabría esperar, si sólo existiese traslación.

La aglutinación de dos partículas A y B se puede representar como (14-16):



donde AB es el complejo que se forma tras n estados intermedios $(AB)_i$. Los $(AB)_i$ corresponden a las distintas situaciones del sistema antes de que A y B se unan con una orientación correcta. Las k_i son las constantes de velocidad para las reacciones directas y k_{-i} para las inversas. La ecuación [3.19] se simplifica considerando que las reacciones directas y las inversas están determinadas por una sola constante (estados intermedios cuasi estacionarios), de manera que:



siendo k_f y k_b las constantes efectivas de velocidad directa e inversa respectivamente.

Las reacciones macromoleculares son normalmente muy rápidas por lo que se considera que están controladas por difusión. Una forma de expresar este control es introduciendo el denominado encuentro complejo ("encounter complex"). Es un estado intermedio del sistema, donde las dos partículas unidas por difusión se encuentran rotando para encontrar la posición correcta (difusión rotacional). La reacción entre A y B queda como:



donde $(A \cdot B)_0$ es el "encounter complex". k_0 es la constante de velocidad que contiene información sobre la difusión traslacional y rotacional de unión de las partículas, mientras que k_{-0} es la constante con la que se disocia el "encounter complex". k_1 y k_{-1} representan las constantes directas e inversas de la reacción que se produce tras la formación de $(A \cdot B)_0$. Considerando la concentración del "encounter complex" como cuasi estacionaria ($d/dt [(A \cdot B)_0] \approx 0$), las constantes k_f y k_b resultan (8):

$$k_f = \frac{k_1 k_0}{k_1 + k_{-0}} = a k_0 \quad [3.22]$$

$$k_b = \frac{k_{-1} k_{-0}}{k_1 + k_{-0}}$$

El parámetro a recibe el nombre de coeficiente de pegado ("sticking coefficient") y es una manera de expresar el número de uniones efectivas. Cuando $k_1 \gg k_0$, entonces $a \approx 1$ y la reacción está controlada por difusión. Si $k_1 \ll k_0$, $a < 1$ y el proceso está limitado por reacción.

3.3.1 Un lugar reactivo por molécula

Para reacciones macromoleculares donde los lugares reactivos son pequeños comparados con las dimensiones de la molécula (figura 3.1) (17, 18), la constante de velocidad (19) k_0 viene dada por:

$$k_0 = 4\pi DR \theta_A \theta_B \frac{(\theta_A + \theta_B)}{8} \quad [3.23]$$

donde θ_A y θ_B son los ángulos de reacción para las partículas A y B respectivamente.

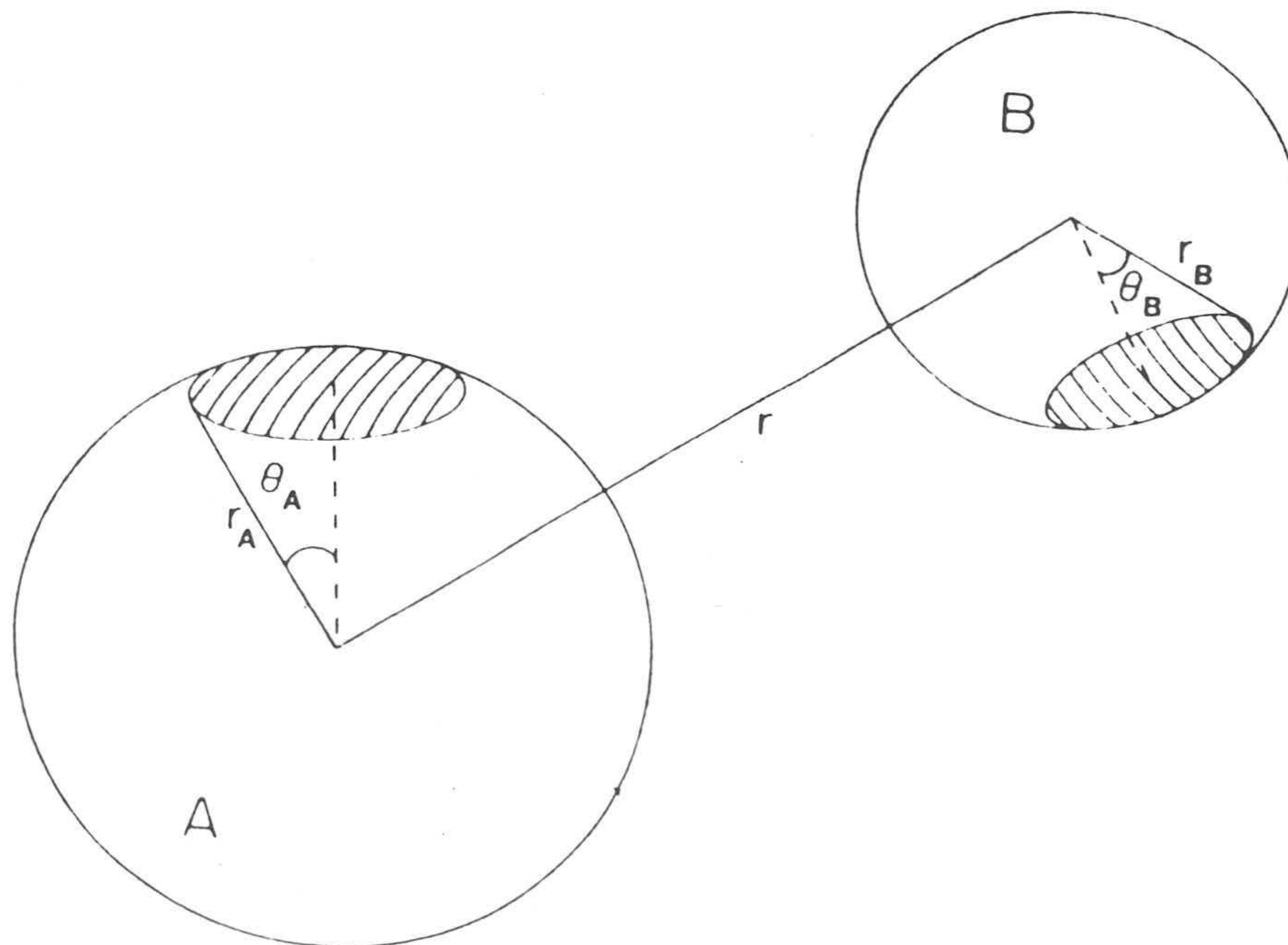


Figura 3.1. Restricción en la orientación. Partículas con un solo lugar reactivo (1).

La introducción de los factores estéricos θ_A y θ_B supone una disminución del valor que se obtiene mediante la expresión [3.17]. Si las dos partículas son iguales y $\theta_A = \theta_B$, la ecuación [3.23] queda reducida a

$$k_0 = \frac{k_{0e}}{4} \left(\frac{r_s}{r_A}\right)^3 = \frac{8 \kappa_B T}{3\eta} \frac{1}{4} \left(\frac{r_s}{r_A}\right)^3 \quad [3.24]$$

donde r_s es el radio del lugar reactivo y r_A el de la partícula. El factor geométrico r_s/r_A reduce el valor de la constante de velocidad en varios órdenes de magnitud (20).

3.3.2 Receptores sobre una superficie esférica.

Cuando existen muchos lugares reactivos de pequeño tamaño distribuidos sobre una superficie esférica de radio R , la constante de velocidad de unión k_0 de un ligando a la superficie (21) en una reacción controlada por difusión, viene dada por:

$$k_0 = 4D \frac{\pi R n b}{\pi R + n b} \quad [3.25]$$

siendo n el número de receptores de la superficie y b la extensión lineal de los mismos.

Cuando el número de receptores supera un determinado valor, la probabilidad de unión entre los aglutinantes y las partículas sensibilizadas tiene su valor máximo. En efecto, si $n b \gg \pi R$ (mitad del perímetro), k_0 es máxima y la reacción está controlada por la difusión traslacional de la esfera. La partícula se comporta como si estuviese totalmente cubierta de receptores, aunque el recubrimiento es sólo una pequeña porción de la misma ($n b^2 \ll 4R^2$). Este resultado pone de nuevo de manifiesto que las reacciones controladas por difusión están limitadas por el tamaño del receptor y no por su superficie.

Si $n=1$ y $b \ll R$ (un solo lugar reactivo), la ecuación [3.25] se reduce a (22):

$$k_0 \approx 4DR \operatorname{sen}(\theta_A/2) \quad [3.26]$$

k_0 varía dependiendo de la extensión lineal del receptor, como sucedía en el apartado anterior (expresión [3.24]).

3.3.3 Receptores sobre una superficie esférica. Inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal.

Los elementos básicos de este tipo de ensayos son:

- ▶ Partículas de poliestireno con n receptores en la superficie, que habitualmente son antígenos o anticuerpos de una determinada enfermedad.
- ▶ Aglutinante de origen sérico en la mayor parte de los casos. Entre sus componentes se encuentra el antígeno o el anticuerpo específico del receptor de las partículas.

Para que dos partículas coagulen (figura 3.2) es necesario que previamente exista la unión entre las proteínas del aglutinante y las de la superficie. A continuación cualquiera de los n_A lugares ocupados por el aglutinante en una partícula (la 1 por ejemplo) se podrán unir a los $n-n_A$ antígenos de otra (la 2).

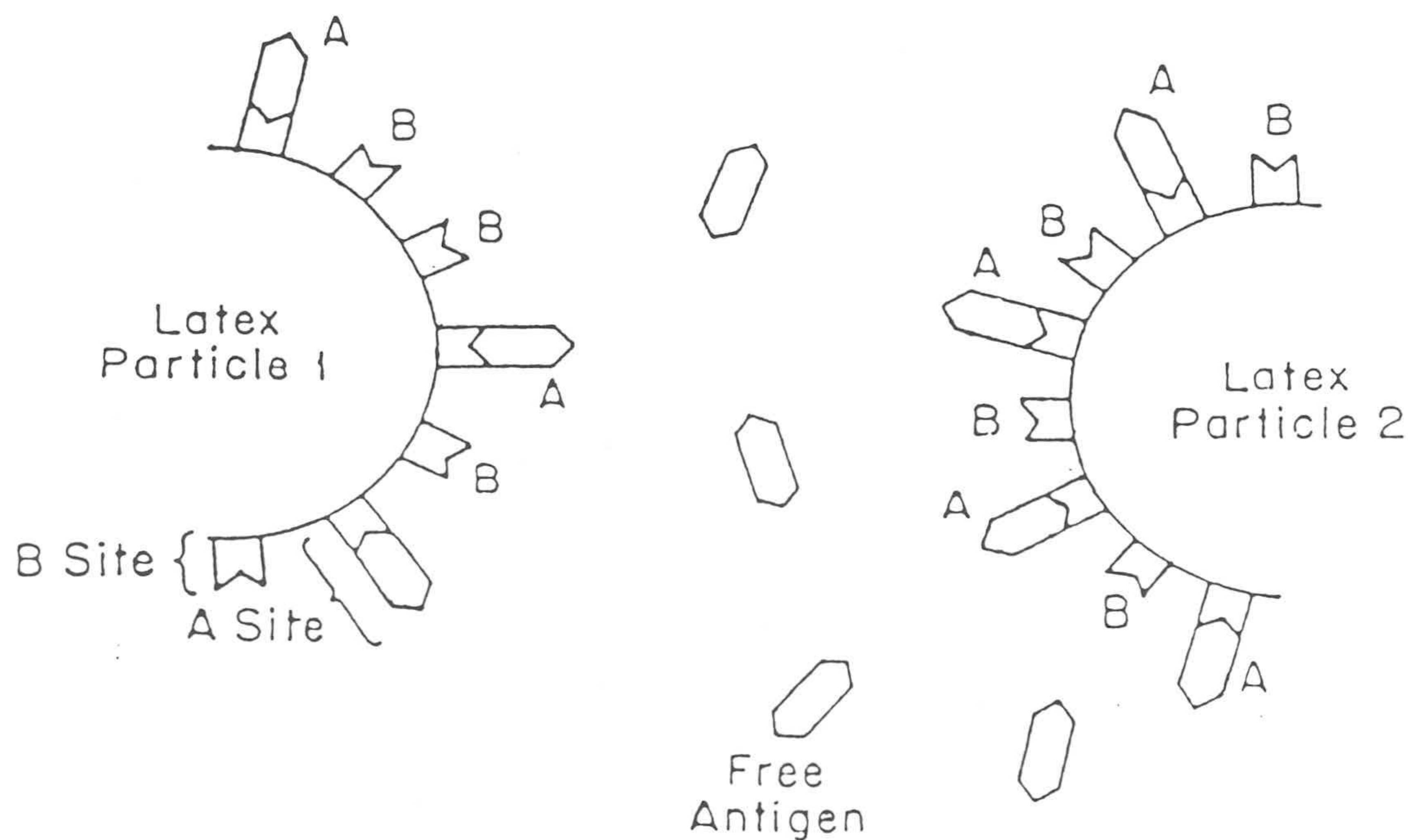


Figura 3.2. Esquema de las partículas de un inmuno-ensayo de soporte coloidal.

En este tipo de agregación la constante de aglutinación no contiene información sobre el ángulo de reacción de la proteína, tal y como sucedía con un solo lugar reactivo por partícula. Ahora no existe una única orientación para reaccionar, ya que el número de posibilidades es mucho mayor (n_A o $n-n_A$). k_f es proporcional al denominado factor de colisiones eficaces C_{ef}

$$C_{ef} = n_A(n-n_A) \quad [3.27]$$

cuya expresión es similar a la encontrada por La Mer en el proceso de floculación por puenteo (23, 24). A medida que C_{ef} se hace mayor, la probabilidad de unión entre las partículas aumenta hasta llegar a un máximo, que corresponde a $n_A=n/2$. Este resultado coincide con el que se obtuvo en el caso de una superficie con n receptores. C_{ef} no contempla la posibilidad de que las partículas puedan reorientarse durante la reacción.

A partir de las ecuaciones [3.17], [3.18], [3.23] y [3.27] k_f queda como

$$k_f = k' n_A(n-n_A) \quad [3.28]$$

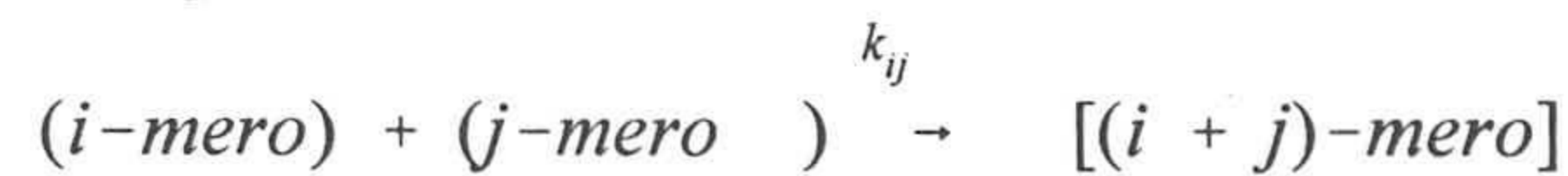
donde k' es una constante que tiene la información sobre las condiciones del medio (viscosidad y temperatura) y de todas las uniones efectivas (difusión traslacional y rotacional) que dan lugar a la formación de un dímero. Esto explica que los valores experimentales de k_f sean mayores de lo esperado si sólo existiese difusión traslacional y las partículas tuvieran que acercarse con una determinada orientación para poder reaccionar (1). A partir de esta expresión se puede determinar el efecto del recubrimiento, número de partículas o de la cantidad de aglutinante sobre la probabilidad de unión entre dos monómeros.

La mayor novedad que introduce la expresión [3.28] respecto a la aglutinación por sal, es que en este caso la probabilidad de unión depende de la concentración de partículas, ya que n_A varía en función del número inicial de dispersores. Las partículas ya no son reactivas en toda su superficie, sólo en n_A o $n-n_A$.

Para obtener el valor experimental de k_f hay que determinar como afectan los parámetros biológicos (grado de recubrimiento, concentración de aglutinantes, etc) y los ópticos (número de partículas, diámetro de los dispersores, etc) al proceso de agregación. Se necesita encontrar una expresión teórica que relacione todos estos factores entre si y también con los datos experimentales. Estos requisitos los cumple la ecuación cinética de Smoluchowski, cuyo estudio se llevará a cabo en el siguiente apartado.

3.4 Ecuación cinética de Smoluchowski

Es una aproximación muy útil que sirve para clasificar un gran número de procesos. Esta ecuación tiene en cuenta todas las colisiones binarias que dan lugar a un agregado de un determinado tamaño



siendo un i-mero un agregado de i partículas y k_{ij} una constante positiva relacionada con la velocidad de reacción y más concretamente con la probabilidad de que esta se produzca. En el caso de los dímeros la k_{ij} correspondiente es la k_{11} , que siguiendo la nomenclatura de apartados anteriores se designará como k_f desde ahora en adelante. La ecuación de Smoluchowski tiene la siguiente expresión:

$$\frac{dN_n}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{ij=n} k_{ij} N_i N_j - N_n \sum_{i=1} k_{ij} N_i \quad [3.29]$$

donde N_i es la concentración de los agregados formados por i partículas. El primer término del segundo miembro se denomina de ganancia e indica la variación temporal del número de agregados de una especie i a partir de otros de tamaño menor, mientras que el segundo es el de pérdida y representa la disminución de agregados de un tipo i para formar otros mayores. A la hora de utilizar esta ecuación hay que tener en cuenta que:

- ▶ Sólo es aplicable en sistemas muy diluidos, donde los encuentros de tres o más elementos son muy poco probables.
- ▶ No prevé la posibilidad de la ruptura de los agregados. Las distribuciones de tamaños tienen por tanto un crecimiento/decrecimiento monótono.
- ▶ No proporciona una descripción sobre la morfología de los agregados.

3.4.1 Formación de dímeros. Reacción Ag-Ac

En los primeros estadios de la aglutinación se considera que los agregados formados son sólo dímeros (N_2) y que estos desaparecen para formar otras especies de tamaño superior. En este caso, la ecuación de Smoluchowski particularizada a los dos primeros términos queda como

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{2} k_{11} N_1^2 = \frac{1}{2} k_f N_1^2 \quad [3.30]$$

siendo N_1 la concentración de monómeros en un instante t . Como la velocidad de desaparición de los monómeros es dos veces la de formación de los dímeros, a partir de [3.30] resulta

$$-\frac{dN_1}{dt} = 2 \frac{dN_2}{dt} N_1^2 = k_f N_1^2 \quad [3.31]$$

Por otro lado, en estos primeros instantes, la respuesta óptica es resultado de la luz dispersada por los monómeros y por los dímeros. La absorbancia óptica viene dada por la siguiente expresión ([2.24] y [2.26])

$$A = \frac{l}{2.3} (C_1 N_1 + C_2 N_2) \quad [3.32]$$

donde l es la anchura de la célula de medida y C_1 y C_2 las secciones eficaces de los monómeros y los dímeros respectivamente. La variación temporal de la respuesta óptica (V_0) se calcula a partir de la derivada de [3.32], de manera que

$$V_0 = \left(\frac{dA}{dt}\right)_0 = \frac{l}{2.3} \left(C_1 \frac{dN_1}{dt} + C_2 \frac{dN_2}{dt}\right) \quad [3.33]$$

El subíndice 0 indica que la velocidad corresponde a los primeros instantes de aglutinación. Finalmente, con la [3.28] y [3.30]-[3.33] queda

$$V_o = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' n_A (n - n_A) N_1^2 \quad [3.34]$$

Siguiendo esta última expresión, la representación gráfica de V_o con n_A es una parábola, lo que en principio no corresponde al comportamiento real de una curva de inmuno-aglutinación, al menos en la zona de exceso de anticuerpo. En esta zona, el aglutinante libre hace que la curva se separe del comportamiento parabólico previsto por la ecuación [3.34]. En el apartado 4.2.2.2 se describirá con mayor detalle las partes que se distinguen en una curva inmunologica (figura 4.9).

Como la ecuación [3.34] no contempla la posibilidad de que parte del Ac añadido quede libre en disolución, su rango de validez está restringido a concentraciones por debajo del punto de equivalencia de la curva de respuesta. Para que la expresión [3.34] estuviese correctamente formulada, habría que tener en cuenta el equilibrio químico que se establece entre el anticuerpo unido a las partículas y el que queda en disolución (25, 26). Este modelo no es aplicable a los complejos [Ix-Ag]-Ac de Paul-Bunnell, ya que el suero del que se ha dispuesto en la mayor parte de los experimentos no tiene un título (ver apartado 4.2.2.2) lo suficientemente elevado. Es necesario tener toda la curva de respuesta para poder establecer correctamente los parámetros del ajuste. A pesar de esto, la ecuación [3.34] se puede utilizar para estudiar como afectan los distintos factores ópticos y biológicos a los parámetros de la curva de inmuno-aglutinación, como son el límite de detección y el punto de equivalencia, cuyos significados se explicarán en los apartados 3.5.1 y 3.5.2 respectivamente. Aunque las conclusiones corresponden a un sistema formado por monómeros y dímeros exclusivamente, son extrapolables al caso de sistemas compuestos por especies superiores, como se podrá comprobar en los apartados 3 y 4 del capítulo 6.

A continuación se presenta un estudio de la ecuación [3.34], donde tras realizar varias aproximaciones, se ha obtenido la velocidad inicial correspondiente al límite de detección y al punto de equivalencia. En esta Memoria, la longitud de onda (570 nm), la viscosidad (≈ 0.69 cp) e índice de refracción del medio (≈ 1.33) así como la temperatura (37°C), son constantes en la mayor parte de los experimentos, mientras que el tamaño de partícula, el número inicial de dispersores, la cantidad de aglutinante o el grado de recubrimiento son variables. Por este motivo, interesa saber cual es el efecto que tienen estos factores sobre la respuesta a baja concentración de aglutinante o en la zona de equivalencia.

3.5 Inmuno-ensayos de soporte coloidal. Límite de detección y zona de equivalencia

3.5.1 Límite de detección

El límite de detección es la mínima cantidad de analito que un ensayo es capaz de diferenciar de la muestra de concentración cero (blanco). El tipo de reactivo (látex-portaobjetos, turbidimétricos, etc) determina las unidades en las que se mide esta concentración.

La expresión teórica utilizada para calcular el límite de detección, se obtiene a partir de la ecuación [3.34] realizando las siguientes aproximaciones:

- ▶ El tiempo de medida es muy bajo, de manera que el número de monómeros es aproximadamente igual al inicial ($N_1 \approx N_0$).
- ▶ Para poca concentración de aglutinante, todo el anticuerpo añadido (Ac_0) está inmuno-adsorbido a las partículas ($Ac_0 = n_A N_0$), con lo que:

$$V_{ld} = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' Ac_0 (nN_0 - Ac_0) \quad [3.35]$$

siendo V_{ld} la velocidad inicial de reacción del sistema en el límite de detección. Cuando $Ac_0 \rightarrow 0$, la expresión [3.35] queda como:

$$V_{ld} = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' nN_0 Ac_0 \quad [3.36]$$

Introduciendo el factor óptico F_{op} (expresión [2.16]) y el valor inicial de la absorbancia ($A_0 = C_1 N_0 l / 2.3$), resulta:

$$V_{ld} = k' F_{op} A_0 n Ac_0 \quad [3.37]$$

Expresando n en función del grado de recubrimiento S , el diámetro ϕ de la partícula, el número de Avogadro N_A y el peso molecular M de la proteína adsorbida

$$n = \frac{S\pi\phi^2 N_A}{M} \quad [3.38]$$

V_{ld} queda como

$$V_{ld} = k' F_{op} A_0 \frac{S\pi N_A \phi^2}{M} A c_0 \quad [3.39]$$

Poniendo ϕ^2 en función de α , resulta

$$V_{ld} = k' F_{op} A_0 S \alpha^2 \frac{n_m^2 \lambda_0^2 N_A}{\pi M} A c_0 \quad [3.40]$$

siendo n_m y λ_0 el índice de refracción del medio y la longitud de onda en el vacío respectivamente. Como estos dos parámetros al igual que M , son prácticamente constantes en todos los experimentos, la parte variable de la expresión [3.40] es $F_{op}\alpha^2 S A_0$, a la que desde ahora en adelante se denominará por F_{ld} . Esta función recoge el cambio de V_{ld} con ϕ , S y A_0 , lo que facilita el análisis de los resultados. Tal y como se comentó anteriormente, estos tres factores son los que se toman como variables en la mayor parte de los reactivos. De todas formas, al final del apartado 3.5.2.1 se presenta una tabla resumen donde se evalúa el efecto de todos los parámetros, no sólo el tamaño, el recubrimiento o el número de partículas.

Si dos reactivos tienen monómeros de distinto diámetro, pero el mismo grado de recubrimiento y absorbancia inicial, $F_{op}\alpha^2$ será el único factor variable de F_{ld} . Representando $F_{op}\alpha^2$ frente a α (figura 3.3), se observa que V_{ld} crece a medida que lo hace el tamaño de partícula, hasta que α alcanza un valor próximo a cinco. En esta gráfica, así como en las siguientes, se utiliza la hipótesis de coalescencia (teoría de Mie), que aunque no sea del todo correcta, permite estudiar en un amplio rango de α , las distintas funciones en las que interviene la sección eficaz dispersión de los dímeros y el factor óptico. Volviendo a la figura 3.3, se puede concluir que en igualdad de S y A_0 y para $\alpha \leq 5$, el monómero de más diámetro es el que tiene mayor reactividad a baja concentración de aglutinante. La existencia de un máximo de respuesta alrededor de $\alpha \approx 5$ se ha podido demostrar experimentalmente, tal y como se verá en el apartado 5 del capítulo 6.

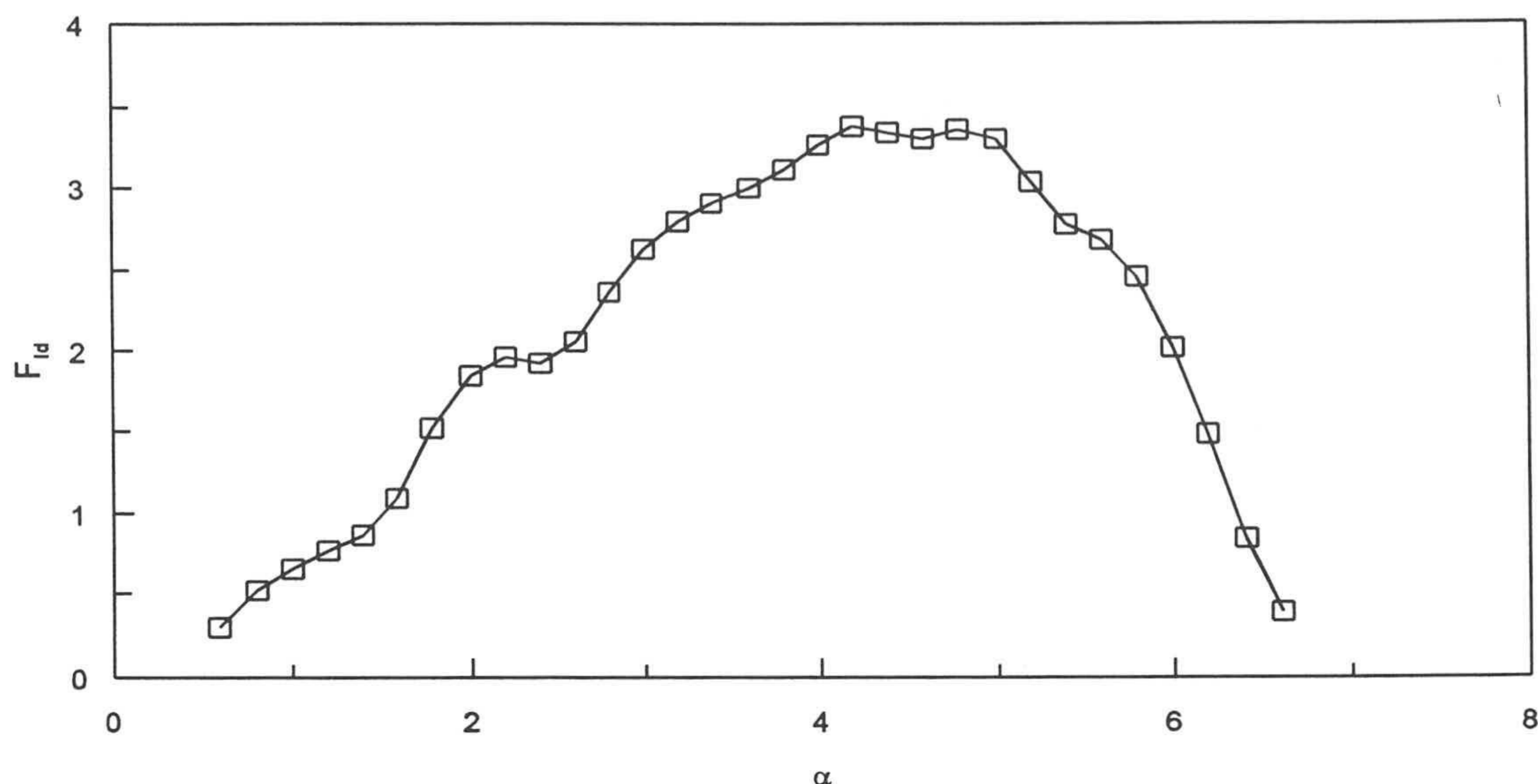


Figura 3.3. Límite de detección. Cambio de la función F_{id} ($F_{op} \cdot \alpha^2$) con α ($m=1.2$).

Por el contrario, si dos reactivos tienen diferente número de dispersores, recubrimiento o diámetro de monómero, la interpretación de los resultados no es tan sencilla como en el caso anterior. Es necesario analizar todas las variables en conjunto, aunque los resultados experimentales muestran que el tamaño de partícula continúa siendo el parámetro que más influencia tiene en el límite de detección, siempre y cuando no exista una gran diferencia en el valor de S o en el de A_0 (ver apartado 6.3.4).

El efecto del diámetro inicial de partícula sobre el límite de detección se puede evaluar directamente a partir de la representación gráfica de la ecuación [3.34], aunque este método es algo más complicado que estudiar la función F_{id} , ya que es necesario definir todos los parámetros de la curva de V_0 - Ac_0 . En la figura 3.4 se presenta la variación de V_0 ($U.A./s^{-1}$) para dos monómeros, 130 nm y 214 nm. Se han elegido estos tamaños ya que son aproximadamente los que tienen el RP-130 y el RP-214, partículas con las que se ha trabajado a lo largo de esta Memoria. El recubrimiento ($S=35 \mu g/m^2 l x$) y la absorbancia ($A_0=1 U.A$) son iguales para los dos látex. La constante k' ($2 \cdot 10^{-12} cm^{-3} s^{-1}$) se ha escogido en función de los resultados del capítulo 6. El eje de abscisas representa la concentración de agregante expresada en número de moléculas por cm^{-3} . Los valores Ac_0 no son representativos del sistema Ag-Ac P-B o de otro cualquiera, tan solo sirven para analizar la variación de V_0 . La sección eficaz de dispersión de los monómeros así como el factor óptico están calculados para una λ_0 de 570 nm ($m=1.1939$). El paso óptico de la cubeta de medida

es de 0.744 cm (Monarch). Para obtener la curva V_0 - Ac_0 ha sido necesario realizar la aproximación de que todo el aglutinante se inmuno-adsorbe sobre las partículas en todas las concentraciones de agregante.

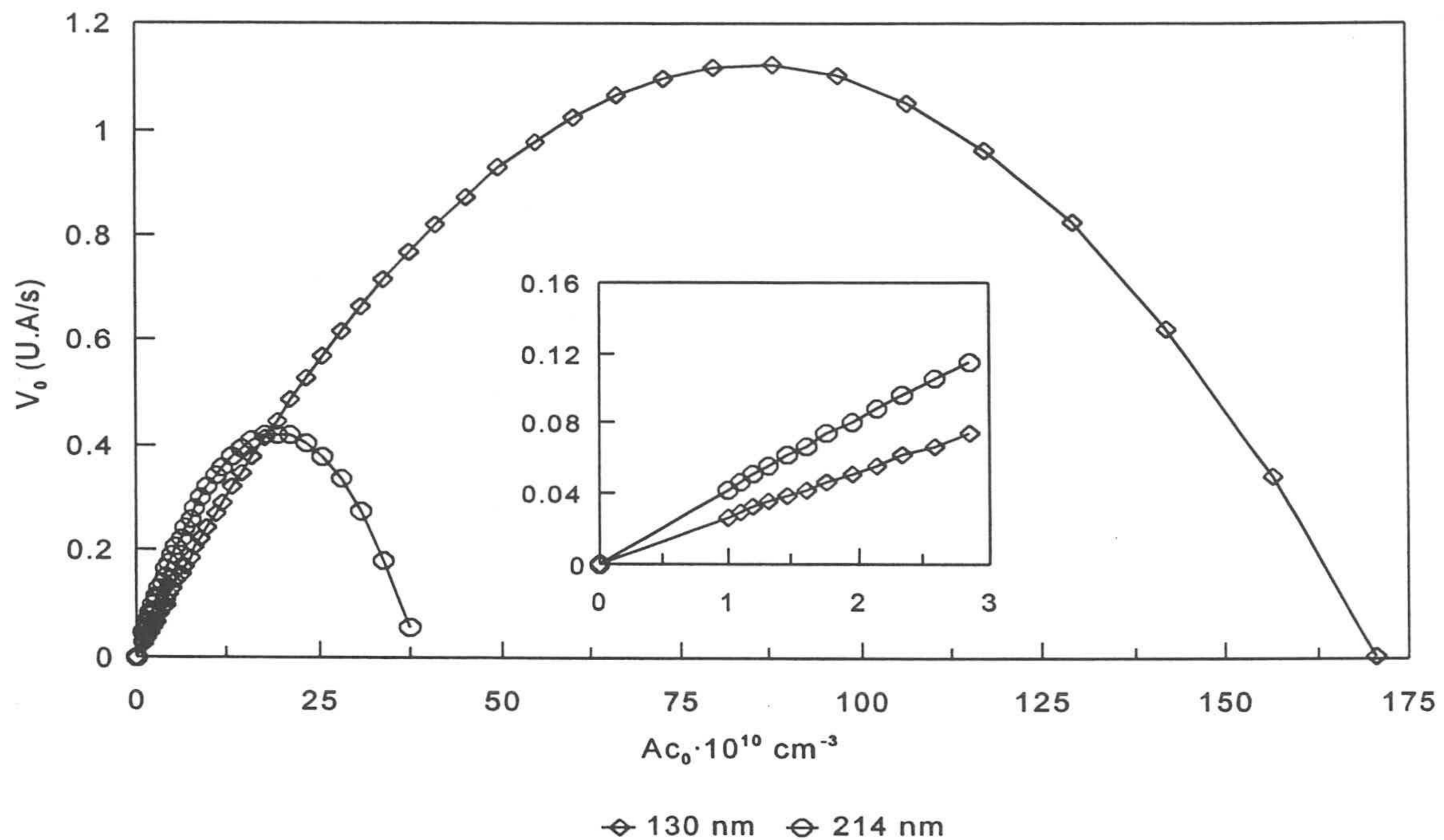


Figura 3.4. Variación de V_0 (expresión [3.34]) en función de Ac_0 para dos partículas de 130 y 214 nm, con igual S ($35 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) y A_0 (1 U.A). $k'=2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$. $\lambda_0 = 570 \text{ nm}$, $l=0.744 \text{ cm}$.

La figura 3.4 (ver detalle) confirma de nuevo los resultados obtenidos en el análisis de la función $F_{op}\alpha^2$ (gráfica 3.3). Los parámetros ópticos y en concreto el tamaño de partícula, son los que caracterizan a la curva de respuesta. La luz dispersada por una esfera no conductora (expresión [3.9]) es directamente proporcional al diámetro a la sexta de la partícula, lo que explica que el monómero de 214 nm tenga menor límite de detección (detecta menos can, aunque su concentración ($7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) sea bastante inferior a la del de 130 nm ($9 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$).

Si el recubrimiento del monómero de 214 nm ($A_0=1 \text{ U.A}$) se reduce en un 32% ($23 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) o su concentración en un 42% ($A_0=0.65$, $S=35 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$), se puede conseguir que ambas partículas tengan el mismo límite de detección (ver detalle de la figura 3.5), lo que es una prueba más de que en un amplio rango de S y A_0 , el tamaño del dispersor es el que define la respuesta a baja concentración de aglutinante. Sólo se ha representado el caso en que se reduce el recubrimiento del monómero de 214 nm manteniéndose constante la absorbancia (figura 3.5) ya que la otra gráfica ($S=35 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $A_0=0.65$) es

formalmente la misma.

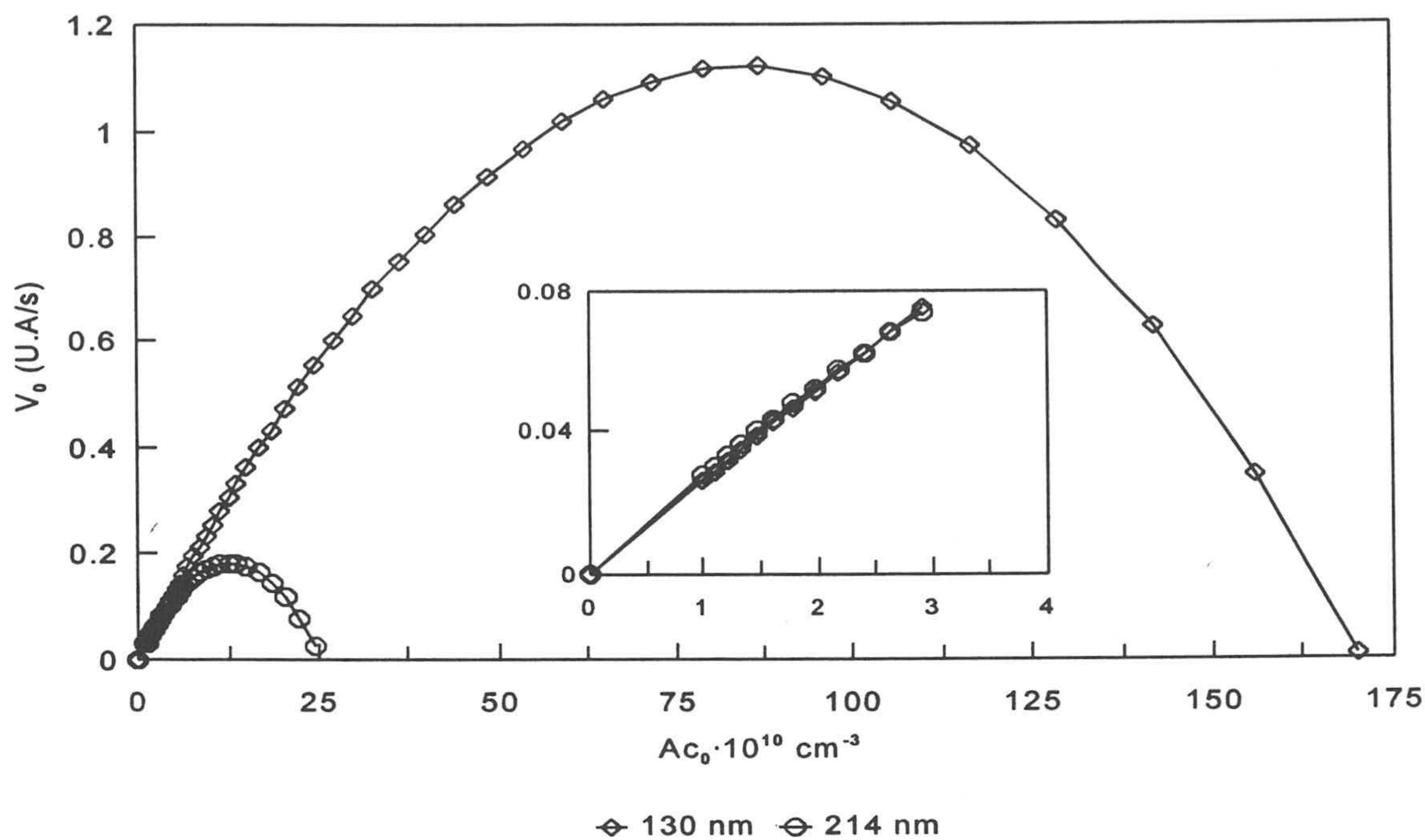


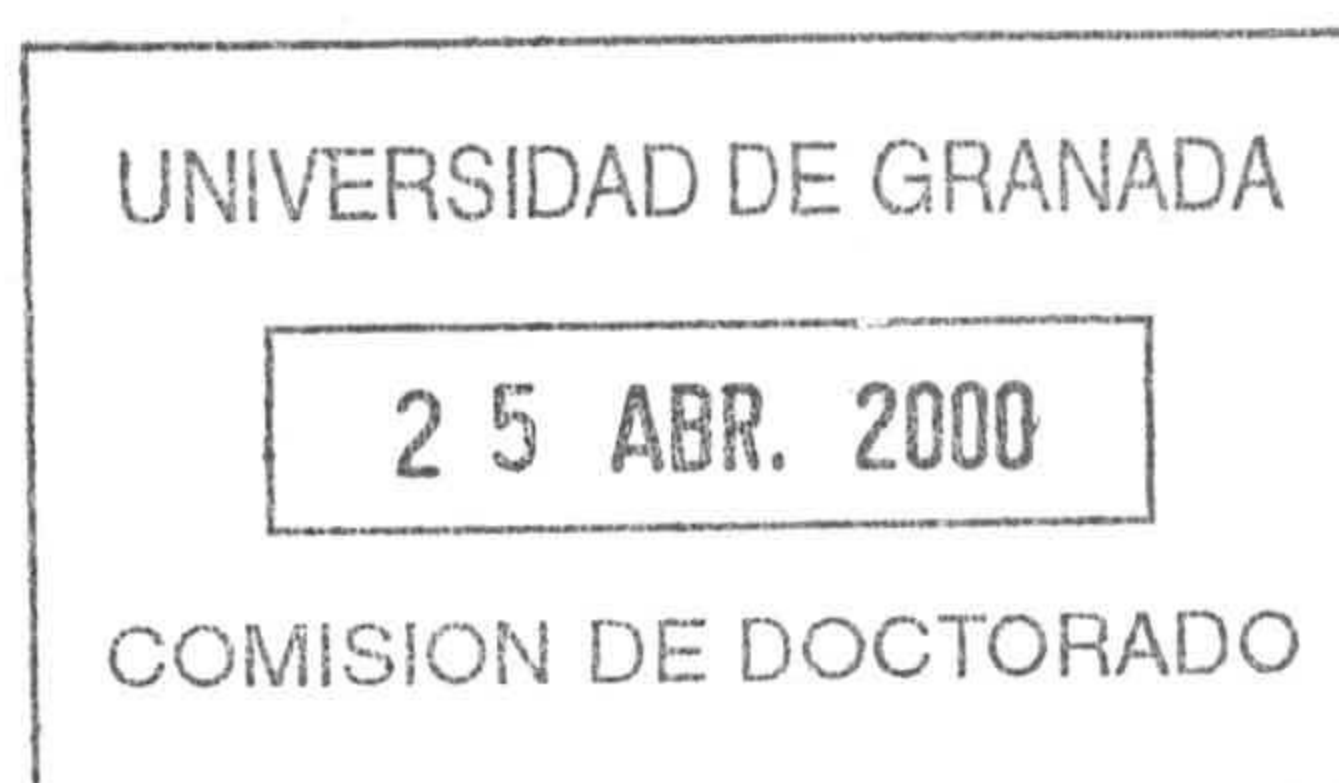
Figura 3.5. Variación de V_0 con Ac_0 para dos partículas de 130 ($S = 35 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) y 214 nm ($S = 23 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) con igual absorbancia inicial ($A_0 = 1 \text{ U.A.}$). $\lambda_0 = 570 \text{ nm}$, $l = 0.744 \text{ cm}$. $k' = 2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^{-3}\text{s}^{-1}$.

3.5.2 Punto de equivalencia. Máxima concentración de aglutinante.

3.5.2.1 Punto de equivalencia.

Se define como la región de la curva de inmuno-aglutinación donde la respuesta es máxima. A partir de esta zona se entra en la denominada en prozona inhibitoria.

Para calcular el valor máximo de V_0 , se deriva la expresión [3.34] respecto de n_A y se iguala a cero. Las soluciones son $n_A = 0$ y $n_A = n/2$, donde la primera corresponde a un mínimo y la segunda a un máximo. Por consiguiente, la máxima respuesta V_{pe} se produce cuando el anticuerpo unido es igual a la mitad del recubrimiento.



$$V_{pe} = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' \frac{n^2}{4} N_1^2 \quad [3.41]$$

Sustituyendo n por su valor ([3.38]) y teniendo en cuenta que $A_0 = C_1 N_0 l / 2.3$, resulta

$$V_{pe} = \frac{2.3}{l} k' \frac{N_A \lambda_0^2}{4M\pi n_m^2} \frac{F_{op}}{C_1} A_0^2 \alpha^2 S \quad [3.42]$$

En esta última expresión la función variable es $F_{op} \alpha^2 A_0^2 S / C_1$, que en adelante se denominará por F_{pe} , y que sirve para evaluar el efecto de los diferentes parámetros sobre la respuesta (V_0) en el punto de equivalencia. Al igual que antes, los factores analizados son el diámetro inicial de monómero, el recubrimiento y el número de partículas (A_0).

Si dos reactivos tienen un tamaño de partícula diferente pero la misma absorbancia inicial y S , la función F_{pe} queda reducida a $F_{op} \alpha^2 / C_1$. La representación gráfica de $F_{op} \alpha^2 / C_1$ en función de α (figura 3.6) muestra que V_{pe} es mayor cuanto más pequeño sea α , por lo que un incremento del diámetro inicial de monómero supone un descenso del valor de la reactividad en el punto de equivalencia.

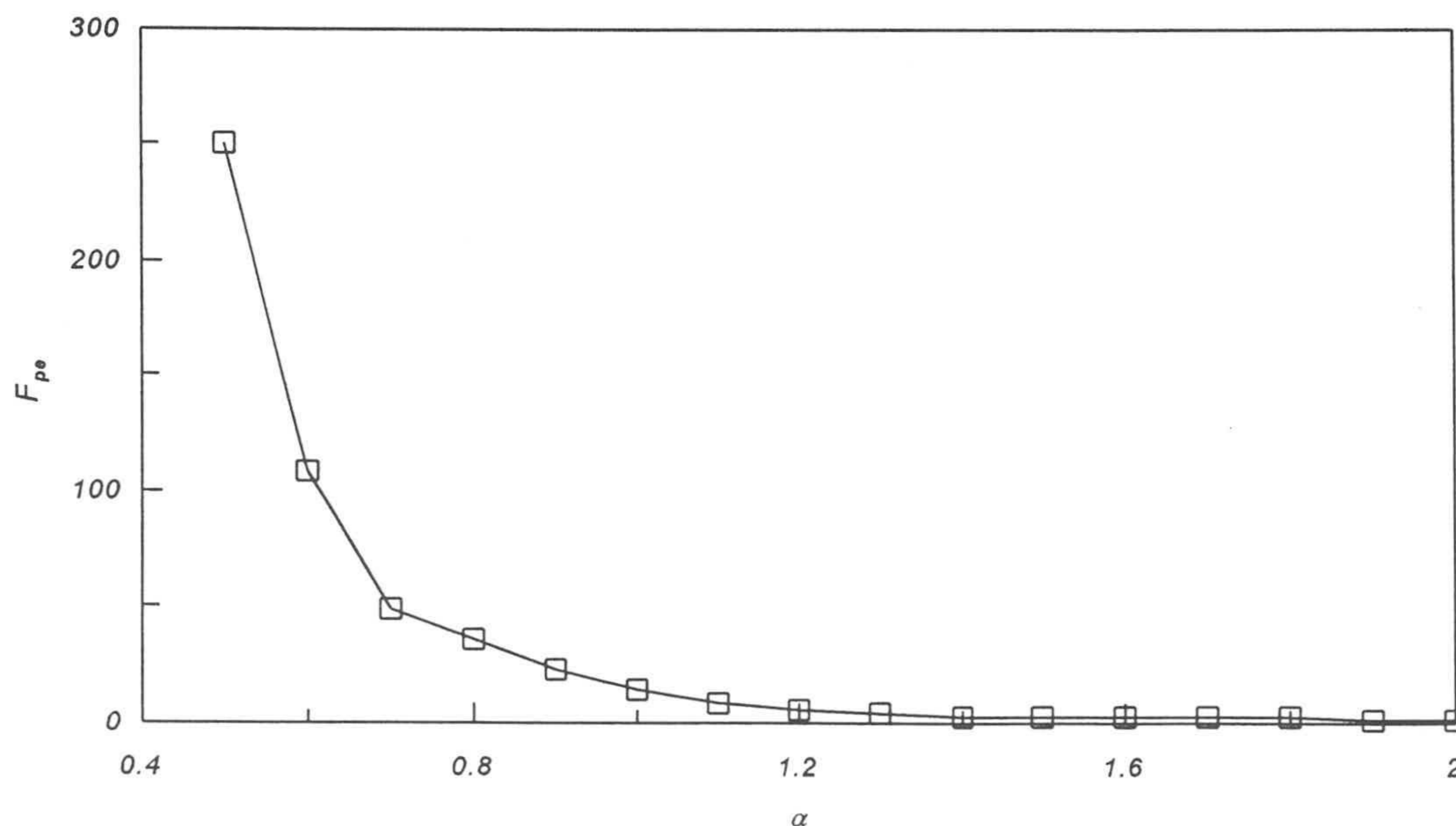


Figura 3.6. Punto de equivalencia. Variación de F_{pe} ($F_{op} \alpha^2 / C_1$) en función de α ($m=1.2$).

En el caso de que todos los parámetros sean diferentes, tanto los resultados experimentales (apartados 3 y 4 del capítulo 6) como los teóricos (figura 3.7) indican que el tamaño de partícula es el factor que más influye en la respuesta en la zona de equivalencia, siempre y cuando no exista una gran diferencia entre el número de partículas o el recubrimiento.

Volviendo a las condiciones descritas en la figura 3.5, para que la partícula de 214 nm tuviese la misma respuesta en la zona de equivalencia que la de 130 nm ($S=35 \mu\text{g}/\text{m}^2\text{lx}$, $A_0=1\text{U.A}$), sería necesario aumentar su recubrimiento en un 62% ($S=57 \mu\text{g}/\text{m}^2\text{lx}$), lo que también se puede conseguir incrementando la concentración de partículas en un 60% ($A_0=1.62 \text{U.A}$) aproximadamente. Este último caso es el que se presenta en la figura 3.8, donde el reactivo de 214 nm tiene la misma S que el de 130 nm pero con una concentración de $1.137 \cdot 10^{11} \text{cm}^{-3}$. La gráfica que se obtiene variando el recubrimiento y manteniendo constante el número de partículas es formalmente idéntica a la 3.8, por lo que no se presenta.

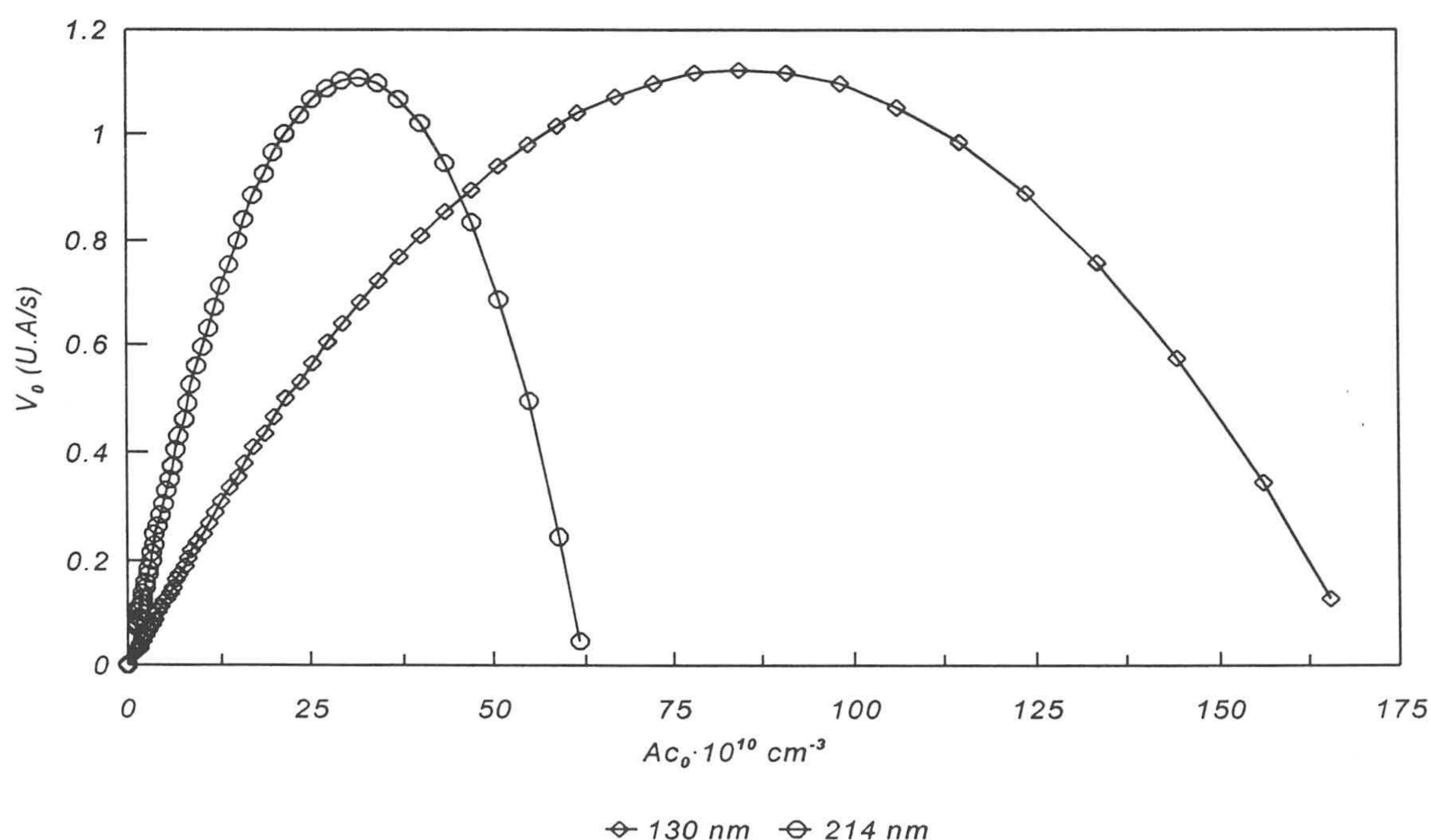


Figura 3.7. Variación de V_0 en función de Ac_0 para dos partículas de 130 ($A_0=1 \text{U.A}$) y 214 nm ($A_0=1.62 \text{U.A}$), con igual S ($35 \mu\text{g Ag}/\text{m}^2\text{lx}$). $k'=2 \cdot 10^{-12} \text{cm}^{-3} \text{s}^{-1}$. $\lambda_0 = 570 \text{nm}$ y $l=0.744 \text{cm}$.

Del estudio de las curvas V_0 - Ac_0 la conclusión a la que se llega es similar a la del análisis de la función F_{pe} , o sea, una partícula de pequeño diámetro tiene mayor respuesta en punto de equivalencia que otra de tamaño superior, siempre y cuando las diferencias en recubrimiento o en absorbancia no sean muy elevadas.

3.5.2.2 Máxima concentración de aglutinante

La concentración de aglutinante correspondiente al punto de equivalencia se obtiene a partir de la condición de máximo $n_A = n/2$. Aunque n_A represente el número de lugares ocupados por partícula, su valor se puede considerar proporcional al anticuerpo añadido, al menos hasta la concentración de máxima respuesta. A partir de este momento, el mejor modelo es el que considera un equilibrio entre el Ac añadido y el que queda en disolución, tal y como se comentó con anterioridad. El valor máximo (Ac_{pe}) viene dado por la siguiente expresión

$$Ac_{pe} = \frac{nN_0}{2} = \frac{S\pi\phi^2 N_A N_0}{2M} = \frac{l}{2.3} \frac{\lambda_0^2 N_A}{2\pi M n_m^2} \frac{S\alpha^2 A_0}{C_1} \quad [3.43]$$

donde se considera que todo el aglutinante está unido a las partículas. En Ac_{pe} la parte variable es $S\alpha^2 A_0 / C_1$, que queda reducida a α^2 / C_1 , en el caso de comparar dos reactivos con diferente tamaño pero igual S y A_0 . El comportamiento de esta función es similar al de la figura 3.6, lo que indica que a menor diámetro de partícula mayor tramo lineal de respuesta. Si por el contrario el tamaño, el recubrimiento y el número de partículas son diferentes, los estudios experimentales (capítulo 6, apartado 6.4) y teóricos indican que la Ac_{pe} es mayor a medida que desciende el tamaño inicial de partícula en un amplio rango de S y A.

Finalmente y a modo de resumen, la tabla 3.1 presenta la variación de las funciones V_{ld} , V_{pe} y A_{cpe} con ϕ , λ_0 , n_m , A_0 y S. En cada fila se evalúa como afecta el aumento de un parámetro manteniendo constantes todos los demás. Esta tabla corresponde a $\alpha < 5$.

| | Límite de detección | Punto de equivalencia | Max Aglutinante |
|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| $\phi \uparrow$ | \uparrow | \downarrow | \downarrow |
| $\lambda_0 \uparrow$ | \downarrow | \downarrow | \downarrow |
| $n_m \uparrow$ | \downarrow | \downarrow | \downarrow |
| $A_0 \uparrow$ | \uparrow | \uparrow | \uparrow |
| $S \uparrow$ | \uparrow | \uparrow | \uparrow |

Tabla 3.1. Efecto de los parámetros del medio, físicos e inmunológicos sobre las características del reactivo.

3.6 Morfología de los agregados: dimensión fractal

En la actualidad, uno de los temas que suscita más interés en disciplinas tan diversas como la Física (27, 28), Biología y Medicina (29, 30), Matemáticas (30, 31), etc es el hecho de que en los sistemas coloidales, los agregados crezcan formando estructuras que pueden ser descritas por la teoría fractal. La palabra fractal fue utilizada por primera vez por Benoit Mandelbrot (32) para describir objetos “rugosos” u “ondulados” que mostraban sus “rugosidades” en un gran número de escalas. Los más simples son los fractales autosimilares (“self-similar”), cuya estructura permanece invariante por un cambio de escala. Para obtener un fractal autosimilar (ver figura 3.8-(a)) hay que construir el objeto repitiendo el mismo proceso hasta que no se pueda distinguir entre las partículas individuales y todas las figuras (distintas escalas) parezcan idénticas (33). Ahora bien, en los experimentos de agregación no se obtienen este tipo de fractales sino otros que se denominan desordenados (figura 3.8-(b)), donde existe una componente aleatoria. En este caso las figuras son estadísticamente equivalentes al agregado original, lo que significa que existe la misma probabilidad de conseguir este agregado en un experimento similar. Los fractales de este tipo son autosimilares en media. Un objeto autosimilar se caracteriza por tener una estructura ramificada, donde un proceso de crecimiento implica una disminución de la densidad del fractal en el volumen que este ocupa.

Para que un agregado real sea un objeto fractal, se establecen dos premisas básicas (27, 33)

- ▶ el radio del agregado (ξ) y de cada una de las partículas (R) que lo forman deben ser claramente diferentes (el agregado ha de estar formado por un número elevado de partículas)
- ▶ las propiedades fractales tienen que cumplirse en un amplio intervalo de tamaños entre R y ξ

Con estas dos condiciones la autosimilitud en media está asegurada y el agregado real tendrá una naturaleza fractal (obedece las leyes de los fractales ideales).

Un objeto fractal se caracteriza por un parámetro relacionado con la distribución espacial de la masa dentro del agregado, que recibe el nombre de dimensión fractal, d_f . Este

factor se entiende como una medida del grado de ocupación de las partículas del agregado. Por ejemplo, si todas las partículas están alineadas a lo largo de una línea recta $d_f=1$, si están ordenadas en una matriz de dos dimensiones $d_f=2$, etc. En teoría, sea cual sea el número de dimensiones D del espacio (33), si la disposición de las partículas es homogénea y compacta, la dimensión fractal será igual a D . En realidad los resultados experimentales indican que d_f es un número real no entero menor que D .

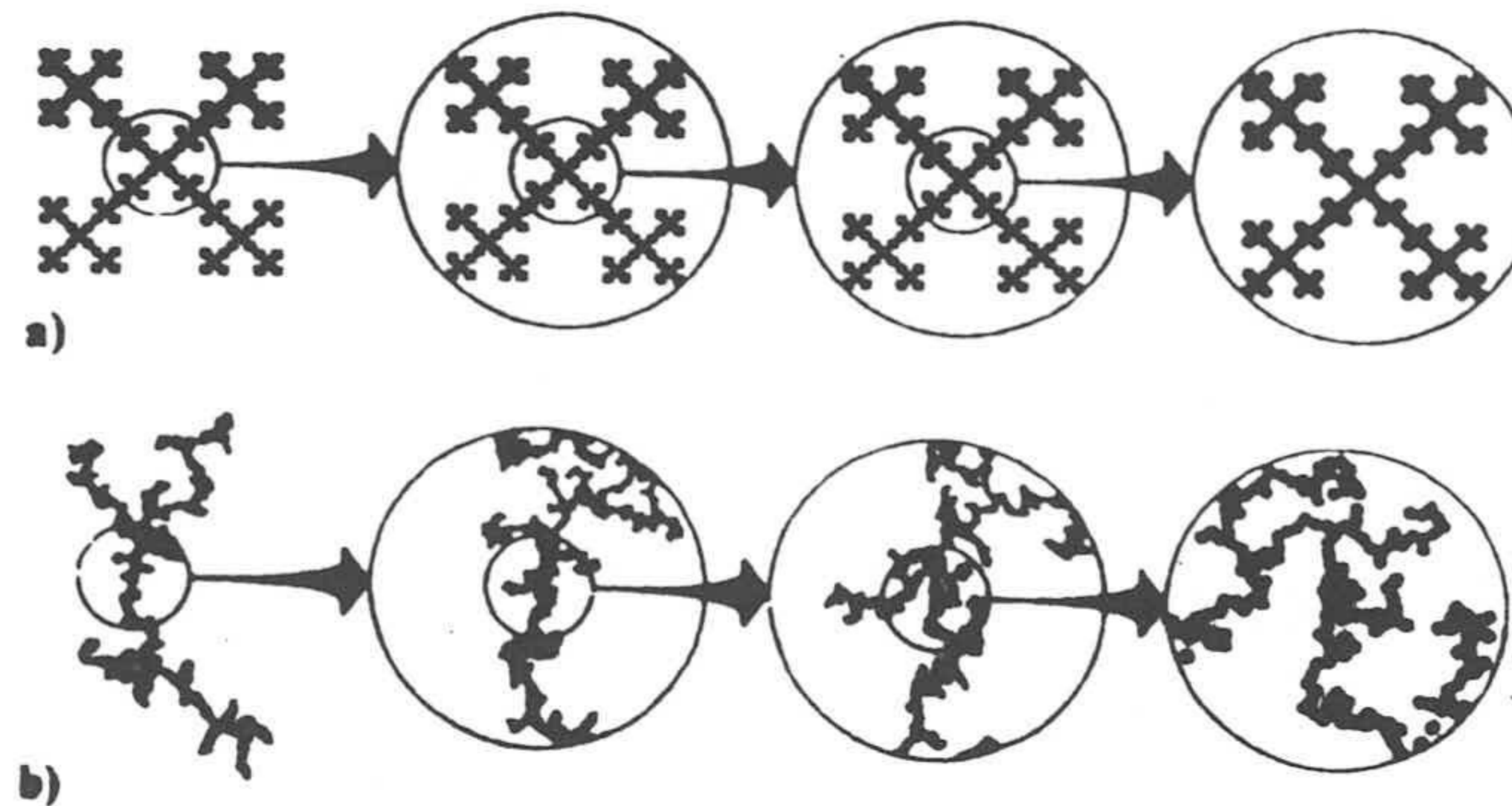


Figura 3.8. Autosimilaridad de los objetos fractales (a) Fractal ideal (b) Fractal real.

La estructura o morfología de los agregados coloidales depende de su cinética de formación, que como se ha dicho en más de una ocasión, puede estar controlada por difusión o por reacción. Cada cinética da lugar a agregados con dimensiones fractales diferentes que tienen carácter universal, es decir, dos sistemas de distinta naturaleza pueden tener igual d_f si su mecanismo de reacción es el mismo (34, 35). Caben distinguir dos mecanismos, limitado por difusión o DLCA (“Diffusion Limit Cluster Aggregation”) donde la agregación depende sólo del movimiento browniano de las partículas, y limitado por reacción o RLCA (“Reaction Limit Cluster Aggregation”), donde las partículas han de superar una barrera energética para poder unirse (son necesarios un gran número de choques), lo que hace mucho más lenta la unión entre los agregados y da lugar a una estructura más compacta. En efecto, en la DLCA d_f está alrededor de 1.8 (27-29, 34-36), mientras que en la RLCA es de 2.1 (29, 34-36, 37).

Ahora bien, en ciertos sistemas se obtienen dimensiones fractales superiores a 2.1 (~ 2.5), lo que no se debe a un mecanismo de aglutinación diferente, sino a una reorganización interna del agregado (34, 38, 39, 40). Para determinar si existe o no reordenación del fractal, hay que estudiar la evolución temporal de la distribución de tamaños durante la reacción y determinar el parámetro de homogeneidad λ de van Dogen y Ernst (41).

El modelo de van Dogen y Ernst considera que las velocidades de agregación son funciones homogéneas del tamaño de los agregados, lo que junto con las hipótesis de tiempos de aglutinación elevados y suspensiones diluidas, permite solucionar la ecuación de Smoluchowski (expresión [3.29]). El parámetro λ determina el comportamiento de la distribución de tamaño para un tiempo de agregación elevado, así como también la rapidez de formación de los agregados. A partir del valor de λ se distinguen dos tipos de procesos (41, 42), de no gelación ($\lambda \leq 1$) y de gelación ($1 < \lambda \leq 2$):

► $\lambda \leq 1$. En este caso se forma un agregado infinito en un tiempo infinito. Cuando $\lambda < 1$, la variación del radio medio de agregado con el tiempo viene dada por [3.44]-(a) (dependencia potencial). Esta ecuación sirve para determinar el valor de λ , si previamente se conoce la evolución temporal de $\xi(t)$ y la dimensión fractal. Si es λ negativo, el sistema tiene una evolución muy lenta ya que las uniones se producen principalmente entre agregados de pequeño tamaño. Cuando $\lambda = 0$, todas las reacciones de formación de agregados son igualmente probables, y el mecanismo de aglutinación es DLCA. Si $\lambda = 1$, la cinética es RLCA y $\xi(t)$ sigue la expresión [3.44]-(b) (dependencia exponencial).

$$\begin{aligned}\xi(t) &= R t^{\frac{1}{d_f(1-\lambda)}} \quad (a) \\ \xi(t) &= R e^{bt} \quad (b)\end{aligned} \tag{3.44}$$

► $1 < \lambda \leq 2$. Las velocidades de formación son tan grandes que se forma un agregado infinito en un tiempo finito, lo que constituye una de las fases de un gel.

En el capítulo de resultados (apartado 6.9.2) se incidirá de nuevo sobre el tema de la reestructuración.

Sin embargo, hay algunos autores (27, 43) que justifican una dimensión fractal de 2.5 o incluso superior, en el caso de que los agregados se formen mayoritariamente por la unión de un monómero a un agregado. Este tipo de aglutinación daría lugar a estructuras muy compactas, ya que dos agregados interpenetran menos entre sí que un solo monómero y un agregado. Una d_f alrededor de 2.5 es típica de los sistemas donde la aglutinación se produce por la unión de dos proteínas (29, 38, 34, 44), como es el caso de un inmuno-diagnóstico de soporte coloidal.

Tal y como se comentó anteriormente, los dos mecanismos de reacción exhiben características universales relacionadas con la cinética de formación y morfología de los

agregados. Para DLCA, el radio medio de agregado crece respecto a una potencia del tiempo mientras que el régimen RLCA lo hace de manera exponencial, tal y como se puede ver en la expresión [3.44] (27-29, 35, 45).

Hay varias técnicas para medir la dimensión fractal, como son la dispersión de neutrones o de luz e incluso la microscopía electrónica si las partículas tienen un tamaño lo suficientemente elevado (36, 46). Debido a la facilidad de medida y cálculo, una de las más utilizadas es la dispersión de luz, dentro de la cual se distinguen dos métodos:

► Espectroscopía de fotocorrelación (PCS), donde el crecimiento cinético de los agregados se controla midiendo el radio medio durante el proceso de aglutinación. Este tamaño se obtiene a partir del análisis de cumulantes de la función de autocorrelación (ver apartado 4.3.3). Dependiendo de la evolución temporal del radio (expresión [3.44]) la aglutinación está controlada por difusión o por reacción (28, 34, 38, 45, 47, 48).

► Espectroscopía estática angular o dispersión estática de luz (SLS). En este caso se mide la intensidad media de la luz dispersada $I(q)$ en función del ángulo de dispersión θ . $I(q)$ suministra información sobre la interacción entre las partículas y por tanto de la morfología de los agregados. $I(q)$ viene dada por la siguiente expresión:

$$I(q) \approx \rho_m P(q) S(q) \quad [3.45]$$

donde q es el módulo del vector de onda ($q=4\pi n_m \sin(\theta/2)/\lambda_0$), ρ_m la densidad media de la muestra, $P(q)$ el factor de forma (expresión [2.14]) y $S(q)$ el factor de estructura. Para poder calcular la dimensión fractal a partir de $I(q)$ (29, 34, 49) se debe cumplir la condición $1/\xi \ll q \ll 1/R$, ya que en este caso el factor de estructura es aproximadamente igual a q^{-df} . Todo esto, al igual que el significado de las funciones $P(q)$ y $S(q)$, se verá con mayor detalle en el siguiente apartado.

Sin embargo, el mayor inconveniente que tiene calcular la dimensión fractal mediante las técnicas de dispersión de luz, es la baja concentración de partículas que hay que utilizar para evitar la dispersión múltiple (50). Si la cantidad inicial de monómeros es muy elevada, la luz dispersada por una partícula puede "iluminar" a otra u otras (redispersión de la radiación incidente) lo que constituye una fuente de error. Ahora bien, en los reactivos de inmuno-diagnóstico de soporte coloidal, para que la reacción sea detectable se necesita un

gran número de antígenos y de anticuerpos y por tanto de partículas. Para evitar la dispersión múltiple y medir la dimensión fractal con la técnica PCS o SLS, habría que realizar la inmuno-aglutinación fuera de la cubeta del instrumento e ir “enfriando” la reacción para cada tiempo de medida. Este proceso, además de ser largo y dificultoso, tiene como principal inconveniente la falta de reproducibilidad. Por esta razón se ha escogido la turbidimetría para determinar la d_f del sistema [Ix-Ag P-B]-Ac P-B, ya que esta técnica es prácticamente insensible al número de dispersores (50, 51). El fundamento de este método es igual que el de la espectroscopía estática angular, aunque en este caso q cambia al modificar la longitud de onda de la radiación incidente y no el ángulo de dispersión.

3.7 Determinación de la dimensión fractal por turbidimetría

La turbidez (expresión [2.23]) de una muestra formada por una colectividad de N esferas dispersoras viene dada por

$$\tau = C_{sca} N \quad [3.46]$$

donde C_{sca} es la sección eficaz de dispersión de cada monómero. A partir de la expresión [2.15] (C_{sca} en la teoría RGD), resulta

$$\tau = \frac{4\pi R^2}{9} \alpha^4 (m-1)^2 N \int_0^\pi P(\theta) (1 + \cos^2\theta) \sin\theta \, d\theta \quad [3.47]$$

$P(\theta)$ es el factor de forma ([2.14]) y representa la modificación de la intensidad de la luz dispersada debido al tamaño finito de la partícula y a su desviación respecto de la esfericidad (50). Ahora bien, en un objeto fractal la luz dispersada a un ángulo θ está modificada no sólo por $P(\theta)$, sino también por como están distribuidas las partículas dentro del agregado (51, 52). Esta información está recogida en el factor de estructura $S(q)$ (53) función que evalúa la interferencia de los campos eléctricos dispersados por las diferentes partículas que forman el agregado. Se define $S(q)$ como la transformada de Fourier de la

función de correlación de densidad $g(r)$, de manera que

$$S(q) = 1 + 4\pi\rho_0 \int_0^\infty |g(r) - 1| r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad [3.48]$$

$g(r)dr$ se entiende como la probabilidad de encontrar partículas dentro de una esfera de radio $r+dr$. Los fractales son isotrópicos (52), es decir, que las correlaciones en densidad sólo dependen de r y no de la posición.

A partir de [3.46], [3.47] y [3.48] se obtiene la turbidez correspondiente a un sistema agregado

$$\begin{aligned} \tau &= \pi R^2 \alpha^4 (m-1)^2 N Q \\ Q &= \frac{4}{9} \int_0^\pi P(\theta) S(q) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \end{aligned} \quad [3.49]$$

donde Q es el llamado "factor de forma de turbidez" (51, 54). Su interpretación física es similar a la $P(\theta)$, pero incluye el cambio de intensidad de la luz dispersada debido a las interferencias entre las partículas que forman el agregado (factor de estructura).

Partiendo de una situación real, donde el tamaño de los agregados es finito pero siendo ξ y R claramente diferentes (se cumplen las condiciones de objeto fractal), la utilización de una función exponencial decreciente $\exp(-r/\xi)$ produce una $g(r)$ tal, que transformada analíticamente, da lugar a la siguiente expresión del factor de estructura (52, 54)

$$S(q) = 1 + \frac{d_f \Gamma(d_f - 1)}{(qR)^{d_f} \left(1 + \frac{1}{q^2 \xi^2}\right)} \sin[(d_f - 1) \arctan(q\xi)] \quad [3.50]$$

siendo $\Gamma(x)$ la función gamma (51). Existen otras expresiones para $S(q)$ (51, 53, 56) aunque no se ha comprobado su validez a nivel teórico o experimental.

En $S(q)$ caben distinguir los siguientes regímenes de dispersión (37, 52):

►Valores elevados de q ($qR \gg 1$). $S(q) \approx 1$ y la radiación dispersada está controlada por el factor de forma de cada una de las partículas.

►Valores intermedios de q ($1/\xi \ll q \ll 1/R$). En este intervalo, el factor de forma contribuye de manera constante a la intensidad dispersada a medida que aumenta el tamaño de agregado (41), mientras que $S(q)$ tiende a $(qR)^{-d_f}$. Efectivamente

$$\lim_{\xi \rightarrow \infty} S(q) = 1 + \frac{d_f \Gamma(d_f - 1)}{(qR)^{d_f}} \sin\left[\frac{(d_f - 1)\pi}{2}\right] = 1 + \frac{\text{constante}}{(qR)^{d_f}} \approx (qR)^{-d_f} \quad [3.51]$$

Este resultado es uno de los más utilizados para calcular la dimensión fractal, tal y como se ha comentado anteriormente, aunque debe cumplirse la condición de que $1/\xi \ll q \ll 1/R$. En efecto, en la figura 3.9 se presenta la variación de $S(q)$ (ecuación [3.50]) con $q\xi$ para una dimensión fractal de 2.5 y varias razones entre el radio del agregado y del monómero (ξ/R), 100, 10 y 5. Véase que la intensidad dispersada es prácticamente lineal entre $q=1/\xi$ y $q=1/R$ (está señalado con una flecha en cada una de las curvas).

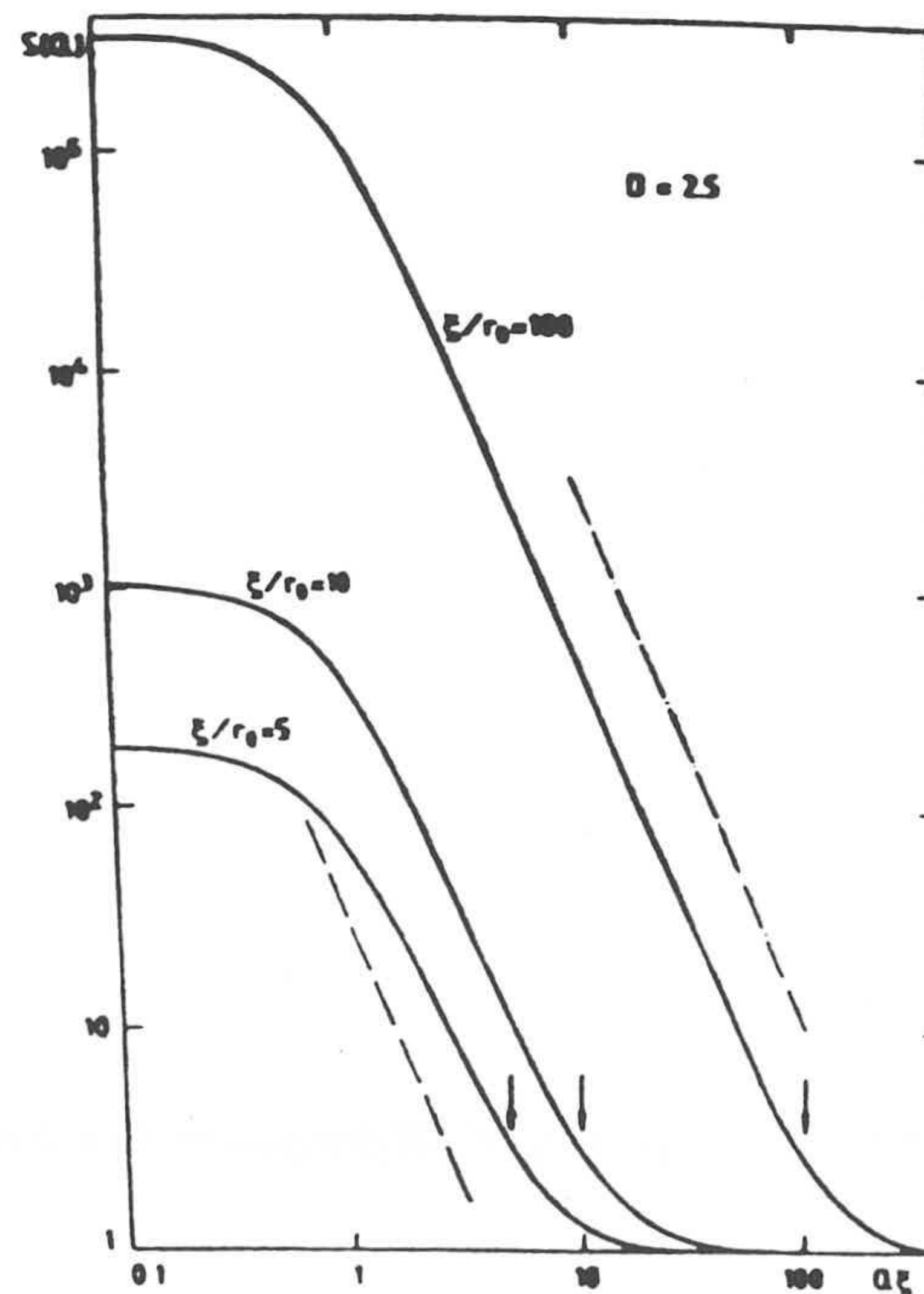


Figura 3.9. Representación de $S(q)$ (expresión [3.51]) para $d_f=2.5$ y varias razones ξ/R (100, 10 y 5). Las flechas indican $qR=1$ y las líneas de puntos la dependencia $q^{-2.5}$ (44).

►Valores bajos de q ($q\xi \ll 1$). En este caso el sistema se comporta como si fuese una sola partícula de radio ξ para un ángulo de dispersión pequeño.

Si en la expresión [3.49] se calcula el logaritmo y se deriva respecto a $\ln\lambda_0$ (λ_0 es la longitud de onda en el vacío), resulta

$$\frac{-d \ln\tau}{d \ln\lambda_0} = 4 - \frac{d \ln Q}{d \ln\lambda_0} - \frac{d [\ln(n_m^4(m-1)^2)]}{d \ln\lambda_0} = 4 - \beta - \gamma \quad [3.52]$$

de manera que

$$\beta = \frac{d \ln Q}{d \ln\lambda_0} = 4 - \gamma + \frac{d \ln\tau}{d \ln\lambda_0} \quad [3.53]$$

siendo γ un coeficiente donde está recogida la variación del índice de refracción del medio n_m y de la partícula n_e con la longitud de onda de la radiación incidente. γ se determina a partir de las siguientes expresiones analíticas (57)

$$\begin{aligned} n_m^2 &= 1.7521 + \frac{8110}{\lambda_0^2} \\ n_e^2 &= 2.4251 + \frac{36054}{\lambda_0^2} \end{aligned} \quad [3.54]$$

de las que se deduce que el intervalo de λ_0 entre 450 y 800 nm, γ tiene un valor igual a $-0.3872 \pm 0.001 \text{ nm}^{-1}$, con un coeficiente de correlación lineal de 0.991 (36 valores). Tal y como se verá en el capítulo de resultados (apartado 6.9.3), el intervalo de longitud de onda 450 y 800 nm se ha escogido en función del tamaño de agregado, ya que el valor de α debe estar dentro del rango de validez de la teoría RGD.

Integrando la expresión [3.49] y derivando $\ln Q$ respecto de $\ln\lambda_0$, se demuestra que el parámetro β tiende a la dimensión fractal a partir de un determinado tamaño de agregado. En efecto, introduciendo la relación $S(q) \sim (qR)^{-df} = (4\pi n_m \sin(\theta/2)/\lambda_0)^{-df} R^{-df}$ en Q (ecuación [3.49]) resulta

$$Q \approx \lambda_0^{-d_f} (4\pi n_m)^{-d_f} R^{-d_f} \int_0^\pi P(\theta) S(q) (1 + \cos^2\theta) \sin\theta d\theta = \lambda_0^{-d_f} f(\theta) \quad [3.55]$$

y si $f(\theta)$ converge, entonces

$$\ln Q \approx -d_f \ln \lambda_0 + cte \Rightarrow -d_f = \frac{d \ln Q}{d \ln \lambda} \quad [3.56]$$

En la figura 3.10 se presenta la variación teórica de β en función ξ (nm) para dos radios de monómero, 71 y 142 nm y con las cinéticas de agregación, DLCA ($d_f \approx 1.75$) y RLCA (≈ 2.1). También se ha incluido el caso en el que la dimensión fractal sea igual a 2.5, ya que este es el resultado obtenido en los experimentos de agregación (apartado 6.9.3). La longitud de onda en el vacío varía entre 450 y 800 nm. Los radios se han escogido en función del diámetro del complejo RP-130-Ag P-B (~ 142 nm). La figura 3.10 se ha obtenido a partir de una simulación teórica por ordenador (integral numérica) de la ecuación [3.49], donde se ha incluido la expresión [3.50] completa. Al integrar para todos los θ , puede que alguno de los valores de q esté fuera del intervalo de validez de $S(q) \propto (qR)^{-d_f}$.

En la figura 3.10 se observa que β tiende a d_f cuando ξ tiene un valor muy elevado, sea cual sea el mecanismo de reacción o el radio de monómero. A excepción de los agregados de pequeño tamaño, donde la interacción entre $P(\theta)$ y $S(q)$ no es significativa y el factor de estructura no tiene una forma apropiada, β muestra muy poca dependencia con el valor inicial de R . Estas diferencias serían mayores si los radios iniciales fueran mucho menores y diferentes entre si.

El valor experimental de β se determina midiendo simultáneamente durante el transcurso de la reacción, la absorbancia óptica en distintos instantes de tiempo y varias longitudes de onda, para a continuación aplicar las ecuaciones [3.53] y [3.56]. El proceso acaba cuando β alcanza su valor asintótico. En el capítulo de resultados se explicarán que criterios se han seguido a la hora de elegir las condiciones experimentales de trabajo, como número de partículas, concentración de anticuerpo, longitud de onda y tiempo de medida. Todo esto no se ha ubicado en el capítulo de métodos, ya que la puesta a punto de la técnica da lugar a unos resultados muy interesantes, por lo que se ha considerado más correcto reflejarlos junto con los cálculos de la dimensión fractal.

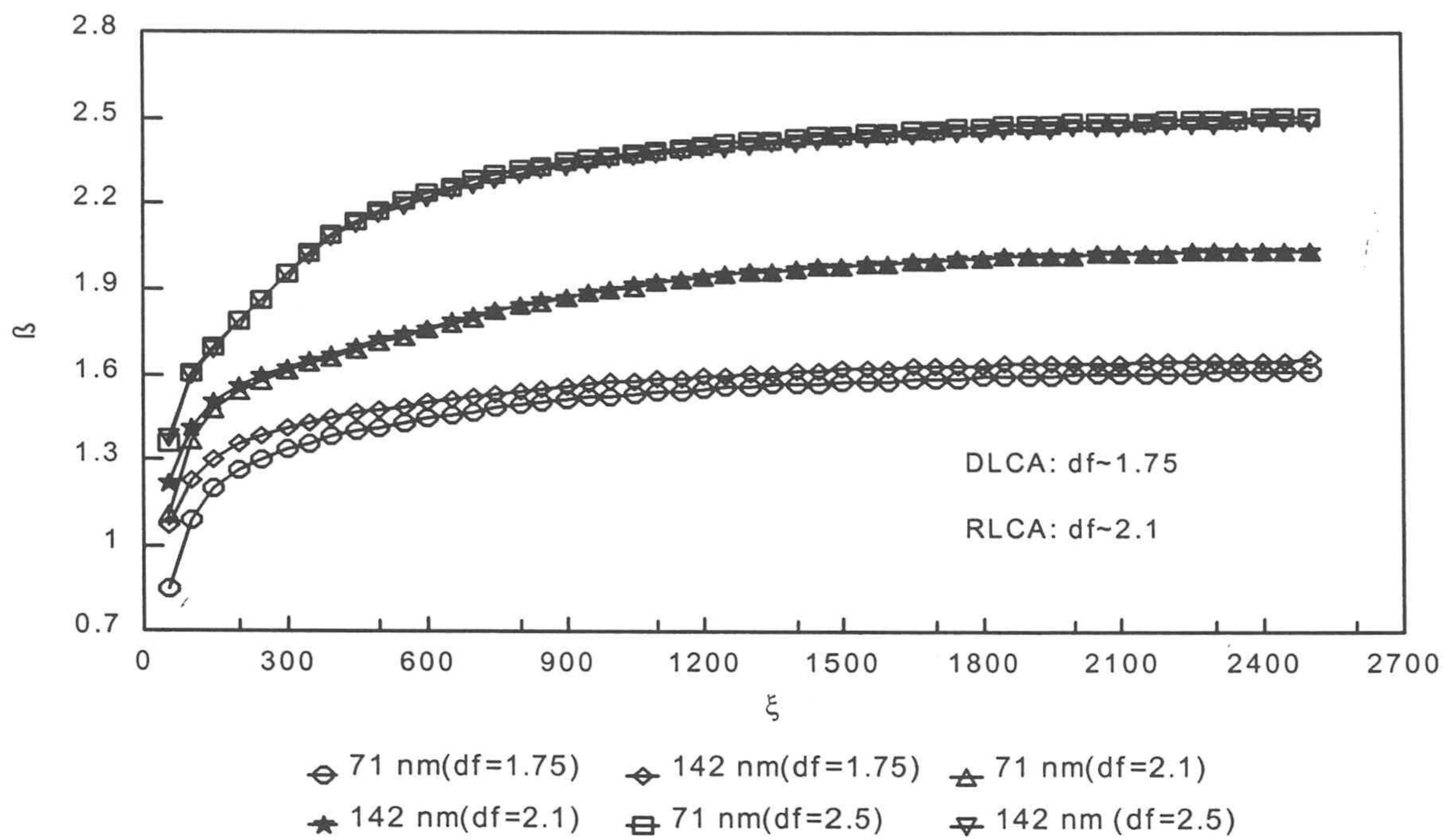


Figura 3.10. Variación de β con el radio de agregado ξ (nm) para distintos mecanismos de agregación (DLCA y RLCA) y dos radios de monómero, 71 y 142 nm. También se incluye el caso $d_f=2.5$.

3.8 Bibliografía

- (1) Berg, O. G; von Hippel, P. H. Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Ann. Rev. Biophys. Chem*; 14,131, (1985).
- (2) Brouwer, A. C; Kirsch, J. F. Investigation of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation. *Biochem*; 21, 1302, (1982).
- (3) Feder, J; Jøssang, T; Rosenquist, E. Scaling behaviour and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins. *Phys. Rev. Meth*; 53, 1403, (1984).
- (4) Schurr, J. M. The role of diffusion in molecular solution kinetics. *Biophys. J*; 10, 700, (1970).
- (5) Noyes, R. Effects of diffusion rates on chemical kinetics. *Prog. React. Kinet*; 1, 129, (1961).
- (6) Hiemenz, P.C. Sedimentation and diffusion and their equilibrium. In: *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. (Ed: Lagowsky, J. J). Marcel and Dekker, Inc. New York.
- (7) Debye, P. *Trans. Electrochem. Soc*; 82:265, (1942).
- (8) Delisi, C; Wiegel, W. F. Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 5569, (1981).
- (9) McMillan, W. G; Mayer, J. E. *J. Chem. Phys*; 13:276, (1945).
- (10) Smoluchowski, M. V. Versuch einer mathematischen theorie der koagulationkinetic kolloider lösungen. *Z. Phys. Chem*; 92:129, (1917).
- (11) Balgi, G; Leckband, D. E; Nitsche, J. M. Transport effect on the kinetics of protein-surface binding. *Biophys. J*; 68: 2251, (1995).
- (12) Northrup, S. H; Allison, S. A; MacCammon, J. A. Brownian dynamics simulation of diffusion- influenced bimolecular reaction. *J. Chem. Phys*; 80:1517, (1984).

- (13) Solc, K; Stockmayer, W. H. Kinetics of diffusion-controlled reaction between chemically asymmetric molecules. I. General theory. *J. Chem. Phys*; 54: 2981, (1971).
- (14) Nygren, H; Stenberg, M. Rate limitation of antigen-antibody reactions: theoretical and practical aspects. *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*. CRC Press, (1991).
- (15) Berdnikov, V. M; Doktorov, A. B. Steric factor in diffusion-controlled chemical reactions. *Chem. Phys*; 69, 205, (1982).
- (16) Paek, S-H; Schramm, W. Modeling of immunosensors under nonequilibrium conditions. *Anal. Biochem*; 196, 319, (1991).
- (17) Stenberg, M; Nygren, H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J. Immunol. Meth*; 113: 3, (1988).
- (18) Solc, K; Stockmayer, W. H. Kinetics of diffusion-controlled reaction between chemically asymmetric molecules. II. Approximate Steady-State solution. *Inter. J. Chem Kin*; 5, 733, (1973).
- (19) Schurr, J. M; Schmitz, K, S. Orientation constraints and rotational diffusion in bimolecular solution kinetics . A simplification. *J. Phys. Chem*; 80:1934, (1976).
- (20) Mason, D. W; Williams, A. F. Kinetics of antibody reactions and the analysis of cell surface antigens. In: *Handbook of Immunology*. (Ed D.M Weir), Blackwell, Oxford, 1, 38.
- (21) Shoup, D; Szabo, A. Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound receptors. *Biophys. J*; 40: 33, (1982).
- (22) Berg, O. G. Orientation constraints in diffusion-limited macromolecular association. *Biophys; J*. 47,1, (1985).
- (23) La Mer, V; Healy, T. W. Adsorption-flocculation reactions of macromolecules at the solid-liquid interface. *Rev. Pure. Appl. Chem*; 13, 112, (1963).
- (24) Singer, J. M; Vekemans, F. C. A; Lichtenbelt, J. W. TH; Hesselink, F. TH; Wiersema, P.H. Kinetics of flocculation of latex particles by human gamma globulin. *J. Colloid. Sci*; 45, 608, (1973).

- (25) Quesada, M; Puig, J; Delgado, J. M; Peula, J. M; Molina, J. A; Hidalgo-Álvarez, R. A simple kinetic model of antigen-antibody reactions in particle-enhanced light scattering immunoassays. *Colloid Surf. B: Biointerfaces* 8. 303, (1997).
- (26) Quesada, M; Puig, J; Delgado, J. M; Hidalgo-Álvarez, R. Modelling the kinetics of antigen-antibody reactions at particle enhanced optical immunoassays. *J. Biom. Sci. Polymer Edition*. 9, 961, (1998).
- (27) Jullien, R. The application of fractals to investigation of colloidal aggregation and random deposition. *New J. Chem*, 14, 239, (1990).
- (28) Kolb, M; Botet, R; Jullien, R. Scaling of kinetically growing clusters. *Phys. Rev. Lett*, 51, 1123, (1983).
- (29) Hagirawa, T; Kumagai, H; Nakamura, K. Fractal analysis of aggregates formed by heating dilute BSA solutions using light scattering methods. *Biosc. Biotech. Biochem*; 60, 1757, (1996)
- (30) Sandau, K; Kürtz. Measuring fractal dimension and complexity-an alternative approach with an application. *J. Micro*; 186, 164, (1997).
- (31) Sandau, K. A note on fractal sets and the measurement of fractal dimension. *Physica A*, 233, 1, (1996).
- (32) Mandelbrot, B. B. *The fractal geometry of nature*, Ed: W. H. Freeman, San Francisco (1982).
- (33) Berntson, G. M; Stoll, P. Correcting for finite spatial scales of self-similarity when calculating the fractal dimensions of real-world structures. *Proc. R. Soc. Lond. B*; 264, 1531, (1997).
- (34) Lin, M.Y; Lindsay, H. M; Weitz, D. A; Ball, R. C; Klein, R; Meakin, P. Universality in colloid aggregation. *Nature*, 339, 6223, 360, (1989).
- (35) Meakin, P. Formation of fractal clusters and networks by irreversible diffusion-limited aggregation. *Phys. Rev. Lett*, 51, 1119, (1983).

- (36) Weitz, D; Lin, M; Huang, J. In: physics of complex and supermolecular fluids. (Eds; Safran, S; Clark, N). John Wiley & Sons, New York, (1987).
- (37) Lin, M. Y; Lindsay, H. M; Weitz, D. A; Ball, R. C; Klein, R; Meakin, P. Universal reaction colloid aggregation. *Phys. Rev. A*; 41, 2005, (1989).
- (38) Feder, J; Jøssang, T; Rosenquist, E. Scaling behaviour and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins. *Phys. Rev. Lett*; 53, 15, (1984).
- (39) Stoll, S; Elaissari, A; Pefferkorn, E. Fractal dimensions of latex aggregates: correlation between hydrodynamic radius and cluster size. *J. Colloid. Interface Sci*; 140, 98, (1990).
- (40) Aubert, C; Cannell, D. S. Restructuring of colloidal silica aggregates. *Phys. Rev. Lett*; 56, 738; (1985).
- (41) Van Dogen, P. G. J; Ernst, M. H. Dynamic scaling in the kinetics of clustering. *Phys. Rev. Lett*; 54, 1396, (1985).
- (42) Fernández Barbero, A. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (1994).
- (43) De young, L. R; Fink, A. L; Dill, K. A. Aggregation of globular proteins. *Accounts Chem. Research*, 26, 614, (1993). *Phys. Rev. A*.
- (44) Hagirawa, T; Kumagai, H; Matsunaga, T. Fractal analysis of the elasticity of BSA and β -lactoalbumin gels. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 3807 (1997).
- (45) Tromelin, A; Gnanou, J. C; Andrès, C; Pourcelot, Y; Chaillot, B. Study of morphology of reactive dissolution interface using fractal geometry. *J. Pharm. Sci*; 85, 9, (1996).
- (46) Chu, B. *Laser Light Scattering*. 2^o ed. Academic Press. (1991).
- (47) Schmitz, K. S. *An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules*. Academic Press, (1990).
- (48) Georgalis, Y; Umbach, P; Saenger, W; Ihmels, B; Soumpais, D. M. Ordering of fractal clusters in crystallizing lysozyme solutions. *J. Am. Chem. Soc*; 121, 1627, (1999).

-
- (49) Kerker, M. *The Scatter of Light and Other Electromagnetic Radiation*. (Eds: Loebel, E. M). Academic Press, (1969).
- (50) Apfel, U; Grunder, R; Ballauf, M. A turbidity study of particle interaction in latex suspensions. *Colloid & Polymer Science*, 272, 820, (1994).
- (51) Teixeira, J. Experimental methods for studying fractal aggregates. In: *On Growth and Form*. (Eds: Stanley, H. E; Ostrowsky, N). Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, 145, (1986).
- (52) Ottewill, R. H. Direct measurements of particle-particle interactions. *Prog. Colloid & Polymer. Sci*; 67, 71, (1980).
- (53) Horne, D. S. Determination of fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc*; 83, 259, (1987).
- (54) Spiegel, M. R; Abellanas, L. *Formulas y tablas de matemática aplicada*. McGraw-Hill. Madrid, 193, (1988).
- (55) Lin, M. Y; Klein, R; Lindsay, H. M; Weitz, D. A; Ball, R. C; Meakin, P. The structure of fractal colloid aggregates of finite extent. *J. Colloid. Interface Sci*; 137, 263, (1990).
- (56) Maron, S. H; Pierce, P. E; Uevich, N. J. Determination of latex particle size by light scattering. IV. Transmission measurements. *J. Colloid Interface Sci*; 18, 470, (1963).

CAPÍTULO 4

MATERIAL

4.1 Introducción

4.2 Material

4.3 Instrumentación

4.4 Bibliografía

UNIVERSIDAD DE GRANADA

25 ABR. 2000

COMISION DE DOCTORADO

4.1 Introducción

En este capítulo se llevará a cabo la descripción de todos los materiales implicados en la elaboración de los diferentes complejos látex-proteína, así como de los instrumentos de medida utilizados.

La mayor parte de los inmuno-ensayos de soporte coloidal utilizan básicamente los siguientes materiales:

- ▶ Partículas de látex. Sirven para aumentar la detección de la reacción Ag-Ac. Las características de la partícula (tamaño, carga superficial, etc) (1) pueden variar dependiendo del sistema antígeno-anticuerpo o de las exigencias del reactivo (límite de detección, rango de trabajo, etc).
- ▶ Proteínas de sensibilización y bloqueo. La proteína de sensibilización es la que recubre las partículas y suele ser un Ag o un Ac. Los lugares que quedan libres en la superficie se bloquean con una proteína inerte a la reacción como la albúmina bovina (BSA).
- ▶ Aglutinante. Es el Ac o el Ag específico del que está adsorbido al látex. Mediante su detección se sabe si un individuo tiene o ha tenido una determinada enfermedad. Esta proteína puede estar en suero sanguíneo, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.
- ▶ Tampones de trabajo. Normalmente son el tampón de resuspensión del reactivo y el de reacción. El pH, fuerza iónica, tipo de sal, etc (1) se eligen en función de la estabilidad coloidal a largo plazo (tampón de resuspensión) y de la reactividad (tampón de reacción). Todos estos tampones se presentarán a lo largo de esta Tesis, durante la descripción de los distintos métodos de sensibilización, bloqueo, dilución y reacción (capítulo de métodos y resultados).

Los instrumentos que se han utilizado en esta Memoria se pueden dividir en dos grandes grupos, los ópticos, como el autoanalizador Monarch 2000 I-L, el espectrofotómetro Shimadzu UV-2101 PC y el Malvern 4700 PCS, con los cuales ha sido posible medir la reactividad (Monarch y Shimadzu), el tamaño de partícula (Shimadzu y Malvern), la constante de velocidad de formación de dímeros (Monarch) y por último la dimensión fractal (Shimadzu y Malvern). El otro grupo lo componen aquellos que se han utilizado para caracterizar los tampones de reacción (viscosidad e índice de refracción), como son el viscosímetro Ubbelohde Schott y el refractómetro Abbe de ATAGO.

4.2 Material

4.2.1 Partículas de látex

Es una de las sustancias que más se usan en la fabricación de inmuno-ensayos de soporte coloidal, lo que se debe principalmente a la relativa facilidad que existe a la hora de sintetizar partículas con una carga, tamaño o grupos superficiales determinados. En la elección de un látex hay que tener en cuenta lo siguiente:

- ▶ **Síntesis.** Existen distintos tipos, aunque una de las más utilizadas es la polimerización en emulsión (2) ya que es un método idóneo para obtener partículas con diámetros comprendidos entre 40 y 1000 nm. Existen cuatro ingredientes esenciales en toda polimerización: monómero de estireno, agua, emulsificador y radical libre iniciador. Primero se emulsifica el estireno en agua, formando unas "gotitas" de una micra aproximadamente. A continuación se calienta esta emulsión, lo que descompone el radical libre iniciador. Con los radicales libres formados tras el calentamiento se inicia la polimerización, que durará hasta el agotamiento del monómero o de los radicales.
- ▶ **Grupos superficiales.** La naturaleza de estos grupos dependen del monómero y del iniciador utilizados (3). Los grupos superficiales afectan no sólo a la adsorción de las proteínas sino también a la estabilidad temporal del reactivo.
- ▶ **Tamaño.** Es uno de los parámetros que más influye en el límite de detección y rango de trabajo del reactivo (ver capítulo 6). Con diámetros pequeños suele haber poca respuesta a diluciones bajas de aglutinante, mientras que el rango de trabajo puede llegar a concentraciones elevadas. Estas tendencias se invierten a medida que aumenta el tamaño.
- ▶ **Carga superficial.** La estabilidad coloidal depende, entre otros factores, de la densidad superficial de carga de las partículas. Una manera de medir la estabilidad coloidal de un sistema es la concentración crítica de coagulación (c.c.c), cuya definición se realizará más adelante. Ciertos autores opinan que partículas con una carga elevada desfavorecen la reacción antígeno-anticuerpo (4), por lo que recomiendan escoger soportes estables, pero no en exceso.
- ▶ **Limpieza.** Después de la síntesis, la disolución acuosa que contiene a las partículas está llena de restos tales como electrólitos, monómeros, emulsificador, etc. Hay que eliminar estos residuos para realizar la caracterización superficial de los monómeros, aunque en principio no tienen por que afectar a la reacción Ag-Ac. Por precaución siempre se utilizan partículas

lavadas.

En esta Tesis los látex se han elegido principalmente por su tamaño, sin olvidar la influencia que puede tener la densidad superficial de carga o la síntesis en la reacción. Las partículas utilizadas son tres, dos de la casa comercial Rhône-Poulenc, que desde ahora en adelante se denominarán como RP-130 y RP-214, y uno cedido por el Grupo de Física y Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada (5), que se designará como SN9.

4.2.1.1 Tamaño de partícula

Las medidas de tamaño de partícula se han realizado con dos métodos diferentes, Microscopía Electrónica de Transmisión (T.E.M) y Espectroscopía de Fotocorrelación (P.C.S). El microscopio pertenece a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, mientras que el P.C.S es del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada.

Microscopio Electrónico de Transmisión (T.E.M).

A partir de las fotografías realizadas con este microscopio, se lleva a cabo un análisis estadístico de las muestras. Los resultados obtenidos para los látex RP-130, RP-214 y SN9 son los de la tabla 4.1.

| Látex | N.Part. | d_n (nm) | d_w (nm) | d_v (nm) | i.p | S.D (nm) |
|--------|---------|------------|------------|------------|-------|----------|
| RP-130 | 430 | 135 | 142 | 137 | 1.058 | 19.5 |
| RP-214 | 514 | 210 | 212 | 210 | 1.012 | 13.6 |
| SN9 | 384 | 195 | 196 | 195 | 1.006 | 10.0 |

Tabla 4.1. Medidas de tamaño realizadas con el microscopio electrónico de transmisión (M. E.T). Partículas: RP-130, SN9 y RP-214.

En la tabla 4.1 (6):

- ▶ N. Part. es el número de partículas/datos procesados.
- ▶ d_n es el diámetro promedio en número (media aritmética) y se define como:

$$d_n = \frac{\sum n_j d_j}{\sum n_j} \quad [4.1]$$

donde n_j es el número de datos correspondientes a un determinado diámetro d_j . d_n es el valor que se toma como medida de la partícula.

► d_w es el diámetro promedio en peso:

$$d_w = \frac{\sum n_j d_j^4}{\sum n_j d_j^3} \quad [4.2]$$

► d_v es el diámetro promedio en volumen y viene dado por

$$d_v = \left(\frac{\sum n_j d_j^3}{\sum n_j} \right)^{1/3} \quad [4.3]$$

► i.p es el índice de polidispersidad. Se define como el cociente entre el diámetro medio en volumen y en número y suministra información sobre la polidispersidad de un látex. Se considera monodisperso si no supera el valor de 1.05.

► S.D la desviación estándar de la distribución de tamaños. Como se trata de una medida de la dispersión de los datos alrededor de un diámetro medio, la desviación estándar puede expresar también la polidispersidad de una muestra.

En las figuras 4.1-6 se presentan las fotografías del TEM así como distribuciones de tamaño correspondientes a cada una de las tres partículas.

A partir de la tabla 4.1 se deduce que la partícula RP-130 es la más polidispersa (ver figuras 4.1 y 4.2), lo que a posteriori se refleja en el diámetro final de los complejos Ix-Ag P-B y en su distribución de tamaños. El RP-214 y el SN9 se asemejan bastante entre si, aunque como se verá en el capítulo 6, parece que la carga superficial es la que explica las diferencias a nivel de Ag P-B adsorbido y respuesta inmunológica.

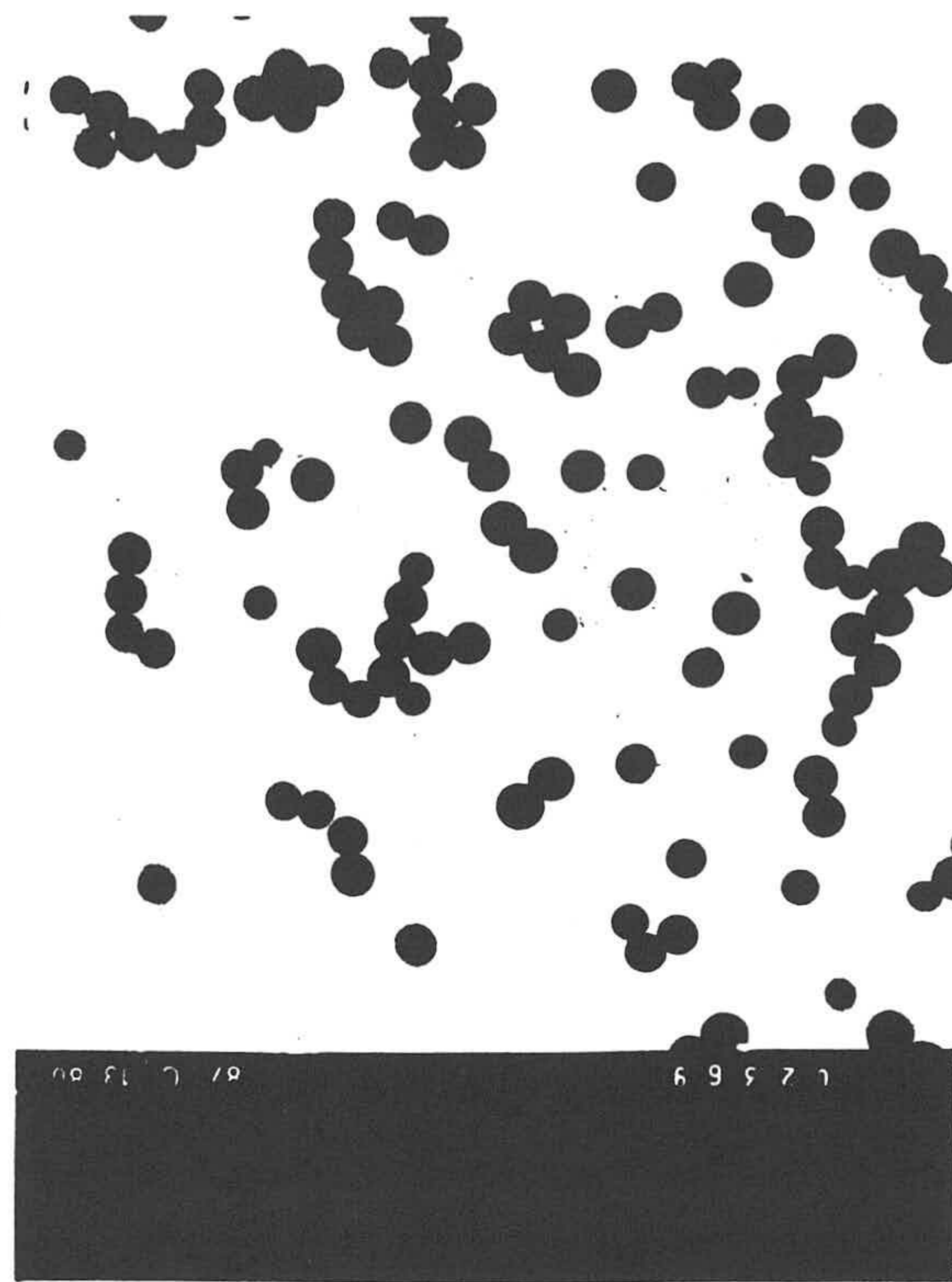


Figura 4.1. Fotografía (T.E.M) de la partícula RP-130.

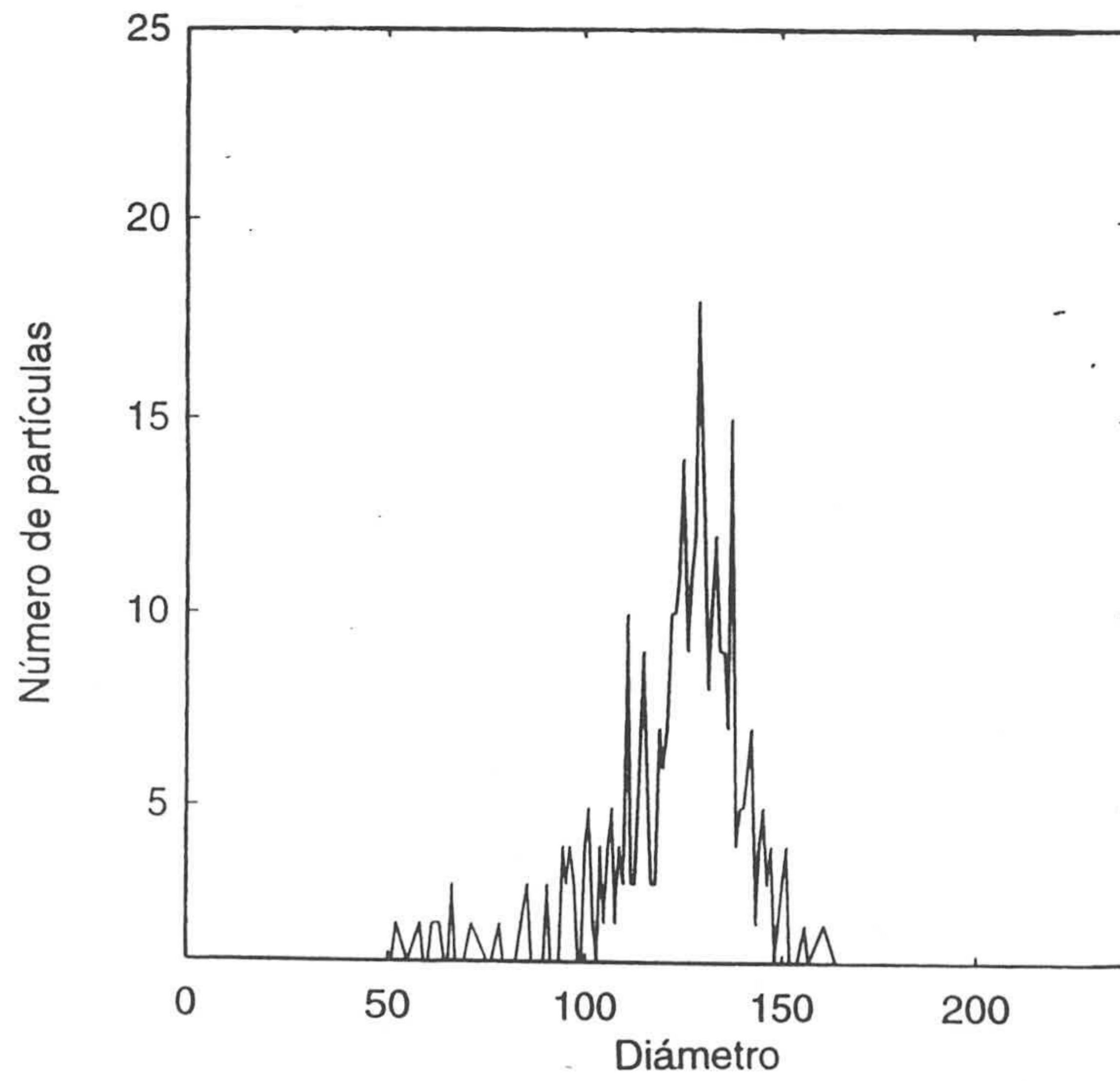


Figura 4.2. Distribución de tamaños de la partícula RP-130.

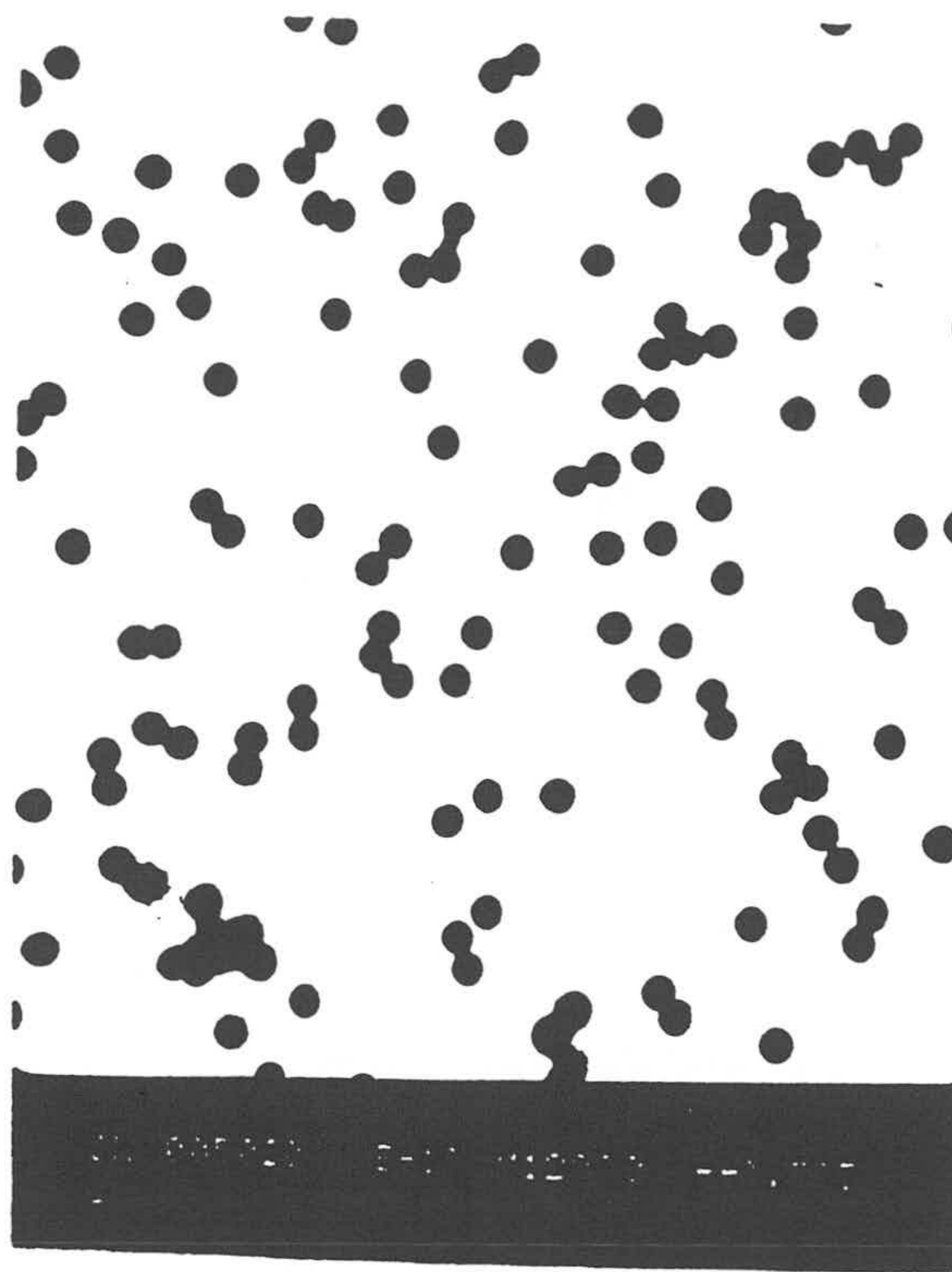


Figura 4.3. Fotografía (T.E.M) de la partícula SN9.

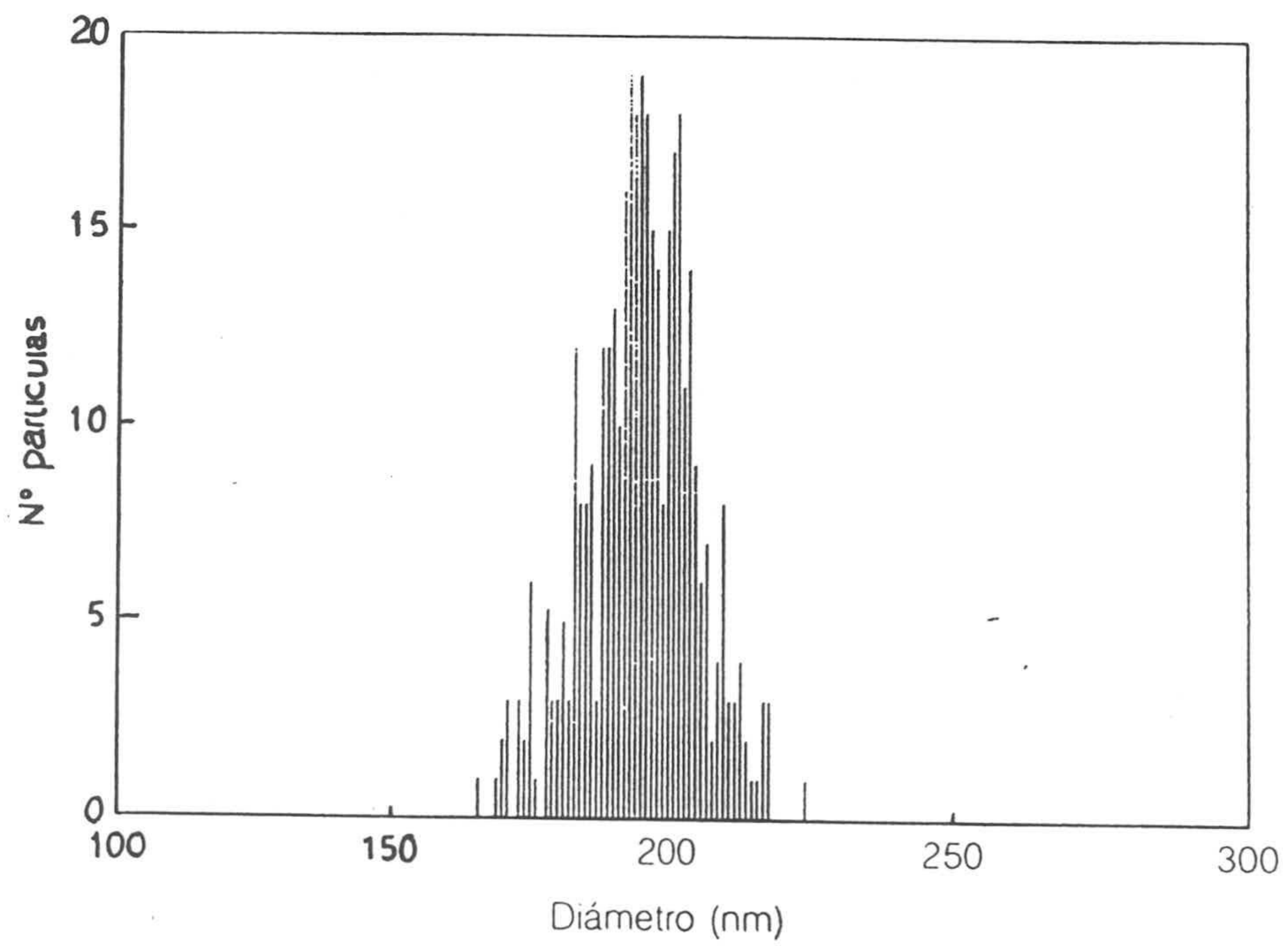


Figura 4.4. Distribución de tamaños de la partícula SN9.

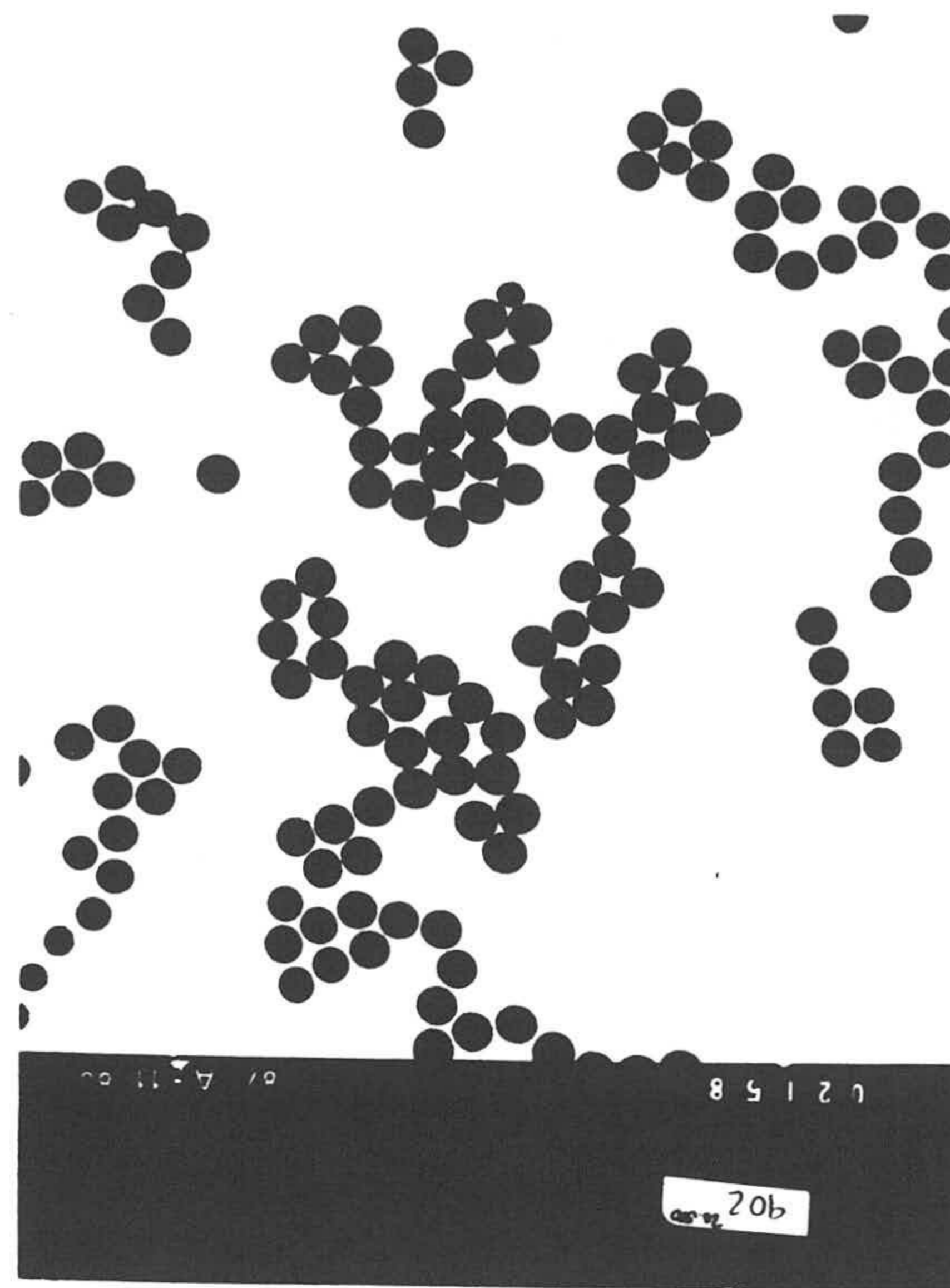


Figura 4.5. Fotografía (T.E.M) de la partícula RP-214.

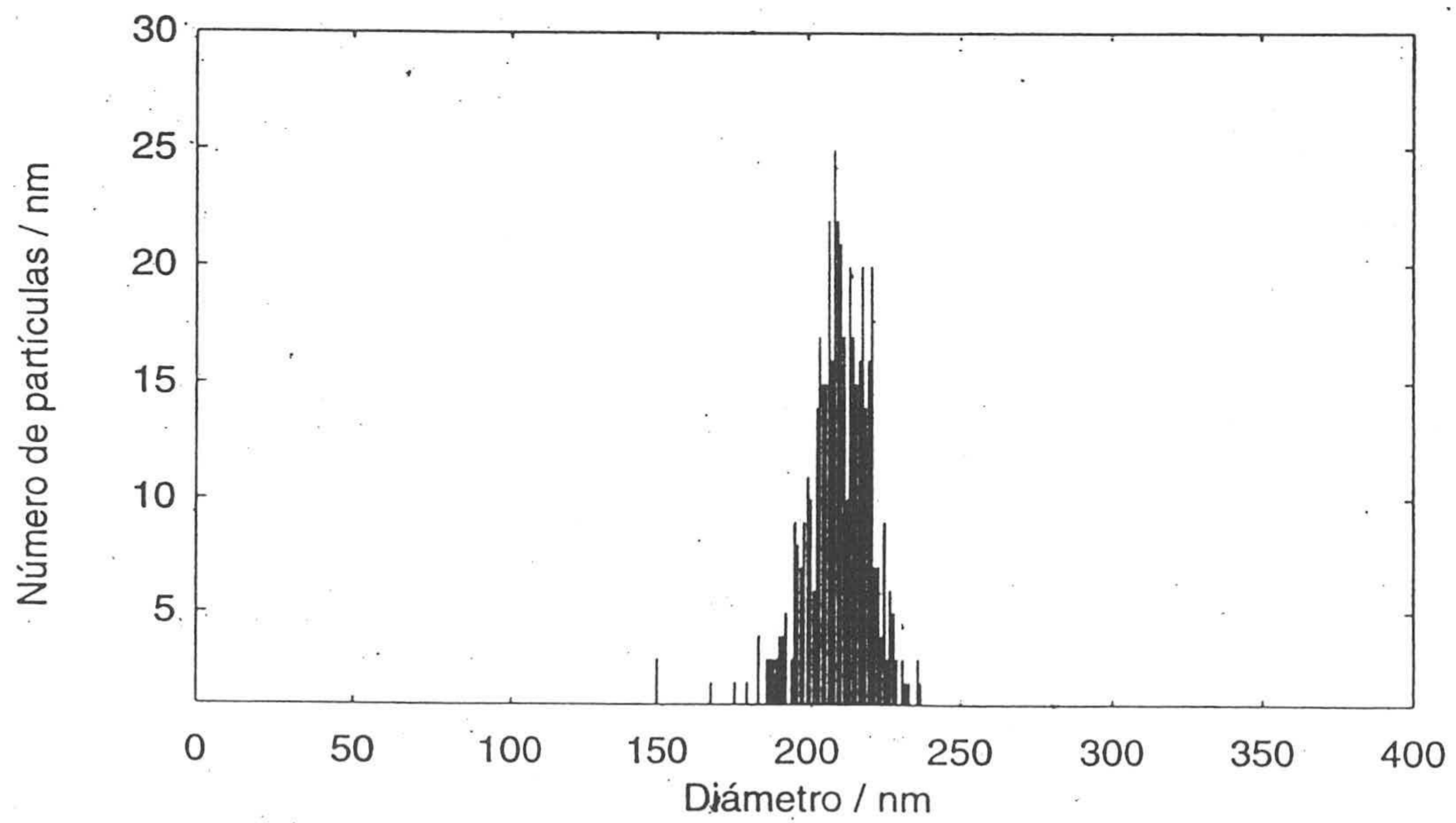


Figura 4.6. Distribución de tamaños de la partícula RP-214.

Espectroscopía de Fotocorrelación (P.C.S)

En la introducción de esta Memoria se comentó en líneas generales cuál es la base de esta técnica. Más adelante (apartado 4.3.4) se describirá el instrumento (Malvern 4700 PCS) así como el fundamento teórico de la Espectroscopía de Fotocorrelación (7). Por esta técnica un látex es monodisperso cuando el índice de polidispersidad no supera el valor de 0.2. La manera de calcular el i.p es diferente a la del T.E.M, ya que se obtiene a partir del ajuste de cumulantes de la función de autocorrelación (apéndice 2). Los resultados de la tabla 4.2 confirman la mayor polidispersidad del RP-130 y el parecido entre el RP-214 y el SN9.

| Látex | Diámetro (nm) | i.p |
|--------|---------------|------|
| RP-130 | 129 ± 4 | 0.17 |
| RP-214 | 212 ± 5 | 0.09 |
| SN9 | 194 ± 2 | 0.04 |

Tabla 4.2. Medidas realizadas mediante P.C.S. Partículas RP-130, SN9 y RP-214.

4.2.1.2 Grupos superficiales

Dependiendo del monómero de la síntesis o del iniciador, se pueden obtener partículas con distintos grupos superficiales, tales como sulfato ($-\text{SO}_4^-$), sulfonato ($-\text{SO}_3^{2-}$), acetal, etc. El grupo, así como la carga superficial, determinan cual es el método de limpieza más adecuado.

Las partículas RP-130 y RP-214 sólo tienen grupos sulfato, mientras que en el SN9 los grupos que le confieren la carga son sulfato y sulfonato (5).

4.2.1.3 Carga superficial

Este parámetro es muy importante a la hora de evaluar la estabilidad coloidal del sistema, las propiedades electrocinéticas, los fenómenos de adsorción, etc. La densidad superficial de carga de un látex se determina mediante una valoración conductimétrica

(conductividad eléctrica) o potenciométrica (pH) (8,9), para lo cual se siguen las variaciones de la conductividad eléctrica o del pH al añadir un ácido o una base a una muestra de látex.

En la tabla 4.3 se presentan los valores de carga superficial (σ_0) correspondientes a las tres partículas. Todas estas valoraciones han sido realizadas por el Grupo de Física y Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada. El SN9 es el más cargado seguido del RP-130, lo que parece reflejarse en su capacidad de adsorción de Ag P-B, como se verá en el capítulo 6.

| Látex | σ_0 ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$) |
|--------|------------------------------------------|
| RP-130 | 8.7 ± 1.4 |
| RP-214 | 3.0 ± 0.2 |
| SN9 | 14.2 ± 1.2 |

Tabla 4.3. Densidad de carga superficial de las partículas RP-130, SN9 y RP-214.

Un sistema es coloidalmente estable cuando las fuerzas atractivas (London van der Waals) están contrarrestadas por otras de carácter repulsivo, que en la mayor parte de los casos son de origen electrostático. Esta repulsión está originada por la carga eléctrica de las partículas y más concretamente por la extensión de la doble capa eléctrica (d.c.e). Las fuerzas repulsivas son muy sensibles a la concentración iónica del medio, por lo que un incremento de la cantidad de electrolito provoca la reducción progresiva de la d.c.e, lo que puede dar lugar a la desestabilización coloidal.

El parámetro que define la estabilidad coloidal de un sistema es la concentración crítica de coagulación (c.c.c). Existen dos formas de expresar la c.c.c, una denominada "rápida", que es la que se obtiene a partir de las teorías clásicas de estabilidad (D.L.V.O) (10,11), y otra "lenta", cuya aplicación está dirigida a sistemas coloidales que deban mantenerse estables durante largos periodos de tiempo (pinturas, detergentes, colas, reactivos de inmuno-diagnóstico, etc). En el apartado 5.2.5 se explicarán las diferencias entre ambas c.c.c y su método de obtención.

En la tabla 4.4 están recogidos los valores de la c.c.c rápida y lenta correspondientes a los tres látex lavados. Cabe destacar la gran diferencia entre las tres partículas, lo que se corresponde con los valores de densidad superficial de carga (tabla 4.3).

| Látex | c.c.c rápida (mM) | c.c.c lenta (mM) |
|--------|-------------------|------------------|
| RP-130 | 600 ± 30 | ≈ 300 |
| SN9 | 900 ± 40 | ≈ 450 |
| RP-214 | 230 ± 30 | ≈ 80 |

Tabla 4.4. Concentración crítica de coagulación rápida y lenta. RP-130, SN9 y RP-214.

4.2.1.4 Limpieza

Resinas cambiadoras de iones

La resina o Amberlita es una sustancia sintética capaz de sustituir los iones de la disolución por otros del mismo signo (2, 12). Por ejemplo, si hay Na^+ originarios del iniciador de la síntesis, estos se cambiarán por iones H^+ , mientras que los aniones lo harán por OH^- .

Este método se ha utilizado para limpiar el RP-130 y RP-214. En los látex de alta densidad superficial de carga hay que tener precaución con esta técnica, ya que pueden funcionar como intercambiadores y el proceso sería a la inversa, o sea, el látex retendría los iones del medio.

Ciclos de centrifugación y resuspensión

Las muestras se centrifugan a una velocidad (depende del tamaño de partícula), hasta que sedimentan completamente. A continuación se elimina el sobrenadante y se redispersa las partículas con agua desionizada. El proceso se repite tantas veces como sea necesario y finaliza cuando el sobrenadante y por tanto el látex tiene una conductividad similar a la del agua. Este método se aplica a partículas de carga elevada por ser más fáciles de redispersar.

Desplazamiento de suero

Consiste en la sustitución paulatina por diafiltración de la disolución acuosa en la que están suspendidas las partículas (13). El agua eliminada se repone con H_2O desionizada, de manera que el proceso finaliza cuando el diluyente del látex tiene la misma conductividad que la del agua ($\sim 1 \mu\text{S}/\text{cm}$)

Como el SN9 tiene una alta carga superficial, el proceso de limpieza ha consistido en tres ciclos de centrifugación-resuspensión y un desplazamiento de suero (5).

4.2.2 Antígeno-Anticuerpo Paul-Bunnell

4.2.2.1 Antígeno de Paul-Bunnell

El antígeno de Paul-Bunnell es una glicoproteína que en disolución forma agregados uniformes de subunidades de peso molecular entre 25000 y 34000 kD. Cuando está agregada puede llegar hasta 300000 kD (14,15). Este antígeno se obtiene a partir de la membrana de los eritrocitos de ciertos animales tales como cordero, cabra, buey, etc. Para nuestro reactivo se han elegido los hematíes de buey (16), ya que en sus membranas el Ag Paul-Bunnell se encuentra en gran proporción, en la mayor actividad antigénica y por no contener antígeno heterófilo de tipo Forssman.

El Ag Paul-Bunnell ha sido suministrado por Biokit S.A y su proceso de obtención se puede resumir en los pasos siguientes:

- ▶ Eliminación del plasma sanguíneo y de los glóbulos blancos de la sangre. De esta forma quedan sólo los hematíes.
- ▶ Hemólisis. Consiste en la liberación de la hemoglobina y de todos los componentes citoplasmáticos de los hematíes (17,18).
- ▶ Solubilización y purificación del antígeno a partir de las membranas de los eritrocitos (19). Para esto se emplean disolventes orgánicos tales como etanol y acetona o también diferentes mezclas de cloroformo-metanol-agua.

Los distintos tipos de proteínas que contiene una muestra, así como la concentración de las mismas, se puede determinar por varias técnicas, tales como la ultracentrifugación, isoelectroenfoque, electroforesis, cromatografía de filtración en gel, etc, siendo esta última una de las más utilizadas en la actualidad. En este método las proteínas se separan en función de su peso molecular (20, 21), mediante un gel de partículas porosas contenido dentro de una columna en un eluente determinado (figura 4.7) . Al aplicar la muestra, las proteínas más pequeñas podrán atravesar los poros, mientras que las grandes se moverán en el eluente alrededor de las partículas. Las de mayor peso molecular eluirán primero (el camino que recorren es más fácil) y las menores lo harán después.

La cromatografía de filtración en gel (Superdex 200) del Ag P-B es la de la figura 4.8, en la que se pueden distinguir cuatro picos. El eje de ordenadas representa la absorbancia óptica a 280 nm de las fracciones eluidas y el de abscisas el volumen de elución de las mismas. El primer pico (8.75 ml) corresponde al volumen de exclusión de la columna y en el están recogidas todas las moléculas con un peso superior a 100000 kD. Este pico es el 40.2 % de la muestra, lo que indica que la mayor parte de la proteína está agregada. Los demás son de 43000 kD (10.81ml), 25000 kD (13.18 ml) y 18000 kD (14.36 ml) respectivamente. El eluyente de la columna es un tampón fosfatos pH 7.2 y 0.181 de fuerza iónica.

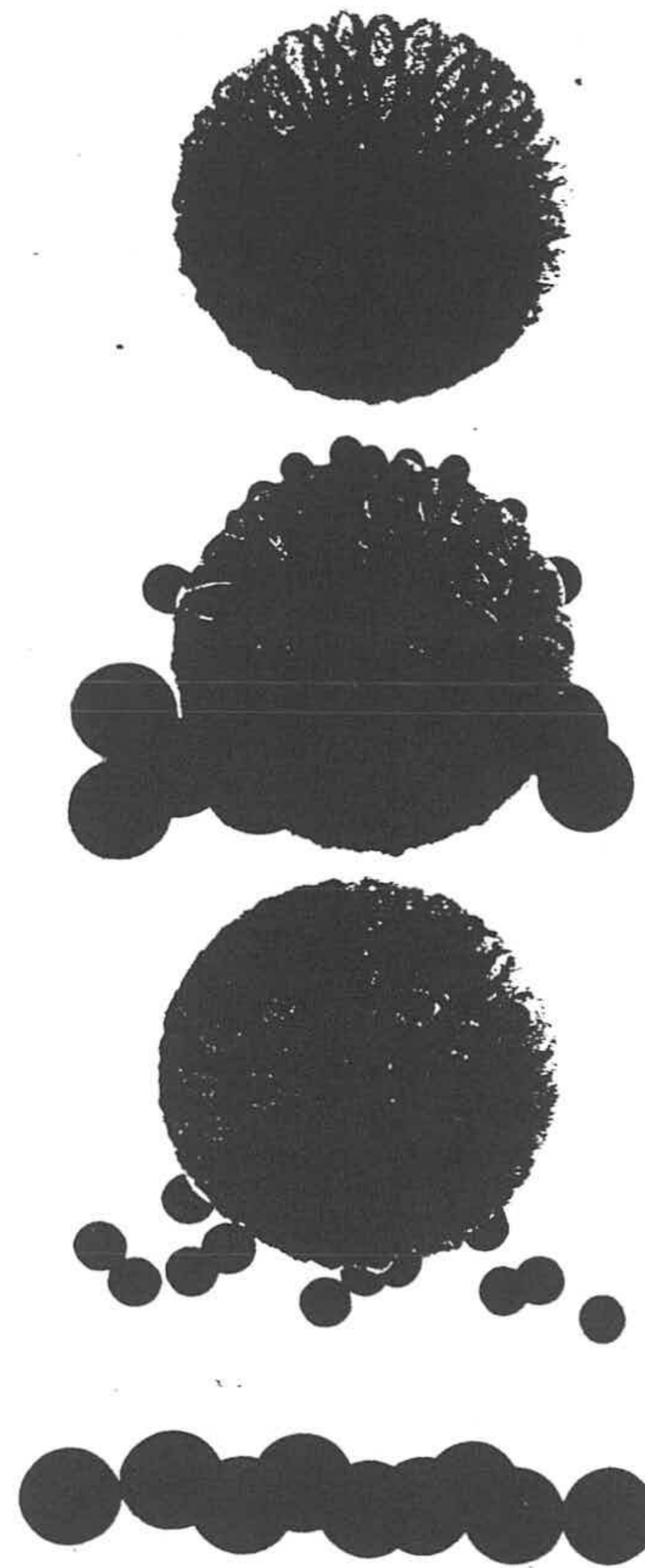


Figura 4.7. Cromatografía de filtración en gel. Esquema de las partículas de gel.

La concentración inicial del antígeno se ha determinado utilizando el método B.C.A (bicinchoninic acid) de la casa Pierce (ver capítulo de métodos). La concentración de antígeno Paul-Bunnell es de 300 $\mu\text{g/ml}$.

A la hora de estudiar una proteína, otro factor de gran importancia es el punto isoeléctrico (p.i.e) en disolución, que se define como el pH donde la suma de las cargas positivas y negativas de la molécula es cero. En el caso del Ag Paul-Bunnell el punto isoeléctrico es bastante ácido, situándose entre 4.5 y 5. El p.i.e se ha determinado mediante enfoque isoeléctrico (IEF) con el equipo Phast System de la empresa Pharmacia.

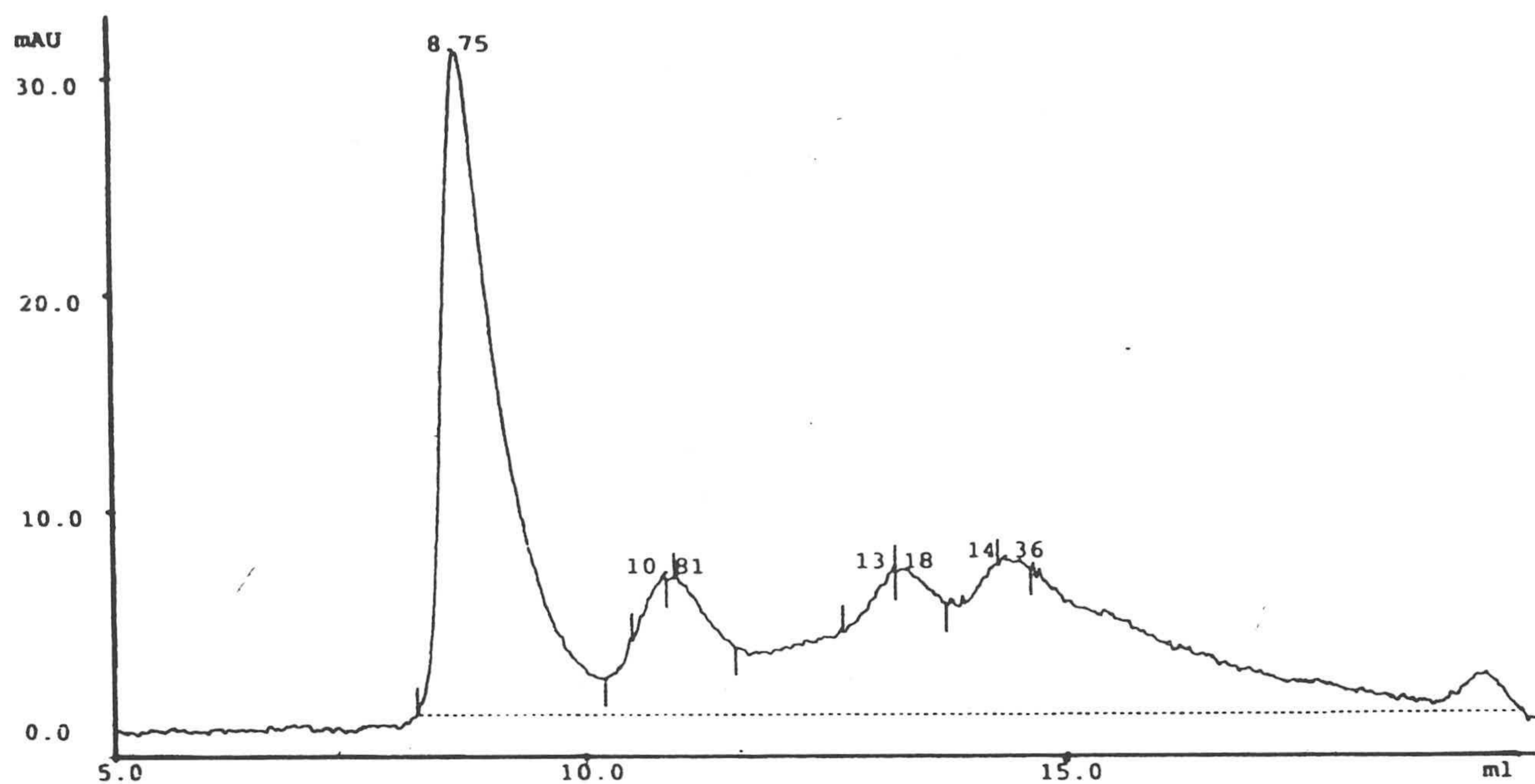


Figura 4.8. Cromatografía de filtración en gel del Ag P-B.

4.2.2.2 Anticuerpo heterófilo de Paul-Bunnell

Antes de pasar a describir cuales son las principales características de este Ac, es necesario explicar una serie de conceptos relacionados con la respuesta de un inmunoensayo, tales como:

- ▶ **Título.** Es una medida de la concentración de anticuerpo y normalmente se expresa como la inversa de la dilución. Por ejemplo, cuando una muestra puede diluirse 256 veces (1/256) y sigue siendo reactiva (positivo), pero diluciones mayores dan un resultado no reactivo (negativo), el título es 256. El título puede variar en función de la técnica utilizada.
- ▶ **Suero positivo/negativo.** Al igual que ocurre con la titulación, un suero puede ser positivo o negativo de un antígeno o un anticuerpo dependiendo del método. Los problemas aparecen cuando se trabaja con muestras cuyo contenido de Ac o Ag es muy bajo.

► Curva de la precipitina. La respuesta de un inmuno-ensayo se rige por la denominada curva de la precipitina o de Heidelberger-Kendall (22, 23). Debido a la naturaleza multivalente tanto del antígeno como del anticuerpo (1), la respuesta de un sistema inmunológico tiene una cinética de reacción bastante compleja, como se presenta en el figura 4.9. Esta gráfica corresponde a la curva de Heidelberger-Kendall para la formación de inmuno-complejos, donde el Ag es el aglutinante. Todas las conclusiones que se deducen de esta figura se pueden aplicar a cualquier inmuno-ensayo, sea cual sea el aglutinante (eje de abscisas). Dentro de esta curva se pueden distinguir las siguientes zonas:

- Zona de exceso de anticuerpo. La formación de inmunocomplejos crece a medida que lo hace la de antígeno. La cantidad o valencia del Ac es lo suficientemente elevada como para unirse a todos los Ag presentes.
- Zona de equivalencia. Se alcanza cuando las cantidades de Ac y Ag son las óptimas, lo que da lugar a la máxima formación de complejos.
- Zona de exceso de antígeno. Todos los lugares de unión del anticuerpo comienzan a estar ocupados por antígenos. Un aumento de la concentración de Ag supone un descenso en la respuesta del sistema. No crece sino todo lo contrario (24, 25).

En un inmuno-diagnóstico interesa que primera zona sea lo más larga posible y que la última sea muy corta, ya que así el número de muestras con dos posibles respuestas es menor.

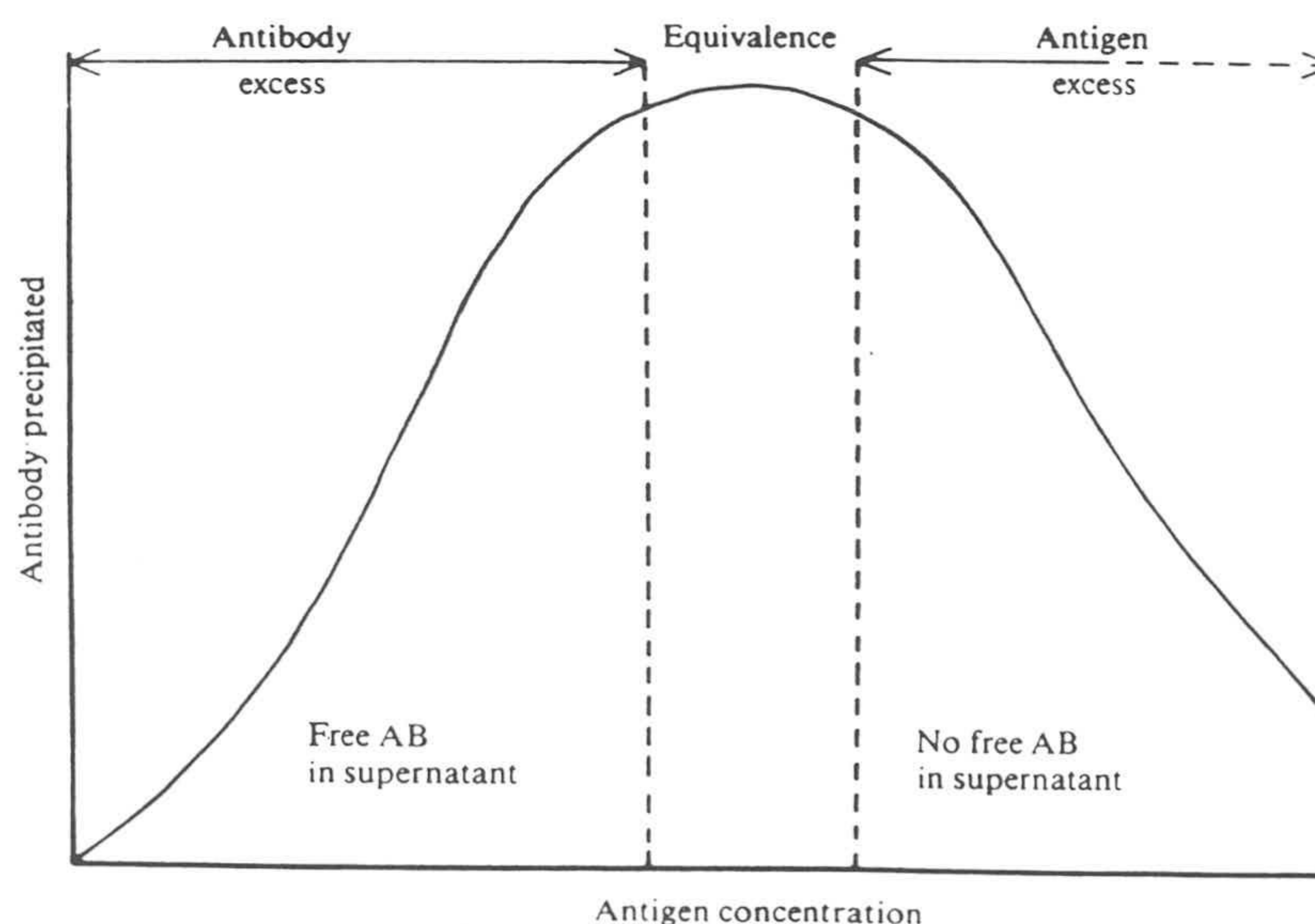


Figura 4.9. Respuesta de un reactivo inmunológico. Curva de Heidelberger-Kendall (1).

► Unidad Paul-Bunnell por ml (U.P-B/ml). Esta unidad se ha creado para uso interno de Biokit S.A y es otra forma de expresar el título de un suero positivo de mononucleosis infecciosa. Como en esta enfermedad no existe un estándar internacional, los títulos se determinan en función de las técnicas disponibles. Biokit S.A tiene en el mercado un reactivo de látex en portaobjetos para la mononucleosis infecciosa (26) aprobado por la F.D.A (Food and Drugs Administration). Este inmunoensayo utiliza un portaobjetos de PVC con 6 pocillos, en donde se mezclan 25 μ l de Ix y 50 μ l de la muestra o diluciones de la misma. Para acelerar la reacción se emplea un agitador orbital durante 3 minutos a una velocidad angular de 80 r.p.m. El título es la inversa de la última dilución que tiene una agregación significativa a simple vista. Se define 1 U.P-B/ml como la concentración correspondiente a la inversa del título. Por ejemplo, si el suero tiene una titulación de 128 por látex portaobjetos (aglutina visiblemente hasta 1/128), la dilución 1/128 corresponderá a 1 U.P-B/ml. Estas unidades, a diferencia de las diluciones, facilitan la visualización de gráficas, tablas, etc.

Los anticuerpos heterófilos de Paul-Bunnell forman parte del suero sanguíneo de los afectados por la mononucleosis infecciosa. Esta es una de las particularidades de esta enfermedad, ya que el antígeno responsable de estos Ac no parece tener relación directa con el virus de Epstein-Barr. Además estos anticuerpos son capaces de reaccionar con antígenos no relacionados de especies animales diferentes.

Una manera de estudiar la evolución de la mononucleosis infecciosa, como el de otra enfermedad cualquiera, es controlar la respuesta inmune (27). El mayor problema que tiene el seguimiento de la M.N.I es que durante las fases de incubación, aguda y convalecencia, se producen anticuerpos de tipo IgG e IgM contra distintas partes del virus, además de los heterófilos (28). Si los inmunoensayos están hechos con antígenos específicos víricos de la mononucleosis, es difícil saber en que fase de la enfermedad está el individuo, ya que el Ag reacciona tanto con las IgM como con las IgG. En cambio si se emplea el Ag de Paul-Bunnell, este reconocerá solamente a su anticuerpo correspondiente, que además es de tipo IgM (figura 4.10). El Ag P-B se produce principalmente (\approx 90%) durante la fase aguda. Tras pasar la enfermedad, en el suero sanguíneo los anticuerpos presentes son de tipo IgG.

En esta Tesis Doctoral se han empleado dos sueros positivos de mononucleosis infecciosa de origen humano, uno de 64 U.P-B/ml y otro de 256 U.P-B/ml, suministrados por la empresa Biomedical Resources. En la figura 4.10 se presenta el cromatograma de filtración en gel (Superdex 200) del suero positivo humano de mononucleosis de 256 U.P-B/ml. El primer pico corresponde a la IgM, mientras que el 2º y el 3º son de la IgG y albúmina respectivamente (tabla 4.5).

| S. Humano | IgM | IgG | Albúmina |
|--------------|------|------|----------|
| 256 U.P-B/ml | 12 % | 38 % | 50 % |

Tabla 4.5. Cromatografía de filtración en gel correspondiente al suero humano de 256 U.P-B/ml. Contenido en % de cada uno de los picos del diagrama (figura 4.10)

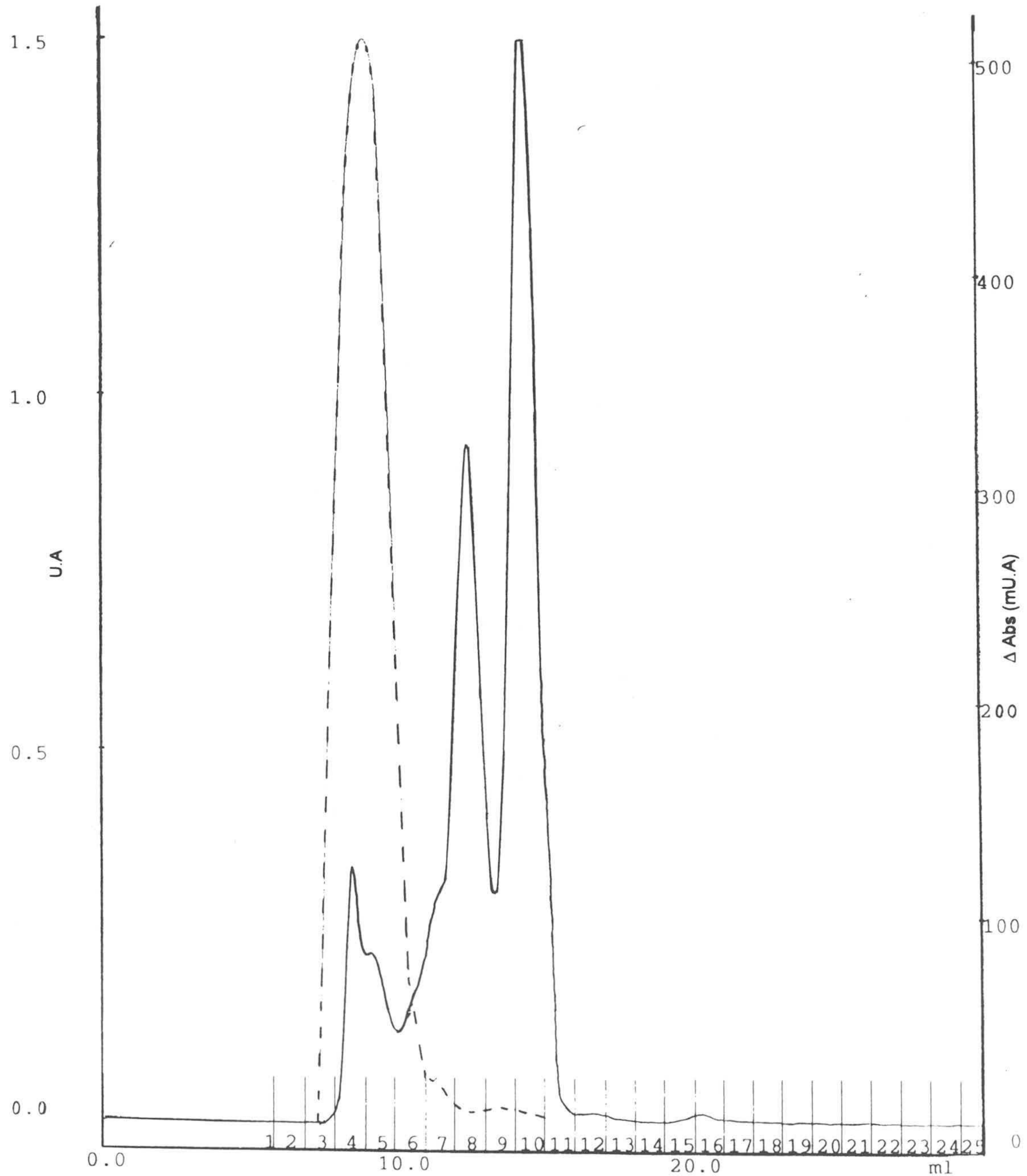


Figura 4.10. Cromatograma de filtración en gel y actividad del suero de 256 U.P-B/ml de origen humano. La actividad corresponde a la línea discontinúa.

El suero humano se ha dializado frente a una dilución 1/20 de una solución salina de NaCl 154 mM y 1 g/l de NaN_3 . Se ha comprobado que la cantidad de calcio presente en esta muestra es suficiente, como para que el fosfato cálcico precipite, lo que supone una disminución de la absorbancia óptica y por tanto del título de la muestra. El fosfato cálcico se forma entre el calcio del suero y la sal fosfatos del tampón de reacción. La diálisis parece haber eliminado el calcio en su totalidad, ya que tras la misma no se han vuelto a encontrar problemas de precipitación.

Para determinar cuál de las proteínas aglutina a los complejos Ix-Ag P-B, se ha medido la reactividad (eje de las ordenadas de la derecha) correspondiente a las distintas muestras (líneas verticales y numeradas del eje de abscisas de la figura 4.10). Las medidas se han realizado en el Monarch 2000 I.L (apartado 4.3.2) con un reactivo látex elaborado a partir del RP-214, con un recubrimiento de $50 \mu\text{g Ag P-B/m}^2\text{lx}$ y un número de partículas de $7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. El tampón de reacción es un fosfatos de fuerza iónica 0.155 y pH 7.

En algunos experimentos del capítulo 6 (apartado 6.9) se utiliza otro agregante de 256 U.P-B/ml, de origen animal y que además no es suero, sino un semipurificado. Este aglutinante se obtiene inoculando Ag P-B a un huésped, en este caso un conejo, para que su sistema inmunológico produzca anticuerpos, que en esta ocasión son de tipo IgG, como se verá en el cromatograma de filtración y en el diagrama de actividad (figura 4.11). A continuación, tras extraer la sangre y obtener el suero, se realiza una precipitación de la IgG mediante la adición de sulfato amónico. Este método (29) se basa en el cambio de solubilidad de las proteínas al variar la concentración de electrolito. Cuando la cantidad de sulfato amónico supera un determinado valor, se produce una separación de las proteínas del suero, una parte en el "pellet" (la IgG) y otra en el sobrenadante. La precipitación se debe a la desestabilización coloidal de las moléculas (apantallamiento de las cargas). A continuación se dializa el "precipitado", primero dos veces frente a H_2O desionizada y después con un tampón fosfato potásico (pH 7, ~ 0.09 de fuerza iónica), medio en el que finalmente quedan resuspendidas las proteínas de la muestra.

En la figura 4.11 se presenta el cromatograma de filtración en gel del semipurificado de 256 U.P-B/ml junto con su diagrama de actividad. Las condiciones de trabajo son las mismas que en el suero humano, aunque en este caso la actividad corresponde a la IgG. El contenido proteico del semipurificado está recogido en la tabla 4.6.

| Semipurificado | IgM | IgG | Albúmina |
|----------------|------|------|----------|
| 256 U.P-B/ml | 18 % | 77 % | ≈0 % |

Tabla 4.6. Cromatografía de filtración en gel correspondiente al semipurificado de origen animal de 256 U.P-B/ml. Contenido en % de cada uno de los picos del diagrama (figura 4.11).

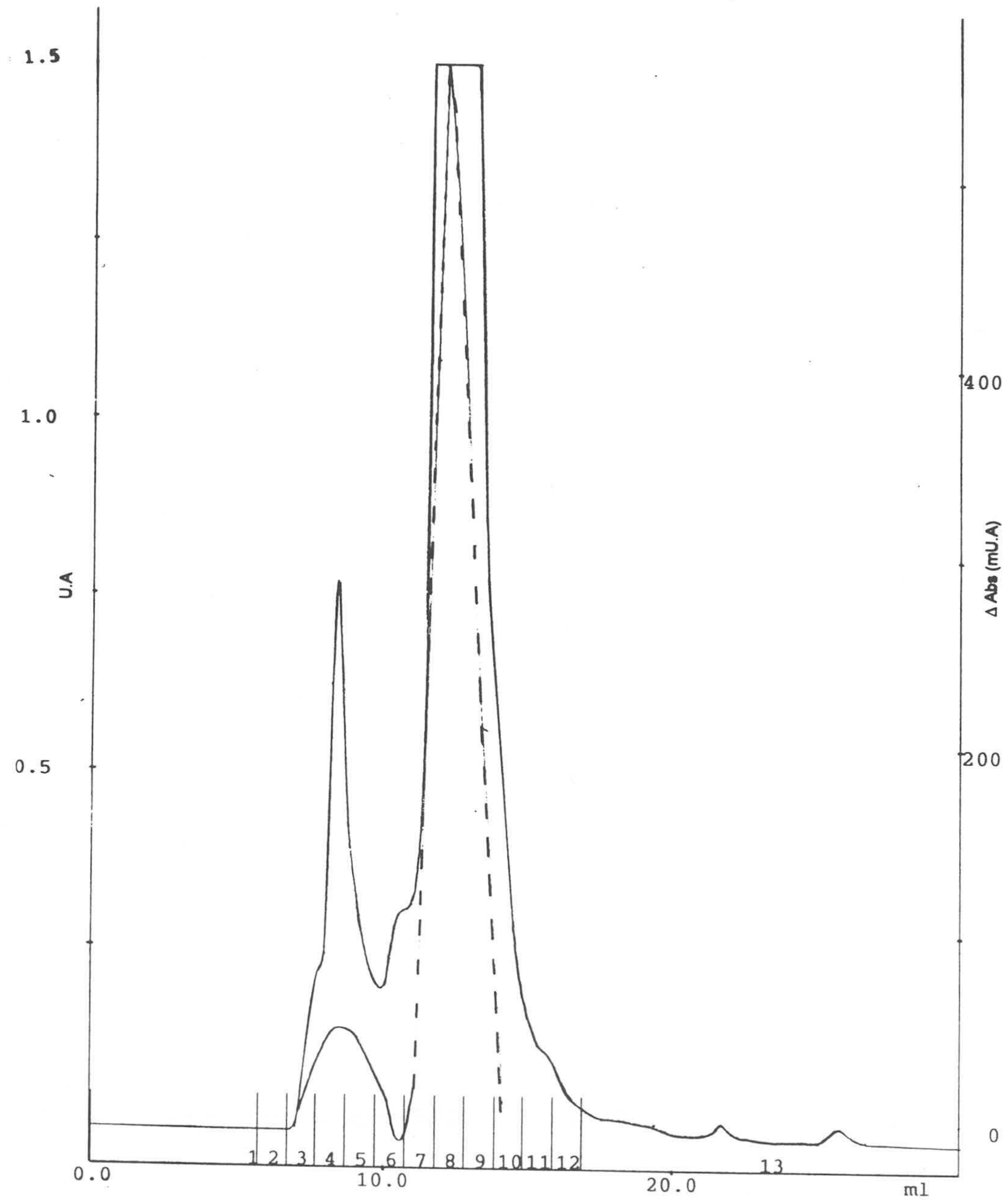


Figura 4.11. Cromatograma de filtración en gel y actividad del semipurificado de origen animal de 256 U.P-B/ml. La actividad corresponde a la línea discontinúa.

Comparando los diagramas de actividad de las figuras 4.10 y 4.11 se comprueba el carácter pentamérico de la IgM, ya que un bajo porcentaje de esta proteína da lugar a una respuesta similar a la que tiene la IgG. En la figura 4.12 se presentan los esquemas correspondientes a una IgG y una IgM donde se pueden ver las diferencias existentes entre ambas moléculas, tanto a nivel de peso molecular (146000 kD y 970000 kD para la IgG y la IgM respectivamente) como de valencia.

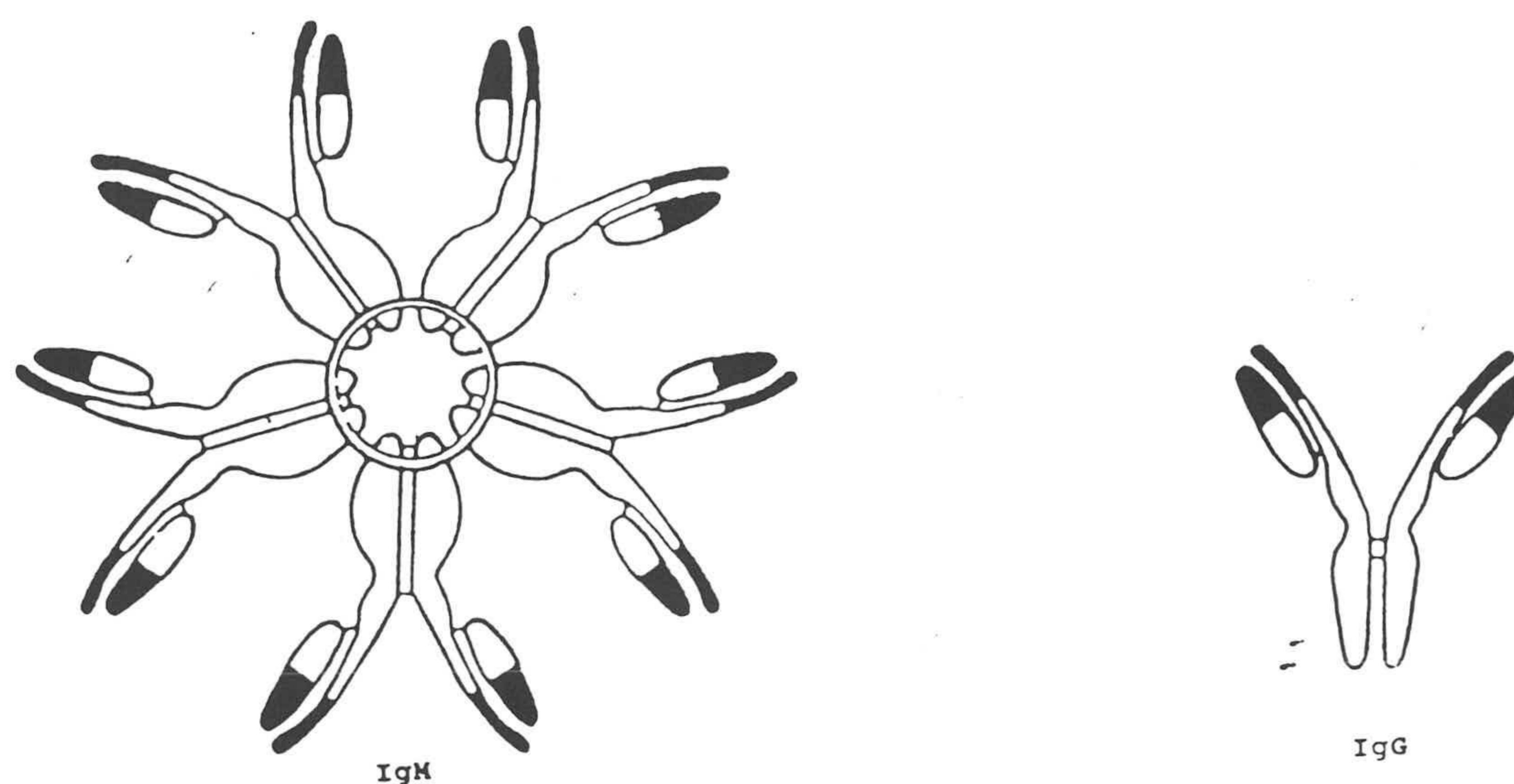


Figura 4.12. Esquema de la IgM y de la IgG.

4.2.3 Albúmina bovina (BSA)

Esta proteína sirve para bloquear los lugares libres de la partícula de látex, como se explicará en siguientes apartados. La albúmina ha sido suministrada por la casa Miles. La cromatografía en gel (Superdex 200) de la BSA utilizada es la de la figura 4.13. El 80% de la albúmina está en forma monomérica, es decir, con un peso molecular alrededor de los 65000 kD (14.15 ml), mientras un 17% tiene unos 200000 kD (12.27 ml) y un 2% entre 450000 y 600000 kD (11.16 ml). Se trata por tanto de una muestra muy monodispersa, donde sólo hay un pequeño porcentaje de trímeros y especies superiores a los heptámeros. El eluente de la columna es un tampón fosfato con 0.181 de fuerza iónica y pH 7.2.

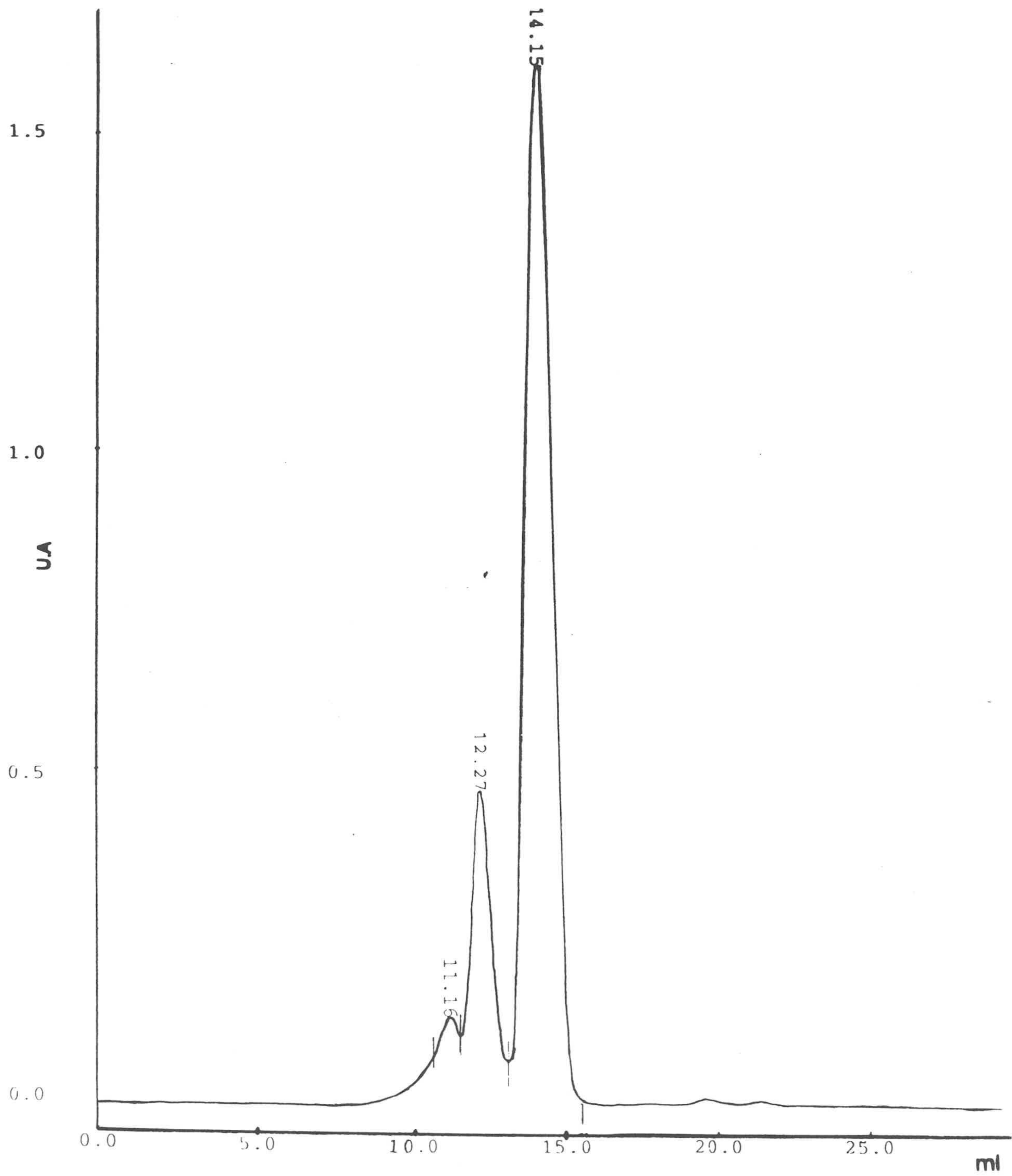


Figura 4.13. Cromatografía de filtración en gel de la albúmina bovina de bloqueo.

4.3 Instrumentación

4.3.1. Introducción

Mediante los instrumentos ópticos es posible determinar un gran número de propiedades de los sistemas coloidales, como la distribución de tamaños, constantes de equilibrio, velocidades de agregación, dimensión fractal, etc. El análisis del sistema es más o menos completo dependiendo del tipo de instrumento, que en el campo de los inmunoensayos son en líneas generales los siguientes:

Turbidímetros

Este instrumento es uno de los más extendidos y usados en el estudio de las reacciones inmunológicas. Esto se debe principalmente a la sencillez de manejo y a la facilidad a la hora de interpretar los resultados. La turbidez es una forma de medir la razón entre la intensidad de la luz incidente y la transmitida por unidad de longitud (paso óptico de la cubeta de medida), cuando la radiación luminosa atraviesa una determinada muestra. La turbidez se puede expresar también en forma de absorbancia óptica, que es la que normalmente se utiliza. Ambas son formalmente idénticas pero la absorbancia es adimensional, ya que no tiene en cuenta la longitud de la cubeta de medida. Todo esto se puede ver con mayor claridad en el capítulo 2.

Nefelómetros

En este caso se realiza una medida directa de la intensidad de la luz dispersada. La principal diferencia con la turbidimetría radica en que el ángulo de medida es normalmente distinto de cero.

Contaje de partículas

Con este dispositivo es posible medir el tamaño de las partículas o agregados cuando pasan por delante de un haz de luz. La intensidad de la luz dispersada a ángulos muy pequeños está directamente relacionada con el cuadrado del volumen del dispersor o con el número de monómeros que contiene el agregado.

Espectroscopía de fotocorrelación

Este sistema detecta las fluctuaciones de la luz dispersada provocadas por el movimiento Browniano de las partículas (30). A partir de estas medidas se determina el coeficiente de difusión de los dispersores y gracias a las ecuaciones de Einstein-Stokes se puede obtener el tamaño de partícula.

R.P.S (Resonancia plasmática de superficie)

El R.P.S (31) mide la variación del índice de refracción cuando un ligando (antígeno o anticuerpo) en disolución, se une a un ligando aceptador inmovilizado sobre una lámina metálica (por ejemplo plata). Esta lámina está depositada sobre una superficie de un prisma u otro dispositivo capaz de tener una reflexión interna total.

En la mayor parte de los inmuno-ensayos ópticos de soporte coloidal, lo que interesa es determinar la variación del estado de agregación provocada por la reacción antígeno-anticuerpo. Esta aglutinación se traduce en cambios de la luz dispersada, que pueden ser detectados por un simple espectrofotómetro. Esta es la principal razón por la que estos instrumentos se encuentran tan extendidos en el campo del diagnóstico clínico.

El trabajo experimental de esta Memoria se ha realizado en su mayor parte con dos espectrofotómetros (turbidímetros), el Monarch 2000 I.L de la casa Instrumentation Laboratory y el UV-2101 PC de Shimadzu. Con el Monarch se obtuvieron todas las medidas de reactividad (variación del grado de recubrimiento, número de partículas, pH, f.i, condiciones de sensibilización) y de la constante de velocidad de formación de dímeros, mientras que el Shimadzu se ha utilizado para controlar el estado de agregación de las complejos Ix-Ag-P.B, la c.c.c de las partículas y la obtención de la dimensión fractal.

El diámetro medio de agregado a distintas concentraciones de aglutinante, es un dato que puede explicar algunos comportamientos relacionados con la formación de los inmuno-complejos (curva de la precipitina). Las medidas de tamaño fueron realizadas con el 4700 P.C.S (Photocorrelation Spectroscopy) de la casa Malvern, perteneciente al Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada.

Otros factores que hay que tener en cuenta a la hora de analizar los resultados, son la viscosidad η e índice de refracción n_m del medio de reacción. Para medir η se ha utilizado un viscosímetro Ubbelohde de Scoht y para n_m un refractómetro Abbe de la marca ATAGO. Al final de este capítulo se presentan las principales características de ambos instrumentos.

4.3.2 Monarch 2000 I.L

Es un autoanalizador centrífugo que puede funcionar como turbidímetro, nefelómetro o fluorímetro y que se emplea para determinar cantidades de una sustancia en suero, orina o plasma. En líneas generales, este instrumento se encuentra formado por los siguientes elementos (figuras 4.14-4.17)

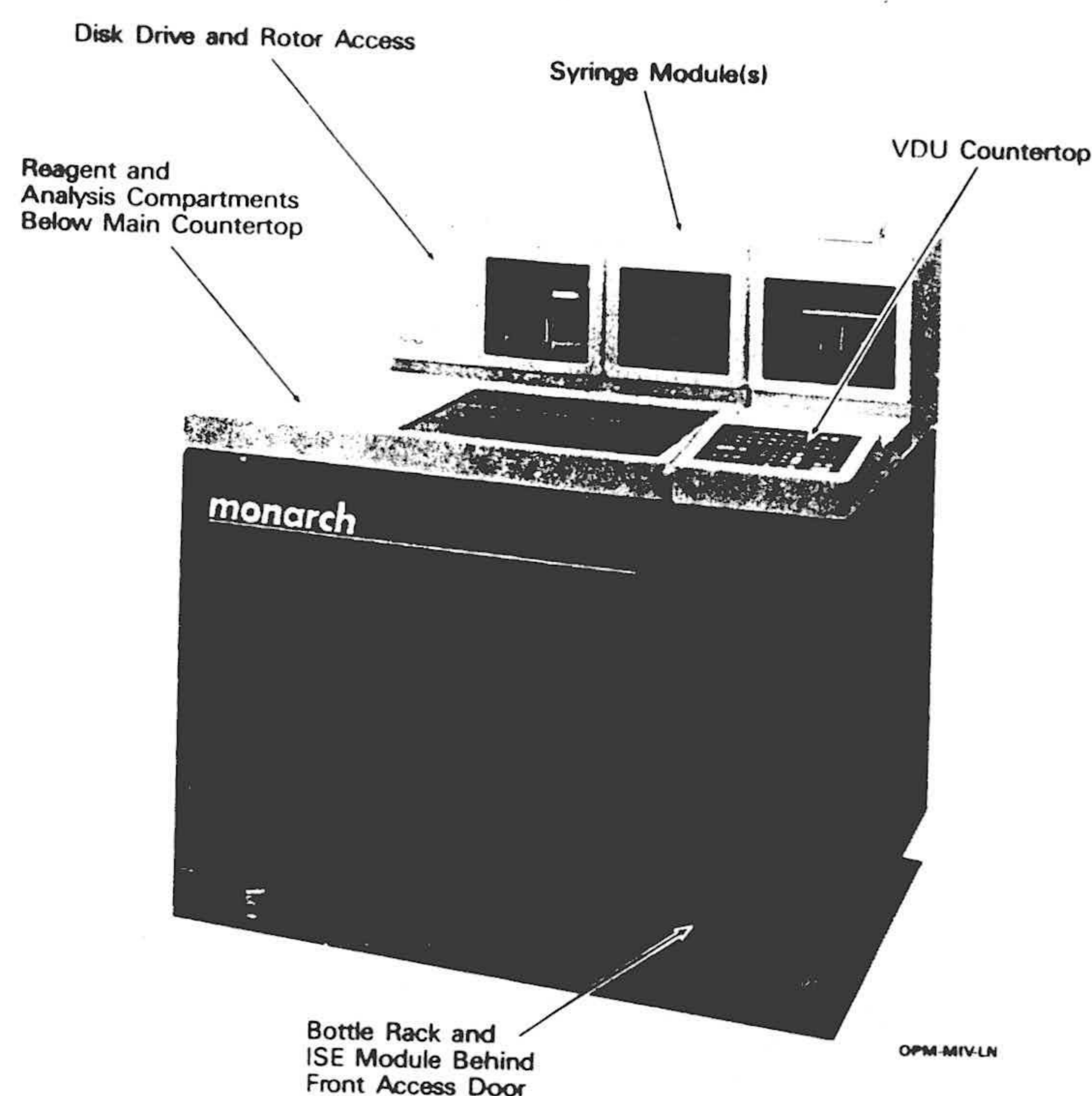


Figura 4.14. Monarch 2000 IL. Aspecto general del instrumento.

Sistema informático

El Monarch dispone de un programa informático donde está recogida toda la información necesaria para la edición de tests, curvas de calibración de reactivos, almacenamiento y análisis de datos, etc y del control propio del instrumento, tales como limpieza de pipetas, voltajes, temperatura, etc. El sistema informático se completa con una pantalla, un teclado y una impresora térmica.

Para realizar un experimento es necesario que el instrumento disponga de un conjunto de ordenes donde se especifiquen los volúmenes de reacción, longitud de onda, tiempo de medida e intervalo de captación de datos, definición de calibradores, etc. Todo esto está recogido en los denominados test cuyos parámetros son introducidos por el usuario.

Compartimento de reactivos

Es el lugar donde se almacenan las muestras y reactivos (látex y tampón/es) para su posterior dosificación y medida. Esta cámara está regulada térmicamente a 15°C.

Las muestras se introducen en unos anillos de plástico perforados (figura 4.15) con 38 orificios para copas de muestra y 6 para calibradores. Los reactivos se pueden depositar en contenedores de 3 o 15 ml dependiendo de las necesidades. Cada recipiente lleva un código de barras identificativo que debe coincidir con el asignado en el test correspondiente.

La dosificación en los rotores del compartimento de análisis, tanto del analito como de los látex o tampón/es, se hace de forma automática con un brazo mecánico provisto de dos pipetas, una para las muestras y otra para los reactivos.

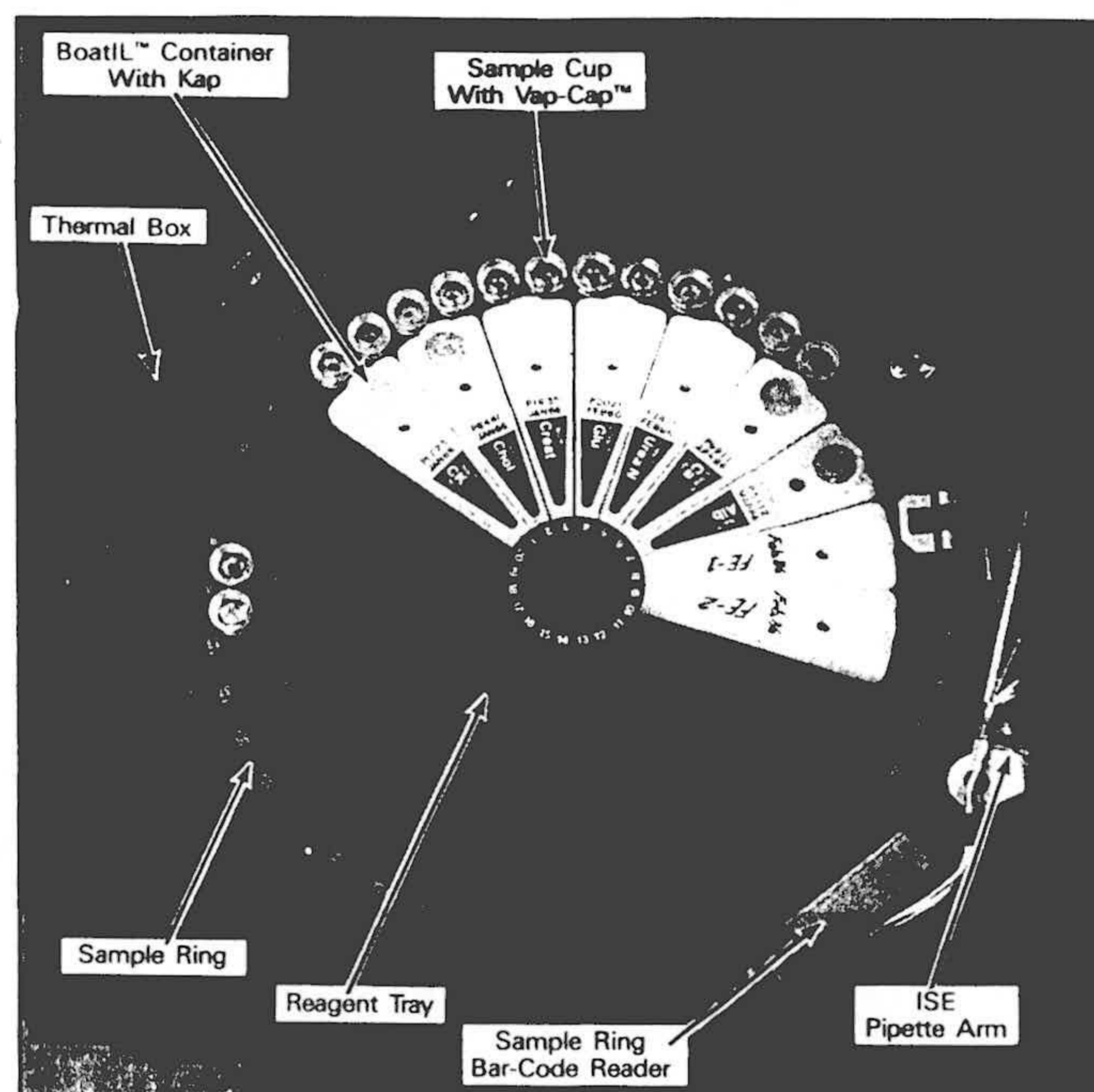


Figura 4.15. Compartimento de muestras y reactivos.

Módulo de jeringas

Normalmente está formado por dos jeringas (figura 4.16) de 100 y 250 μl respectivamente conectadas al brazo dosificador de la cámara de reactivos, aunque ciertos modelos de Monarch permiten analizar iones Na^+ , Cl^- , etc, para lo que sirve la tercera jeringa que aparece en la figura 4.16. En la mayor parte de los casos la de 100 μl dispensa las muestras y la de 250 μl los látex y tampones.

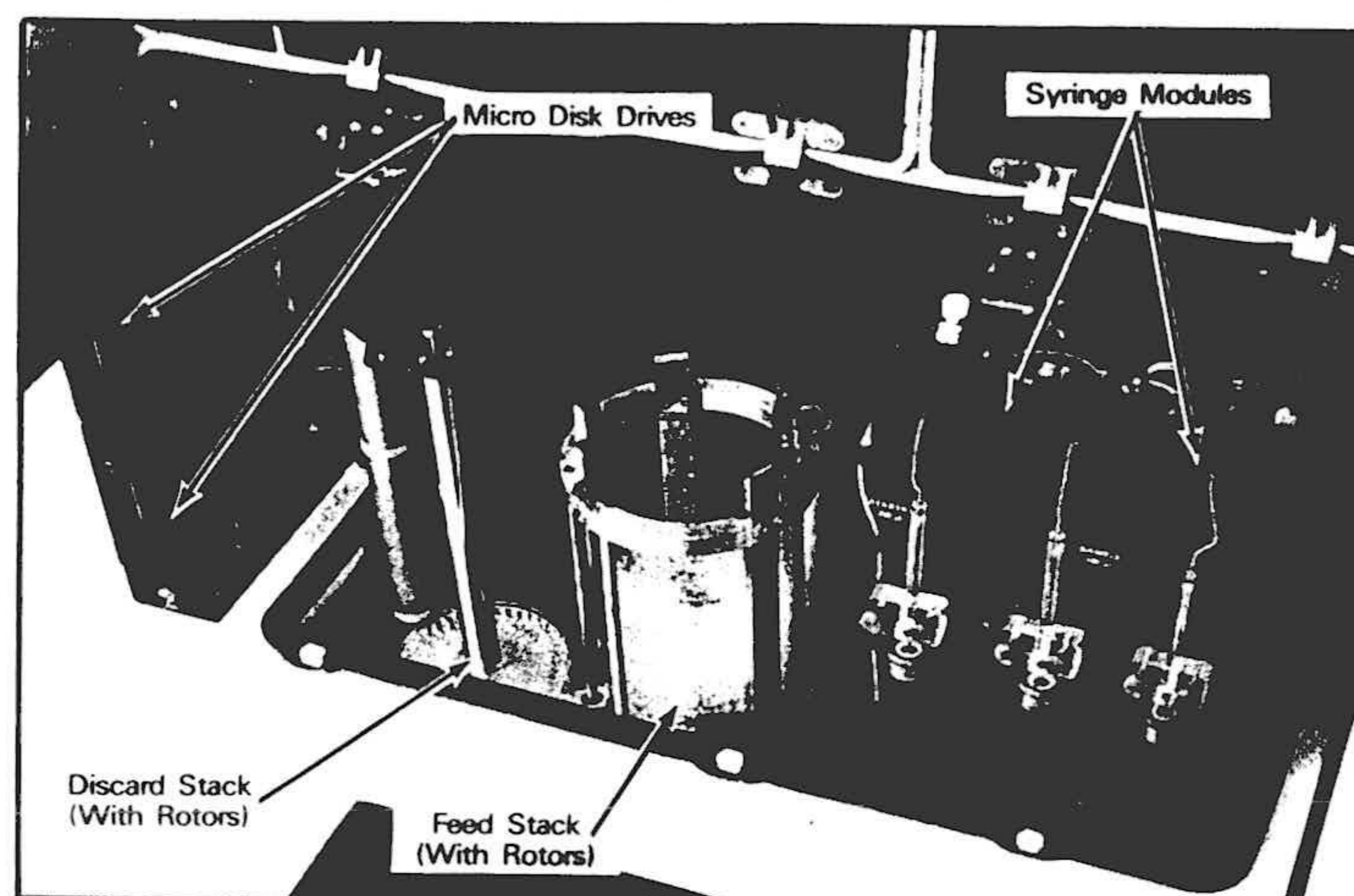


Figura 4.16. Módulo de jeringas. Carga y descarga de rotores de medida. Unidades de disco.

Circuito de agua desionizada y de desecho

El Monarch dispone de un circuito de agua desionizada, alimentado por un depósito situado en su parte inferior. El H_2O se emplea normalmente para limpiar las puntas de las pipetas del brazo dosificador. Esta limpieza se realiza de forma automática antes de comenzar a trabajar y durante la medida.

El agua utilizada va a parar a un depósito de desecho situado junto al de alimentación. Dependiendo del test, se puede añadir H_2O desionizada como diluyente de la muestra o de los reactivos.

Compartimento de análisis

Las medidas se realizan en unos rotores de plástico transparente compuestos por 39

cubetas, donde cada una de ellas está dividida en dos partes (figura 4.17). Las muestras y el tampón de reacción van normalmente a la cubeta interna y el reactivo de látex a la externa. Cuando el rotor gira (≈ 600 rpm) y vibra los contenidos de ambos compartimentos se mezclan. Durante la rotación se iluminan las cubetas con una determinada longitud de onda y en unos intervalos de tiempo previamente establecidos en el test. El paso de luz es de 0.744 cm.

El compartimento de medida tiene una temperatura fija, que puede ser de 25° , 30° o 37° C. En la mayoría de los casos se trabaja a 37° C, ya que es la más próxima a la del cuerpo humano.

Módulo óptico

Está compuesto por una lámpara de tungsteno y de otra de xenón, monocromador, juego de espejos, rueda de filtros y fotomultiplicador (figura 4.17).

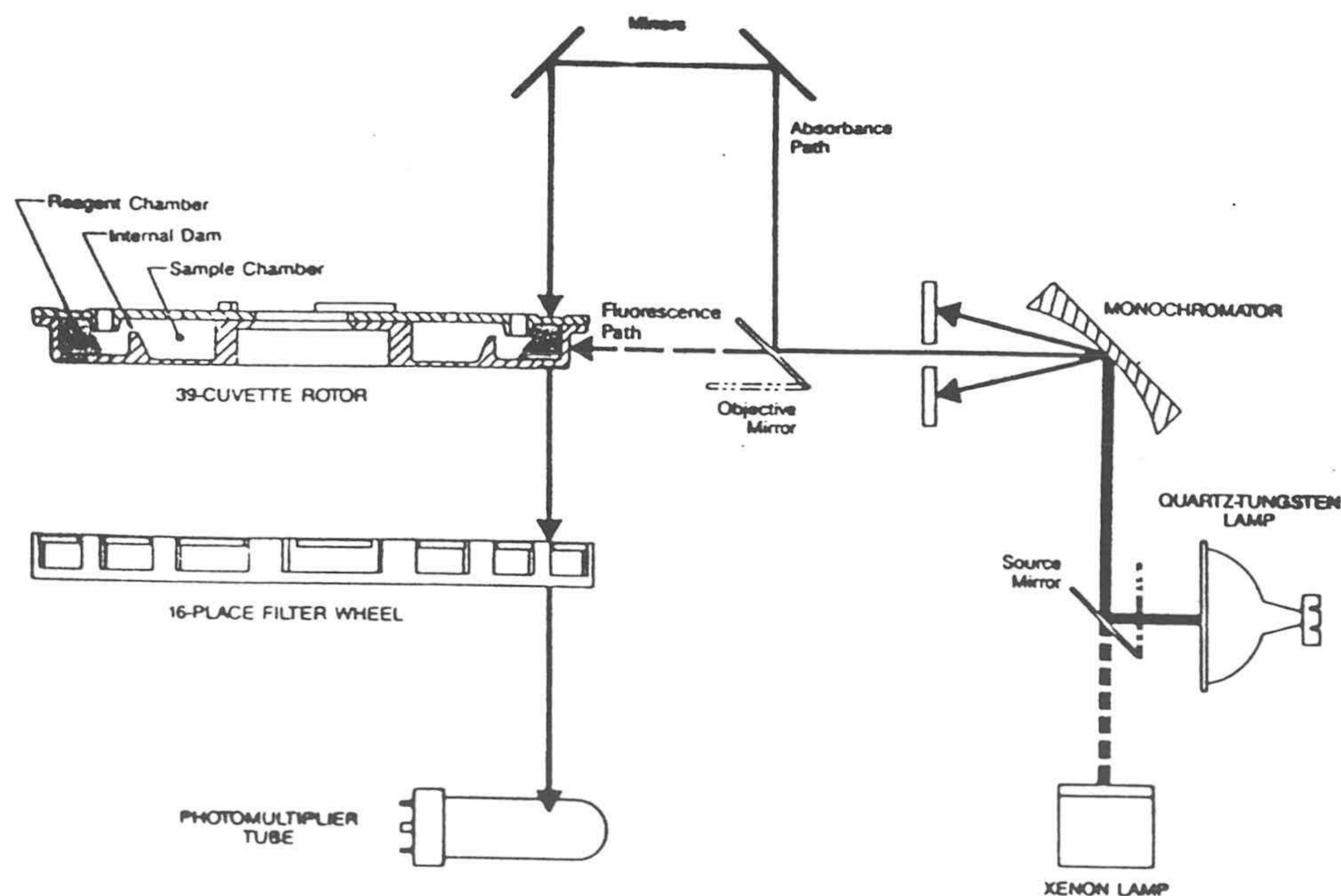


Figura 4.17. Esquema general del módulo óptico.

- ▶ Lámparas. La lámpara de tungsteno sirve para las medidas de turbidez y absorbancia mientras que la de xenón se emplea en fluorescencia y nefelometría. En los dos primeros casos la luz ilumina la parte superior de la cubeta, mientras que en los demás lo hace lateralmente.
- ▶ Monocromador. Selecciona la longitud de onda de la luz que incide sobre el rotor. En todas las técnicas de análisis (turbidimetría, nefelometría, etc) se emplea una sola λ . En la fluorescencia la luz incidente provoca una emisión de luz en el medio de reacción y a diferencia de los otros métodos aparece una radiación secundaria con una longitud de onda mayor que la inicial.
- ▶ Juego de espejos. Cambian la trayectoria de la radiación incidente, lo que permite iluminar las cubetas por su parte superior o por el lateral. También reflejan la luz transmitida que más tarde llega al fotomultiplicador.
- ▶ Filtros. Son los que seleccionan de la luz no dispersada (transmitida), el espectro de longitudes de onda que incidirán en el fotomultiplicador. En todos los casos, excepto para la fluorimetría, se elige la λ de la radiación incidente. Los filtros pueden variar desde 340 hasta 690 nm.
- ▶ Fotomultiplicador. Convierte la luz transmitida en una señal eléctrica. Esta señal se expresará en forma de absorbancia, intensidad, etc dependiendo de cual sea el método de análisis.

Sensores

Todas las funciones del Monarch están controladas mediante sensores, lo que permite saber en todo momento si existe algún problema de carácter mecánico, informático o relacionado con el propio experimento. Existen controles sobre la temperatura de la cámara de reactivos y de medida, el nivel de agua del depósito de agua desionizada, los códigos de barras de los reactivos, etc.

4.3.3 Shimadzu UV-2101 PC

Este instrumento consta en líneas generales de los siguientes elementos:

Módulo óptico (figura 4.18).

Está formado por un juego de lámparas (D2 y W1), espejos (M), un monocromador, cubetas de referencia (Ref) y muestra (Sam) y un fotomultiplicador (P.M).

► Juego de lámparas. Tiene dos lámparas, una de deuterio (D2) y otra halógena (W1). La luz emitida por las lámparas es reflejada por los espejos M1 y M2 y proyectada en el monocromador. La fuente luminosa se enciende automáticamente dependiendo de la longitud de onda de medida:

D2: 190 hasta 282~393 nm.

W1: 282~393 hasta 900 nm.

► Monocromador. Su misión es seleccionar la longitud de onda de medida. En este caso, al tratarse de un espectrofotómetro utiliza una sola λ . La luz que pasa por el monocromador se divide en la radiación que incide sobre la muestra (espejo M8) y la de referencia (espejo M7).

► Fotomultiplicador. Recoge la luz proveniente de la muestra y de la cubeta de referencia (espejos M9, M10 y M11). Comparando ambas radiaciones se determina la luz dispersada o absorbida por la muestra.

Sistema informático

Este espectrofotómetro dispone de una salida estándar RS2232 conectada a un ordenador personal. El PC contiene el programa de control y adquisición de datos del instrumento, que permite por ejemplo, realizar barridos a distintas longitudes de onda, medir variaciones temporales de la respuesta, almacenar los datos, etc.

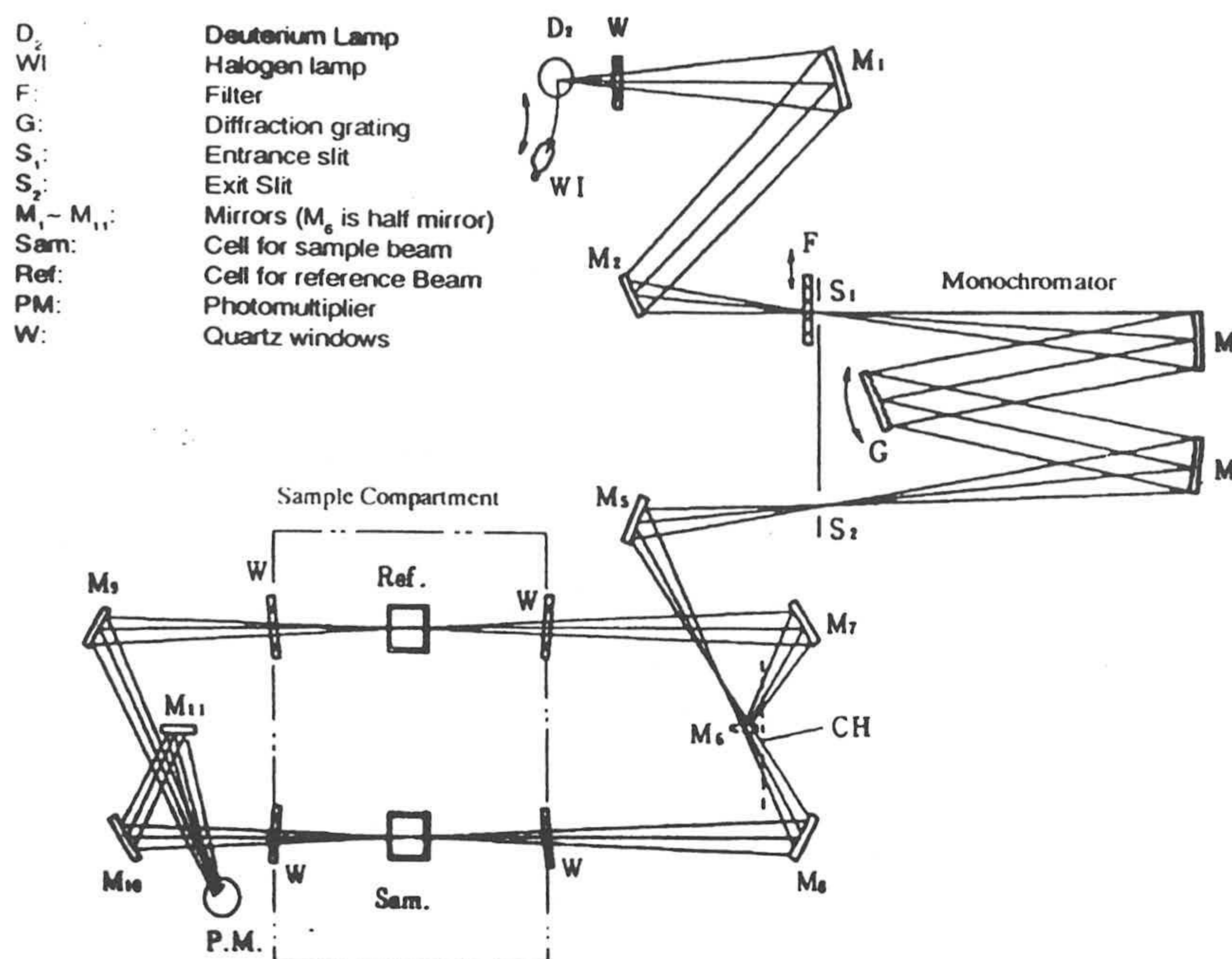


Figura 4.18. Shimadzu UV-2101PC. Módulo óptico.

4.3.4 Malvern 4700 PCS

Sus componentes principales son (figura 4.19):

Fuente de luz

Es un láser de argón de 75 mW de potencia y 488.8 nm de longitud de onda.

Espectrómetro

Consta de:

- ▶ Lentes de entrada, cuya misión es focalizar la luz en el centro de la célula de medida.
- ▶ Célula de medida. Está sumergida en un baño termostatzado y libre de contaminación. De la limpieza se encarga una bomba filtradora y la temperatura está controlada por una célula Peltier.

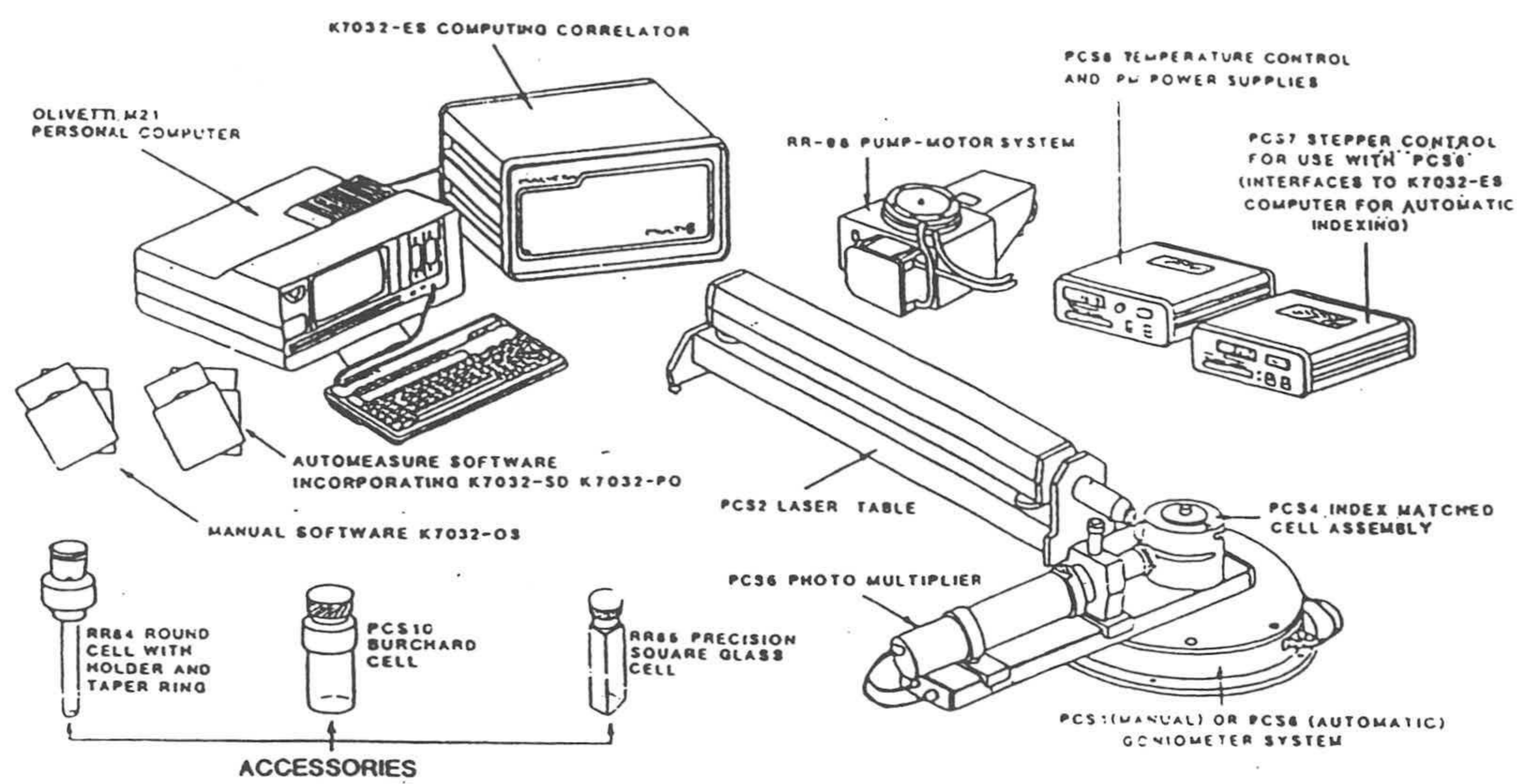


Figura 4.19. Malvern 4700 PCS. Aspecto externo del instrumento. Componentes.

Fotomultiplicador

Recoge la luz dispersada y suministra una intensidad proporcional al número de fotones que le llegan. Consta de un cátodo fabricado de un metal alcalino, que emite un electrón cuando incide un fotón. Este electrón, tras ser acelerado por un campo eléctrico, incide sobre un diodo, lo que conlleva la producción de más electrones. Repitiendo varias veces el proceso, se obtiene una señal de salida compuesta por un gran número de electrones ($10^5 \sim 10^7$).

Correlador

Calcula la función de autocorrelación del número de fotones (32-34), cuya expresión viene dada por:

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T n(t) n(t+\tau) dt \quad [4.4]$$

donde t es el tiempo de medida y $n(t)$ el número de cuentas o fotones. La función de autocorrelación es una forma de estudiar la señal de ruido constituida por la luz dispersada proveniente de la muestra.

Un correlador está formado básicamente por los elementos siguientes:

- ▶ Generador de tiempos de muestreo. Tiene como función dividir el tiempo en intervalos de igual duración, $\Delta\tau$, que reciben el nombre de tiempo de muestreo o "sample time". Cada valor de $G(\tau)$ se calcula para un múltiplo de $\Delta\tau$ ($\tau = j \Delta\tau$).
- ▶ Registro de desplazamiento. Es donde se almacena el número de pulsos que hay en cada tiempo de muestreo.
- ▶ Sumador. Multiplica y suma los valores almacenados en el registro desplazamiento.
- ▶ Memoria de la función de correlación. Está dividida en canales, donde se almacenan los $G(\tau)$ correspondientes a cada múltiplo de $\Delta\tau$. Sumando el resultado de uno de los canales se obtiene la función de correlación.

Ordenador

Procesa los datos que recibe del correlador y realiza los cálculos necesarios para determinar el tamaño de partícula, coeficiente de difusión, intensidad media dispersada, etc. Toda esta información se obtiene a partir del ajuste de cumulantes (polinomio de segundo grado) de la función de correlación.

4.3.5 Viscosímetro Ubbelohde-Schoot

En los fluidos se produce el denominado flujo laminar, que consiste en el movimiento de una lámina de fluido sobre otra sin que exista transmisión de materia. Las fuerzas responsables de este movimiento se denominan de cizalladura o desplazamiento mientras que a la medida de la fricción entre las láminas es a lo que se llama viscosidad. Esta propiedad permite explicar en muchas ocasiones el comportamiento de los sistemas proteicos en el medio de reacción (35), pero en cada caso siempre es necesario analizar los factores que afectan a la viscosidad, como temperatura, fuerza iónica, grado de

homogeneización, forma y estabilidad coloidal de las partículas/proteínas/complejos, etc.

Existen distintos métodos experimentales para determinar la viscosidad de un fluido, aunque en esta Memoria se ha utilizado el viscosímetro Ubbelohde, donde η está relacionada con el tiempo que tarda un líquido en pasar por un capilar. En la figura 4.20 se presenta el esquema general del instrumento, cuyo uso es muy simple. Con el viscosímetro nivelado y en posición vertical, se introduce el líquido (mínimo 15 ml) por la abertura nº 3 y se succiona por el orificio 1 hasta que supere la marca M_1 . A continuación se deja que el fluido baje por el capilar, midiendo el tiempo que tarda en recorrer la distancia entre M_1 y M_2 . Para que la determinación sea lo más exacta posible, es necesario realizar varias medidas de la misma muestra, ya que de esta manera disminuye el error debido al ojo humano. El efecto de la temperatura se controla no sólo con un termómetro ambiental y dentro de la muestra, sino midiendo periódicamente la viscosidad del agua, que es el fluido de referencia. La mayor parte de las medidas se han realizado a una temperatura ambiente alrededor de los 20°C.

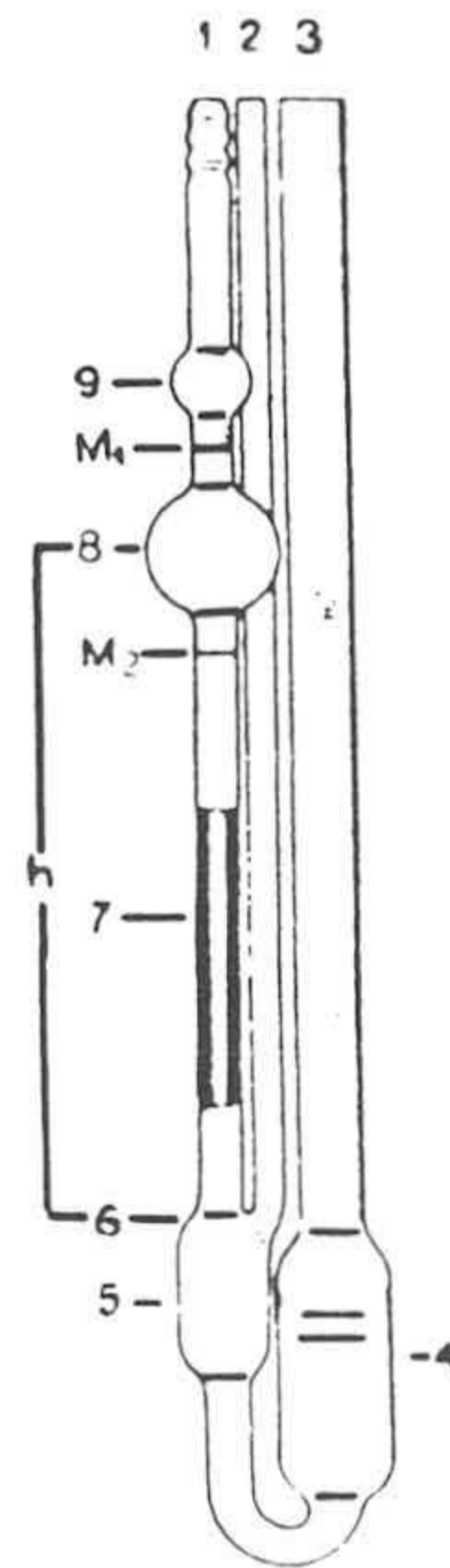


Figura 4.20. Esquema general del viscosímetro Ubbelohde de la casa Schott.

A partir del tiempo de caída t por el capilar se obtiene la viscosidad (cp) mediante la corrección en segundos de Hagenbach para viscosímetros Ubbelohde. La expresión es la siguiente

$$\eta = K \cdot (t - 68077.16 \cdot t^{-1.99345}) \quad [4.5]$$

donde la constante K es igual a 0.003 s⁻¹.

La η absoluta no interviene directamente en ningún cálculo, por lo que con la viscosidad relativa al agua es más que suficiente como para evaluar el efecto de este parámetro sobre la reactividad.

4.3.6 Refractómetro Abbe ATAGO

La luz se propaga en el vacío con una velocidad c , invariable, de 299793.0±0.3 km/s. Sin embargo, en los medios materiales la velocidad de la luz, v , varía en función de la constitución de los mismos, por lo que cada medio estará caracterizado por número, n_m , llamado índice de refracción, que se define como el cociente entre c y v (36). Cuando v es igual en todos los puntos y en todas las direcciones, se dice que el medio material es homogéneo e isótropo, y su índice de refracción será constante; si varía con la dirección de iluminación, se denomina anisótropo, y si la velocidad y por tanto el índice, varían de unos puntos a otros, pero cada uno de ellos es independiente de la dirección, el medio se llama heterogéneo.

A partir de la ley de Snell, el índice de refracción de una sustancia se puede expresar como

$$n_m = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r} \quad [4.6]$$

donde i es el ángulo de incidencia en el aire y r el de la refracción en la sustancia. Los instrumentos de medida de n_m suelen basarse en el ángulo límite ($i_{\text{límite}}$), o sea, el ángulo de incidencia que corresponde al mayor ángulo de refracción posible, es decir, 90°. En este caso, la expresión [4.6] queda como

$$n_m = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r} = \text{sen } i_{\text{límite}} \quad [4.7]$$

El refractómetro más utilizado es el Abbe, como el de la figura 4.21, que se emplea para determinaciones de n_m comprendidas entre 1.3 y 1.7. Sirve tanto para medios isótropos como anisótropos. Consiste básicamente en una fuente de luz (lámpara de sodio $\lambda=589.3$ nm); dos prismas móviles termostatazados (1 y 2 en la figura), entre los cuales se sitúa la muestra que se extiende en forma de capa de unos 0.1 mm de espesor (0.05-0.1 ml); otros dos prismas móviles Amici (5 y 6) que compensan las diferencias en el grado de refracción de la luz a las distintas longitudes de onda, es decir, eliminan un borde de color que se aprecia entre los campos oscuro e iluminado del ocular; un ocular (10-12 de la figura) para observar el campo en el que se produce la refracción y una escala graduada donde se lee n_m (8 en la figura).

El índice de refracción depende de la longitud de onda utilizada y de la temperatura. En general, para las sustancias con las que se trabaja, n_m disminuye tanto al aumentar λ de la radiación incidente (expresión [3.51]) como al incrementar la temperatura. La variación de n_m es del orden de 10^{-5} por cada grado centígrado para los sólidos, de 10^{-4} para el agua (n_m (20°C) = 1.33299, n_m (37°C) = 1.33104) y de $5 \cdot 10^{-4}$ para muchos líquidos.

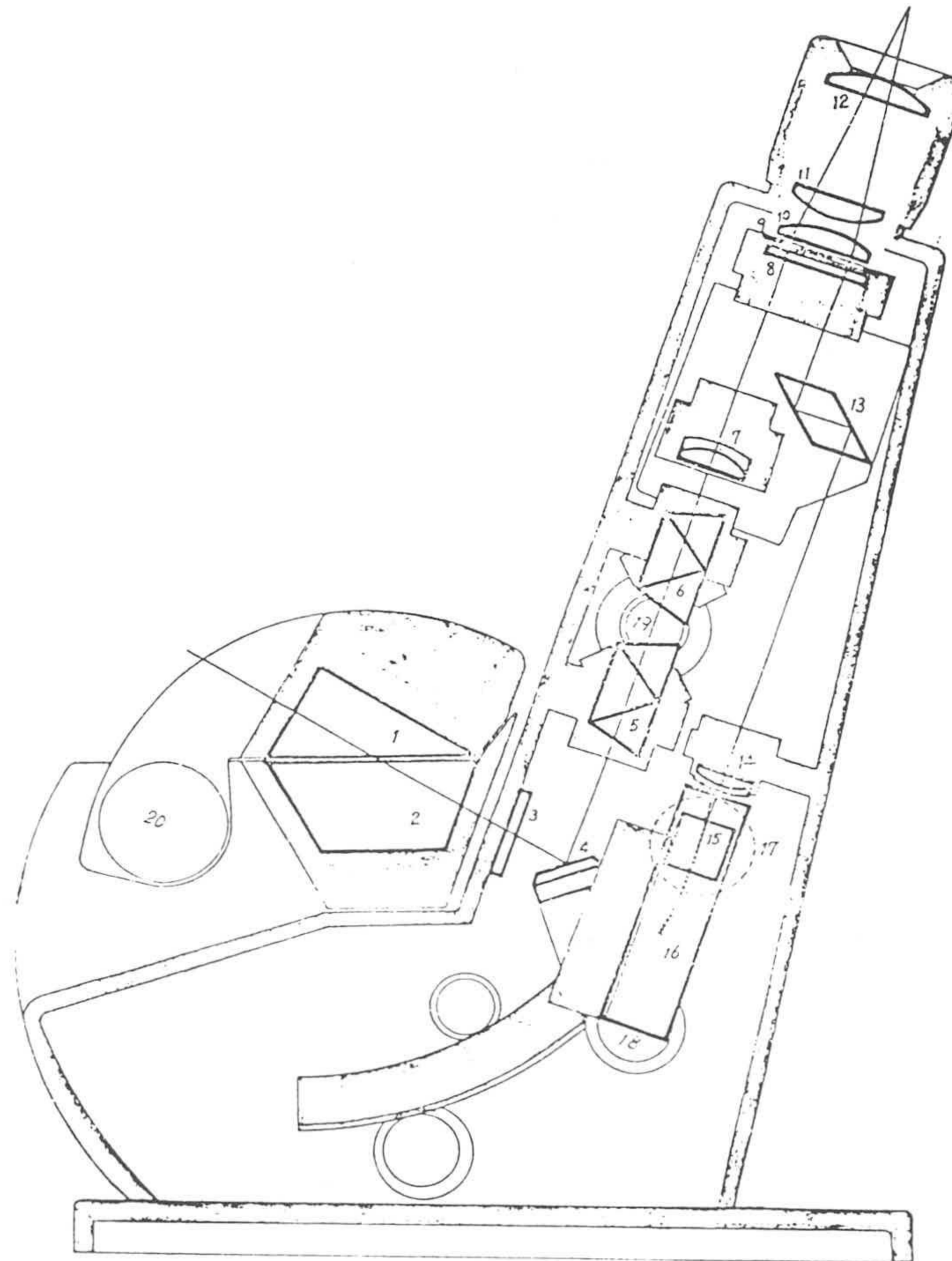


Figura 4.21. Refractómetro Abbe ATAGO . Esquema general del instrumento

4.4 Bibliografía

- (1) Price, C; Newman, D. Light Scattering Immunoassay. In: Principles and Practice of Immunoassay. (Eds Price,C., Newman,D) 446, Stokton Press. New York, (1991).
- (2) Vanderhoff, J. W; Van Den Hul, H. J; Tausk, R. J. M; Overbeek, J. TH. G. The preparation of monodisperse latexes with well-characterized surfaces. In: Clean Surfaces: Their Preparation and Characterization for Interfacial Studies.(Ed Goldfinger, G) 15. Marcel Dekker. New York, (1970).
- (3) Bangs, L.B. Uniform Latex Particles. Seradyn Diagnostics Inc. Particle Technology Division, (1987).
- (4) Galvin, J.P; Looney, C.E; Leflar, C.E., et al. Particle enhanced immunoassay systems. In: Clinical Laboratory Assays, New Technology and Future Directions. (Eds Nakamura, R.M., Ditto , W.R., Tucker, E.S.), 73. Masso Plublishing, New York, (1983).
- (5) Peula Garcia, J.M. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, (1995).
- (6) Rawle, A. The basic principles of particle size analysis. Malvern Instrument LTD.
- (7) Killman, E; Sapuntz, P; Maier, H. Dynamic Light Scattering for Characterization of Latices. Makromol. Chem; Makromol. Symp, 61, 42, (1992).
- (8) Everett, D. H; Gültepe, M. E; Wilkinson, M. C. Problems associated with the surface characterization of polystyrene latices. J. Colloid Interface Sci. 71, 336, (1979).
- (9) Labib, M. E; Robertson, A. A. The conductimetric titration of latices. J. Colloid Interface Sci. 77, 151, (1980).
- (10) Derjaguin, B. V; Landau, L. D. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. Acta Phys. Chim. URSS; 14, 633, (1941).
- (11) Verwey, E. J. W; Overbeek, J. Th. G. Theory of Stability of Lyophobic Colloids, Elsevier,

Amsterdam, (1948).

(12) Van Den Hul; Vanderhoff, J. W. The characterization of latex particle surfaces by ion exchange and conductimetric titration. *J. Electroanal. Chem*; 37, 161, (1972).

(13) Ahmed, S. M; El Aasser, M. S; Pauli, G. H; Poehlein, J. W; Vanderhoff, J. W. Cleaning latexes for surface characterization by serum replacement. *J. Colloid Interface. Sci*, 73, 388, (1980).

(14) Flectcher, M. A; Woolfolk B. J. Immunochemical studies of infectious mononucleosis. I. Isolation and characterization of heterophile antigens from hemoglobin-free stroma. *J. Immunol* 107: 842. (1971).

(15) Flectcher M. A; Lo T. M; Graves W. R. Immunochemical studies of infectious mononucleosis. V. Isolation and characterization of glycoprotein from goat erythrocyte membranes. *J. Immunol* 117: 722, (1976).

(16) Flectcher M. A; Klimas, N. G; Latif, Z. A; Caldwell, K. E. Serodiagnosis of infectious mononucleosis with a bovine erythrocyte glycoprotein. *J. Clin. Microbiol*; 495, (1983).

(17) Dodge J. T; Mitchel C; Hanahan D. J Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocyte. *Arch. Biochem. And Biophys* 100: 119, (1963).

(18) Weed R. I; Reed C. F; Berg G. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membrane?. *J. Clin. Inv.* 42: 581, (1963).

(19) Flectcher M. A; Caldwell K. E; Latif Z. Immunochemical studies of infectious mononucleosis IX. Heterophile antigen associated with glycoprotein from the bovine erythrocyte membrane *Vox Sang.* 43: 57, (1982).

(20) Preneta, A. Z. Separation on the basis of size: gel permeation chromatography. In: *Protein purification methods. A practical approach.* (Eds Harris, E. L. V, Angal, S), 293, IRL Press at Oxford University Press, (1989).

(21) Fischer, L. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Gel Filtration Chromatography.* (Eds: Work, T. S; Burdon, R. H). Elsevier, (1980)

(22) Heidelberg, M; Kendall, F. W. Quantitative theory of the precipitin reaction; study of azoprotein-antibody system. *J. Exp. Med.* 62, 467, (1935).

(23) Deicher, H. Über die Erzeugung heterospezifischer Haemoagglutinine durch Injektion artfremden Serums. *Z. Hyg;* 106, 561, (1926).

(24) Anderson, R.J; Stenberg, J.C. A rate nephelometer for immunoprecipitin measurement of specific serum proteins. *Automated Immunoanalysis.* (Ed Ritchie, R.F). 2, 410, Marcel Dekker, New York, (1978).

(25) Marrack, J. R; Richards, C. B. Light scattering studies of the formation of aggregates in mixtures of antigen and antibody. *Immunol;* 20, 1019, (1971).

(26) Tilton, R. C; Dias, F; Ryan, R. W. Comparative evaluation of three commercial test for detection heterophile antibody in patients with infectious mononucleosis. *J. Clin. Microbiol;* 275, (1988).

(27) Henle, W; Henle, G; Lennette, E.T. (1979). El virus de Epstein-Barr. *Inmunología. Libros de Investigación y Ciencia*, 261. Editorial Labor. Barcelona (1983).

(28) Rhodes, G; Smith, R. S; Rubin, R. E; Vaughan, J; Horwitz, C. A. Identical IgM antibodies recognizing a glycine-alanine epitope are induced during acute infection with Epstein-Barr virus and cytomegalovirus. *J. Clin. Lab. Anal;* 4, 457, (1990).

(29) Cohn, E. J; Strong, L. E; Hughes jr, W. L; Mulford, D. J; Ashworth, J. N; Melin, M; Taylor, H. L. Preparation and properties of serum and plasma proteins IV. A system for separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc,* 68, 459, (1946).

(30) Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*, (Ed. Pecora R). Plenum Press, (1985).

(31) Mayo, C.S; Hallock, R.B. Immunoassay based on surface plasmon oscillation. *J. Immunol. Meth;* 120, 105, (1989).

(32) Candau S. J. Quasielastic light scattering from dilute suspensions of polydisperse spherical particles. In: *Scientific Methods for the Study of Polymer Colloids and their applications.* (Eds: Candau F; Otewill, R. H), 329, Kubler Academic Publishers. The Netherlands, (1988) .

- (33) Ware, B. R. Electrophoretic light scattering. *Adv. Colloid. Interface. Sci*, 4, 1, (1974).
- (34) Brown, R. G. *Introduction to random signal analysis and kalman filtering*. (Eds: John Wiley & Sons). New york, (1983).
- (35) Harding, S. E. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. *Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 68, 207, (1997).
- (36) Sears, F. W; Zemansky, M. W; Young, H. D. *Física*. Editorial Aguilar España. (1981).

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

5.1 Introducción

5.2 Obtención de los complejos látex-Ag P-B.

5.3 Medida de la reactividad

5.4 Determinación de tamaño de partícula por turbidimetría

5.5 Ajuste matemático de la curva experimental absorbancia-tiempo

5.6 Bibliografía

5.1 Introducción

En este capítulo se lleva a cabo una descripción de los todos procesos implicados en la elaboración de los diferentes complejos látex-proteína, así como en la medida de la reactividad y en el análisis de la curvas absorbancia-tiempo. En líneas generales se puede dividir en los bloques siguientes:

- ▶ Obtención de los complejos Ix-Ag P-B. Dentro de este apartado se presenta el protocolo de elaboración de los complejos Ix-Ag P-B, donde se describe el proceso de sensibilización y bloqueo, además de los procedimientos de análisis de la proteína unida, sonicación y medida del estado de agregación. Finalmente se expone el método para determinar la concentración crítica de coagulación de las partículas sin sensibilizar (c.c.c).
- ▶ Medida de la reactividad. Se examinan los elementos utilizados habitualmente para evaluar la reactividad, estabilidad coloidal y especificidad de los complejos Ix-Ag P-B.
- ▶ Métodos de la Tesis. Se describen dos métodos diseñados para esta Memoria, como son la determinación del tamaños de partícula por turbidimetría y el análisis (ajuste matemático) de la curva absorbancia-tiempo.

5.2 Obtención de los complejos látex-Ag P-B

5.2.1 Sensibilización

Se entiende por sensibilización al recubrimiento de las partículas de látex con una determinada proteína, que en la mayor parte de los casos es un antígeno o un anticuerpo. Las interacciones que controlan la adsorción, a la que también se denomina fisorción, son fundamentalmente de carácter hidrofóbico (no covalentes)(1), aunque las fuerzas coulombianas y de London-van der Waals tienen también una gran importancia, sobre todo en el acercamiento de la proteína a la superficie (tabla 6.1). La estabilidad estructural y el tamaño de la molécula proteica son otros de los parámetros que intervienen en la fisorción, de manera que proteínas con baja estabilidad estructural y poco solubles se adsorben con más facilidad (2). Las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, etc) la carga superficial, así como la hidrofobicidad de la superficie influirán no sólo en la fisorción, sino

también en la mayor o menor estabilidad de la unión (3).

El inmuno-ensayo para la detección del Ac P-B es de adsorción, y se ha elaborado siguiendo un método desarrollado en el Departamento de Investigación y Desarrollo de Biokit S.A previo a la escritura de esta Memoria, por lo que no su proceso de obtención no se mostrará en la misma. Todos los reactivos de esta Tesis están hechos con este protocolo, cuyo esquema general se recoge en el diagrama 5.1. Las condiciones de sensibilización de este método son las siguientes:

- ▶ Medio de sensibilización: tampón fosfatos pH 6 .
- ▶ Superficie de sensibilización: $\approx 0.7 \text{ m}^2$, aunque para cada partícula ha resultado ser algo diferente, como se puede ver en la tabla 5.1.

| Partícula | Superficie de sensibilización (m^2) | Número de partículas (cm^{-3}) |
|-----------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| RP-130 | 0.66 | $1.24 \cdot 10^{13}$ |
| SN9 | 0.76 | $6.35 \cdot 10^{12}$ |
| RP-214 | 0.76 | $5.31 \cdot 10^{12}$ |

Tabla 5.1. RP-130, SN9, RP-214. Superficie de unión y número de partículas.

5.2.2 Bloqueo.

En la mayor parte de los casos la superficie de la partícula no está completamente cubierta de proteína tras la sensibilización. Los lugares libres deben bloquearse con una sustancia inerte a la reacción, no sólo para estabilizar los complejos, sino también para evitar la unión no específica de proteínas del suero (4). En el caso de reactivos de adsorción, uno de los bloqueantes más utilizados es la albúmina bovina (B.S.A). Su pequeño tamaño, baja estabilidad conformacional así como la acidez del punto isoelectrico (≈ 4.7), hacen que sea ideal a la hora de estabilizar coloidalmente las partículas sensibilizadas (5).

Varios autores han estudiado los parámetros que influyen en la adsorción de la BSA, tales como la carga del látex (6), la hidrofobicidad de las partículas (diferentes síntesis) (6, 7), el pH y fuerza iónica del medio (6-10) o incluso la naturaleza de la superficie del

adsorbente (11). Teniendo en cuenta todos estos factores y a partir de nuestra propia experiencia, el método de bloqueo es el siguiente:

- ▶ Tampón de bloqueo (es el medio con el que se añade la BSA). Es un fosfatos pH 7.
- ▶ Tras añadir el tampón de bloqueo, el medio donde quedan resuspendidos los complejos es un fosfatos pH 7 y 0.155 de fuerza iónica. Este medio es el que después se utiliza como tampón de reacción.

5.2.3 Centrifugación. Grado de recubrimiento.

La centrifugación permite eliminar el antígeno que no se ha unido a las partículas durante la sensibilización. Este Ag libre puede inhibir parcial o totalmente la reacción, ya que al ser mas pequeño que el complejo Ix-Ag P-B tiene mayor coeficiente de difusión y por tanto reaccionaría antes con el anticuerpo. Por este motivo y para mayor seguridad, se realizan dos ciclos consecutivos de centrifugación-resuspensión. Para analizar los sobrenadantes de la centrifugación se han utilizado dos métodos diferentes:

BCA (bicinchoninic acid)

Determina la concentración proteica total de la muestra, lo que obliga a extraer una alícuota antes de bloquear, siendo este su principal inconveniente. De esta forma no existe interferencia por parte de la albúmina. Este sistema se basa en el hecho de que las proteínas son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ junto con el ácido bicinonínico forma unos complejos de color púrpura solubles en agua y de alta absorbancia óptica a 562 nm, lo que permite la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína. Las etapas de este método son en líneas generales las siguientes:

- ▶ Dilución de las muestras y de una albúmina bovina de concentración conocida, con un reactivo que tiene Cu^{2+} y con otro que contiene ácido bicinonínico. La albúmina se usa como patrón. La formación de complejos entre este ácido y el Cu^+ se favorece a altas temperaturas, por lo que se somete a las muestras a un calentamiento de 60°C durante media hora.
- ▶ Medida de la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. A partir de la respuesta óptica de las distintas diluciones de la BSA se obtiene una recta de ajuste, donde se pueden interpolar las absorbancias de las muestras.

Específico del Ag P-B

Es un método de inhibición de la aglutinación que utiliza el sobrenadante de la centrifugación. Está diseñado para el autoanalizador centrífugo Monarch 2000 I.L, de manera que la dosificación de los reactivos y de las muestras, así como los cálculos de concentración son automáticos.

► Puesta punto. Elección del látex, dilución de aglutinante y calibradores.

- Látex. El reactivo debe tener varias diluciones de Ac dentro del rango de trabajo y con una reactividad significativa respecto del "blanco" (definición en el apartado 5.3). En este caso se he escogido el RP-130 con una concentración de partículas de $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ y un grado de recubrimiento de $34 \mu\text{g Ag P-B/m}^2\text{Ix}$ (figura 5.1-(a)). El tiempo de medida es 100 s y la longitud de onda 570 nm. El aglutinante es el suero humano de 256 U.P-B/ml.

- Anticuerpo. Dentro del rango de trabajo, se elige la concentración de Ac cuya respuesta en la reacción directa tenga el mayor cambio de pendiente en la curva de reactividad, ya que así se detectan mucho mejor las variaciones de absorbancia debido a la inhibición. Para el RP-130 es la de 32 U.P-B/ml, como se puede ver en la figura 5.1-(b), donde está representada la diferencia de reactividad entre dos valores consecutivos de aglutinante dividida por el incremento de concentración.

- Calibradores. Son diluciones de Ag P-B que varían entre 0 y $8 \mu\text{g/ml}$. Se eligen en función de su capacidad inhibidora frente al anticuerpo (figura 5.2).

► Aplicación del método específico

- Incubación del Ag y del Ac. Inhibición del anticuerpo. Los calibradores y las muestras están en contacto con el Ac durante cinco minutos. En este intervalo de tiempo se producen todas las uniones posibles y sólo queda libre el exceso de antígeno o de anticuerpo.

- Reacción con el látex. Tras la inhibición, el anticuerpo que no ha reaccionado puede aglutinar a los complejos Ix-Ag P-B. Un incremento elevado de absorbancia indica que la cantidad de Ag de la muestra (sobrenadante) es bastante baja. Por el contrario, poca reactividad denota un alto contenido de Ag. La concentración se determina interpolando por un método no lineal (12, 13) el incremento de absorbancia de cada muestra en la curva de calibración (figura 5.2). Hay que diluir la muestra si tiene una concentración fuera del rango de calibración.

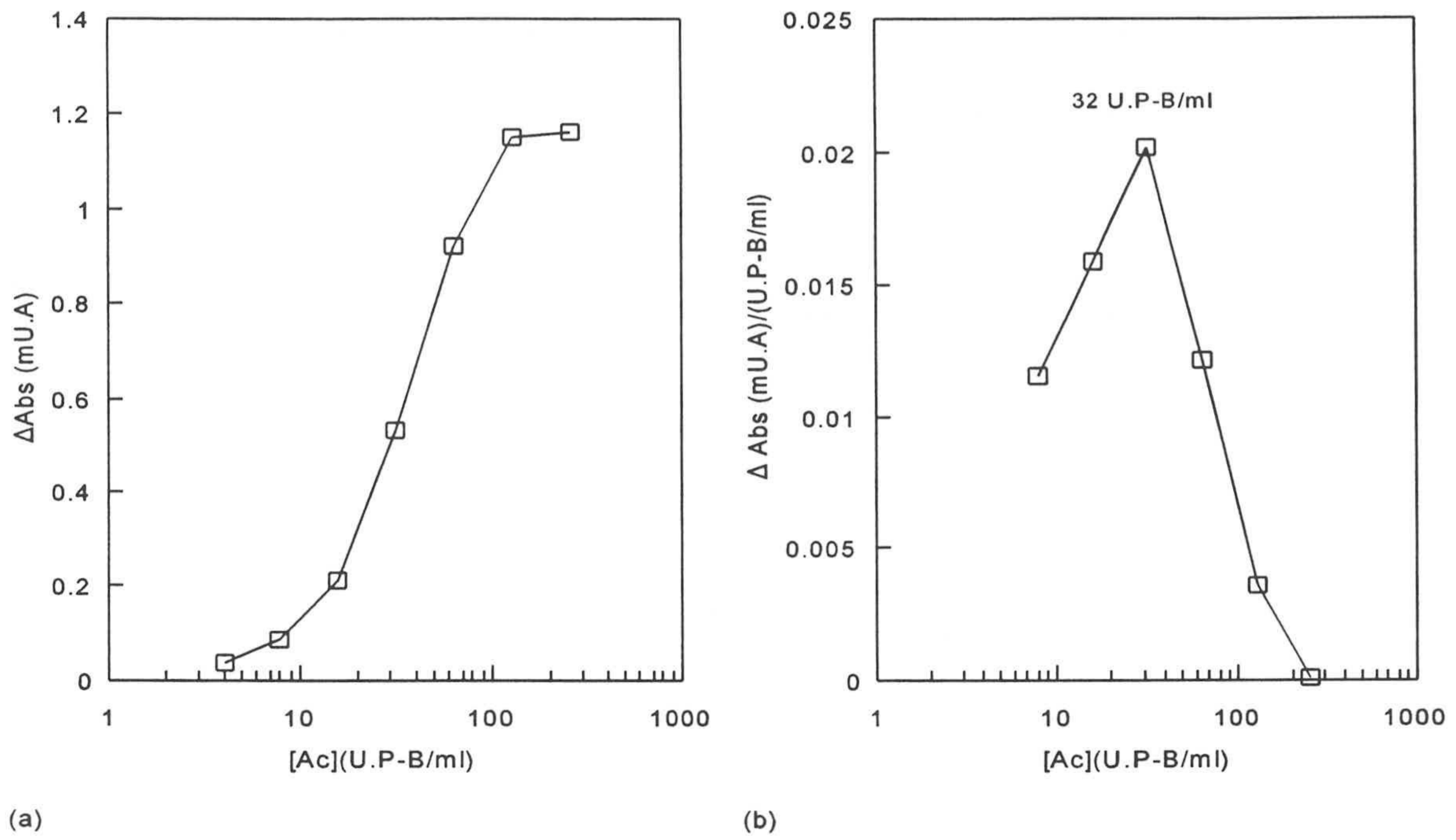


Figura 5.1. (a) Variación del incremento de absorbancia (Δ Abs) con la concentración de anticuerpo. (b) Cambio de la pendiente en función de [Ac]. Partícula RP-130 ($4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Tiempo de medida: 100 s. Longitud de onda: 570 nm. Agregante humano de 256 U.P-B/ml.

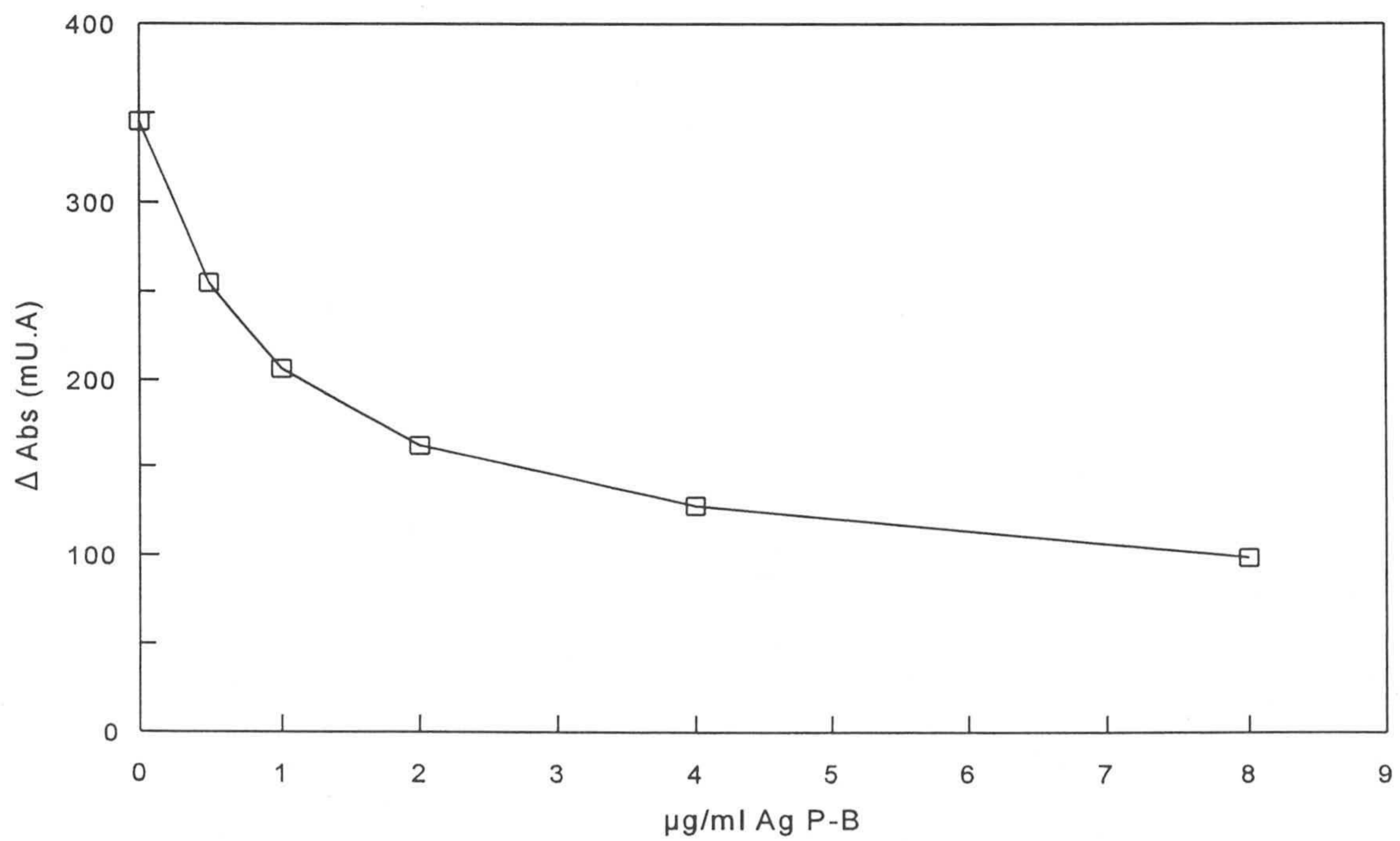


Figura 5.2. Curva de calibración del método específico de determinación del Ag P-B. Partícula RP-130 ($4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag P-B/m}^2\text{lx}$). Longitud de onda: 570 nm.

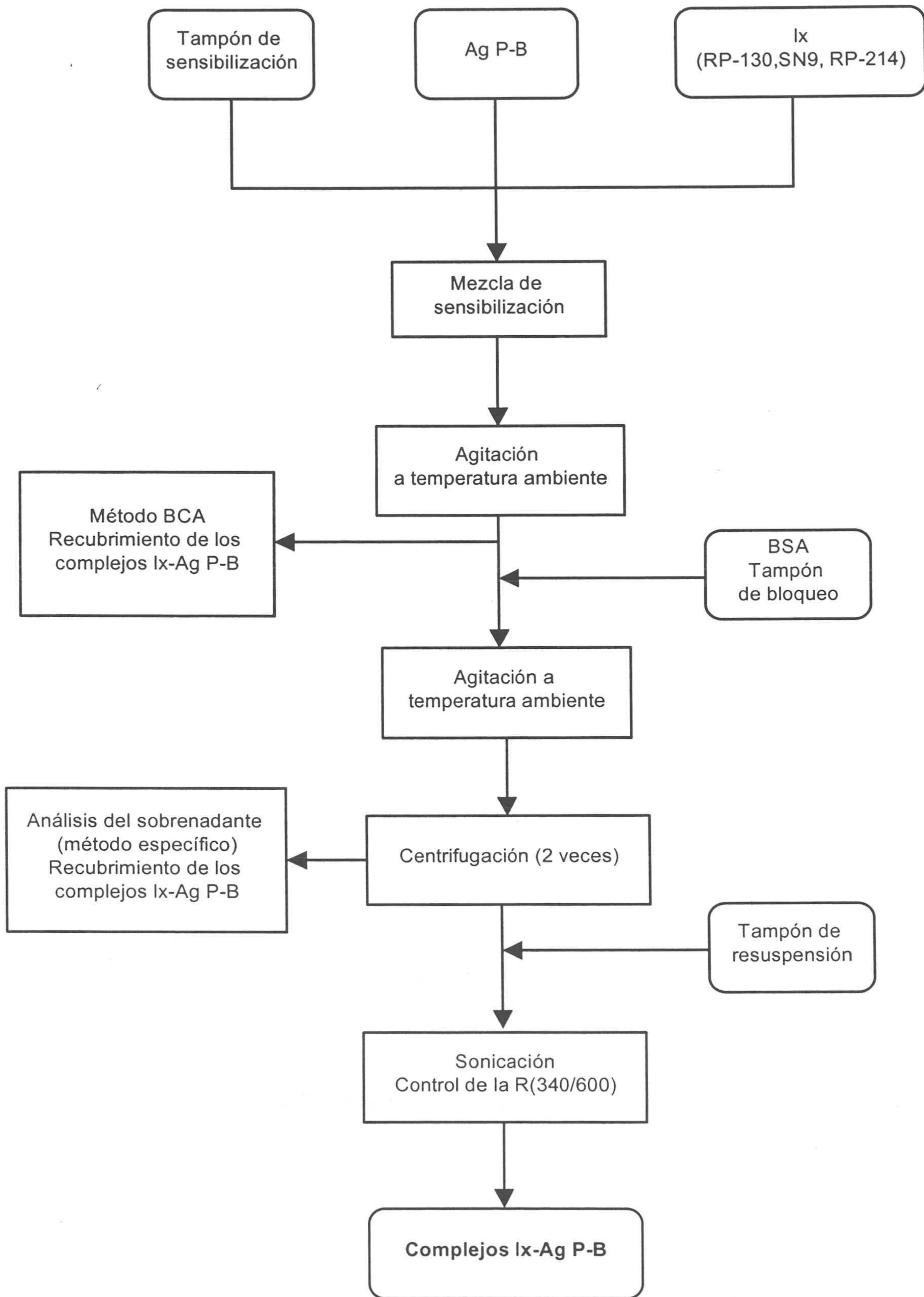


Diagrama 5.1. Método de obtención de los complejos Ix- Ag P-B.

5.2.4 Sonicación

Durante la sensibilización/bloqueo y sobre todo en la centrifugación, el estado de agregación de las partículas varía significativamente del inicial. En la mayor parte de los inmuno-ensayos de soporte coloidal y sobre todo en los que están diseñados para instrumentos ópticos, los complejos deben quedar finalmente con el mismo estado de agregación, ya que el diámetro de partícula es uno de los factores que más influye en el rango de trabajo y en la respuesta a baja concentración de aglutinante (reproducibilidad lote a lote). Por este motivo se realizan varios ciclos de sonicación tras la centrifugación-resuspensión.

La sonicación se lleva a cabo mediante un desintegrador ultrasónico, técnica muy utilizada en la ruptura de células o en la preparación de extractos (14). Cuando una onda de sonido o ultrasonido viaja a través de un líquido se producen compresiones y rarefacciones (enrarecimientos). Si esta onda tiene una frecuencia lo suficientemente elevada, aparece el fenómeno denominado cavitación, que consiste en la formación y ruptura de burbujas microscópicas. Estas burbujas tardan una serie de ciclos en crecer, lo que se conoce por tamaño de resonancia, a partir del cual sufren un colapso instantáneo y muy violento, provocando una carga de presión local que puede llegar a ser de hasta 2000 atm. Este fenómeno tiene un radio de acción de pocas micras y es el responsable de la desagregación de los complejos Ix-proteína.

Las condiciones de sonicación (tiempo, potencia, etc) se determinan midiendo la absorbancia óptica durante el proceso, comparando la absorbancia óptica a 340 nm y a 600 nm. La turbidez de un sistema monodisperso es directamente proporcional al producto de la sección eficaz de dispersión y del número de partículas. Dividiendo la absorbancia de una misma muestra a dos longitudes de onda diferentes, el cociente será siempre el mismo e independiente del número de partículas. Aunque este cociente de absorbancias solo es válido para látex monodispersos, la razón 340/600 permite estimar el cambio del estado de agregación de los complejos Ix-Ag P-B durante la sonicación, ya que la razón se hace menor a medida que aumenta el tamaño de partícula. Todo esto se explicará con mayor detalle en el apartado 5.4, donde se describe el método de determinación de tamaños por turbidimetría.

La tabla 5.1 presenta la razón 340/600 de las partículas RP-130, RP-214 y SN9 sin sensibilizar (látex original) y de los complejos Ix-Ag P-B después de sonicar. El rango de variación de la razón de los complejos se establece en base a los resultados experimentales y es el que se exige para dar por finalizada la sonicación. El reactivo elaborado con el RP-214 queda siempre más polidisperso que los demás, lo que se confirmará en las medidas

realizadas con el Malvern 4700 PCS (capítulo 6).

| Partícula | Razón 340/600 | | Diámetro (nm) | |
|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | Original | Ix-Ag P-B | Original | Ix-Ag P-B |
| RP-130 | 8.21 | 6.7-7 | 130 | 177-197 |
| RP-214 | 6.43 | 6.0-6.2 | 214 | 230-242 |
| SN9 | 6.50 | 5.8-6.0 | 210 | 242-250 |

Tabla 5.2. Razón 340/600 y diámetro medio de las partículas sin sensibilizar y de los complejos Ix-Ag P-B. Medidas realizadas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-2101 PC.

5.2.5 Concentración Crítica de Coagulación (c.c.c).

La c.c.c de las partículas sin sensibilizar, tanto la rápida (teoría D.L.V.O) como la lenta (a largo plazo) es una información muy útil a la hora de diseñar el método de sensibilización o que puede servir para explicar la aglutinación del sistema [Ix-Ag]-Ac.

c.c.c rápida

En los años cuarenta Derjaguin y Landau (1941) por un lado y Verwey y Overbeek (1948) por otro, formularon la teoría clásica de la estabilidad coloidal, conocida como D.L.V.O. En esta teoría se combinaban por primera vez las fuerzas repulsivas de carácter electrostático con las atractivas de London van der Waals. Según esta teoría, las interacciones atractivas varían con la inversa de la distancia (H) entre las partículas y no dependen de la concentración de electrolito del medio, mientras que las repulsivas lo hacen exponencialmente en un intervalo igual al espesor de la d.c.e (κ^{-1}). El valor de κ^{-1} depende de la concentración iónica del medio, la naturaleza de los grupos superficiales y la densidad superficial de carga. La representación gráfica de estas interacciones en función de la distancia H se presenta en la figura 5.4. De la combinación de ambas resulta una curva con dos mínimos, denominados primario y secundario respectivamente y una barrera energética (V_M). Esta barrera es la que tienen que superar las partículas para poder aproximarse y entrar en el mínimo primario.

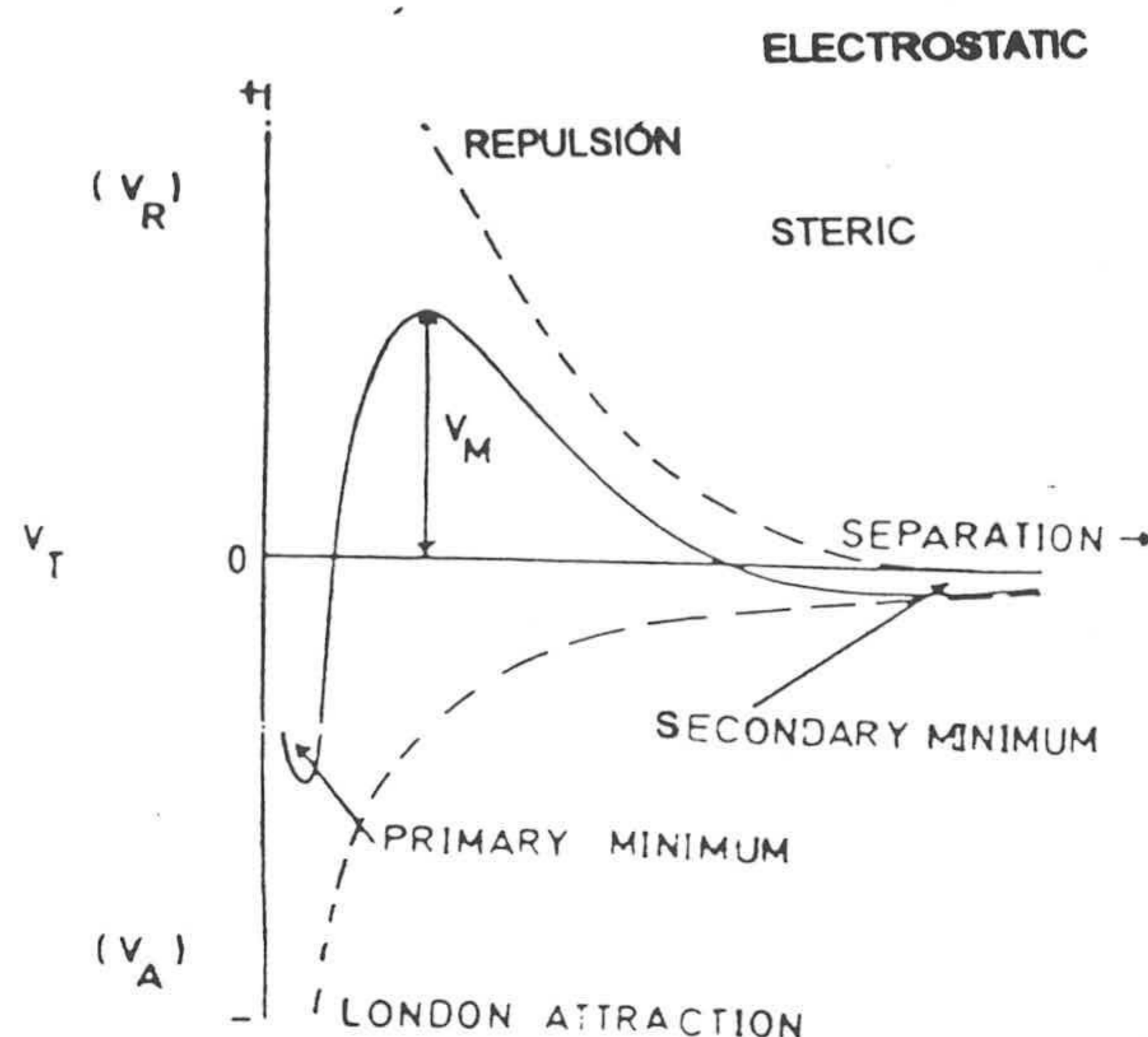


Figura 5.4. La energía total de interacción (V_T) en función de la distancia de separación de dos esferas cargadas.

Se define la c.c.c como aquella concentración de electrolito a partir de la cual aparece la floculación rápida. Se habla de esta agregación cuando no hay barrera energética entre las partículas y todos los choques son efectivos. Este régimen recibe el nombre de Diffusion Limit Cluster Cluster Agregación (D.L.C.A).

Para calcular el valor experimental de la c.c.c rápida se utiliza el denominado factor de estabilidad de Fuchs W (15), que se define como el cociente entre la velocidad de agregación rápida (régimen D.L.A) y la lenta (aun existe barrera energética). La relación entre W y la concentración de electrolito C_e (16) del medio viene dada por la expresión:

$$\log W = -K' \log C_e + \log K'' \quad [5.1]$$

donde K' y K'' son dos constantes positivas. Según esta ecuación, al aumentar la cantidad de electrolito W disminuye, hasta que se hace igual a la unidad ($\log W=0$), lo que corresponde a una C_e igual a la c.c.c. Para valores superiores a esta concentración la agregación es siempre rápida.

El método de obtención de la c.c.c rápida del RP-130, SN9 y RP-214 es el siguiente:

- Preparación de diluciones de un electrolito (NaCl) a diferentes concentraciones. A continuación se añade a todas las diluciones el mismo número de partículas de látex y se mide la respuesta óptica de las mismas. El medio tiene pH 7.

- ▶ A partir de la curva absorbancia-tiempo, se determina la pendiente inicial para todas las concentraciones de electrolito. La pendiente llega a su valor máximo cuando la cantidad de electrolito es igual o superior a la c.c.c.
- ▶ El W de cada dilución es el cociente entre la pendiente y el valor máximo de la misma. El valor de la c.c.c corresponde a $\log W=0$ ($W=1$).

El espectrofotómetro utilizado es el Monarch 2000 I. L y las condiciones de trabajo están recogidas en la tabla 5.3.

| Látex | Número de partículas (cm^{-3}) | Electrolito (mM) (max/min) | Longitud de onda en el vacío (nm) |
|--------|-------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| RP-130 | $2.1 \cdot 10^{11}$ | 1530/0 | 570 |
| SN9 | $4.1 \cdot 10^{10}$ | 1530/0 | 570 |
| RP-214 | $3.6 \cdot 10^{11}$ | 1530/0 | 570 |

Tabla 5.3. Cálculo de la c.c.c rápida/lenta. Condiciones de trabajo. RP-130, SN9, RP-214.

c.c.c lenta

Se define como la máxima concentración de electrolito que no agrega al sistema, al menos durante 24 horas. La c.c.c lenta sirve para elegir las condiciones de sensibilización y conservación.

El método de obtención de la c.c.c lenta es el siguiente:

- ▶ Preparación de diferentes concentraciones de un electrolito (NaCl). A continuación se añade un mismo número de partículas a cada una de las diluciones y se dejan en reposo durante al menos veinte horas.
- ▶ Trascurrido este intervalo de tiempo, se mide el estado de agregación a "visu" o con un espectrofotómetro.
- ▶ La mayor concentración de electrolito que no agrega a las partículas es la c.c.c lenta.

En este caso se ha empleado el espectrofotómetro Shimadzu UV-2101. Las condiciones de trabajo son las de la tabla 5.3.

5.3 Medida de la reactividad

Cuando los complejos Ix-Ag P-B entran contacto con el aglutinante, se produce la denominada inmuno-aglutinación, proceso que se puede descomponer en dos fases perfectamente definidas:

- ▶ Unión entre las proteínas de sensibilización con las específicas del suero (aglutinante). Esta reacción es muy rápida (17) debido principalmente al pequeño tamaño de las proteínas aglutinantes (gran coeficiente de difusión).
- ▶ Aglutinación de los complejos Ix-Ag P-B mediante el Ac. Aquellas partículas que tengan lugares ocupados por aglutinantes podrán unirse a otras con lugares libres.

En un inmuno-ensayo turbidimétrico, la agregación provoca un cambio de la respuesta óptica del sistema debido a la reacción Ag-Ac. A esta variación es a lo que se denomina reactividad y la manera de calcularla es a lo que se llama "adaptación". La adaptación que se ha utilizado en esta Memoria es la final menos cero (f-c), que consiste en restarle a la absorbancia óptica de un determinado instante de tiempo la del "blanco". Se habla de "blanco" de reacción o de muestra cuando están presentes todos los elementos (látex, tampón, diluyente, etc..) excepto el aglutinante, que en estas condiciones de reacción se sustituye normalmente por H₂O. Sin embargo, en este trabajo no se utilizarán los valores experimentales de la reactividad, sino los que se obtienen a partir del ajuste hiperbólico de las curvas absorbancia-tiempo, tal y como se explicará en el apartado 5.4. No es necesario fijar un tiempo de medida, ya que el ajuste matemático suministra la respuesta asintótica del sistema (R_{max}).

En un inmuno-ensayo no sólo interesa conocer cual es la respuesta del sistema para distintas diluciones de agregante, sino también si el medio de reacción es el adecuado para que los complejos sean coloidalmente estables y la aglutinación específica. Por esta razón es necesario incluir sueros negativos de MNI o varias salinas, por lo que al final la mayor parte experimentos realizados constan de los siguientes elementos:

- ▶ Reactivo látex. Partículas de poliestireno sensibilizadas con antígeno de Paul-Bunnell, bloqueadas con albúmina bovina y diluidas en un tampón que en la mayor parte de los casos es el del método descrito en el apartado 5.2.

- ▶ Tampón de reacción. Las condiciones de pH y fuerza iónica deben ser las apropiadas para que no existan reacciones inespecíficas. Normalmente el tampón de reacción coincide con el resuspensión, como es el caso del reactivo para la detección de los anticuerpos heterófilos de Paul-Bunnell.
- ▶ Aglutinante. Diluciones de un suero positivo de mononucleosis infecciosa, que en la mayoría de los estudios es un suero humano de título 256 U.P-B/ml, diluido en un medio con NaCl 154 mM, 1g/l B.S.A y 1 g/l de NaN_3 . Esta solución recibe el nombre de salina.
- ▶ Salinas. Se emplean para conocer la absorbancia del blanco y la estabilidad coloidal de los complejos en el medio de reacción. Habitualmente se utilizan de 2 a 3 salinas por experimento.
- ▶ Sueros negativos de M.N.I. Son sueros que dan respuesta negativa por otras técnicas. Determinan la especificidad del ensayo. En la mayor parte de los experimentos se han utilizado 5 sueros provenientes de la mezcla de muestras negativas de M.N.I.

Después de medir las distintas muestras y evaluar la estabilidad coloidal y especificidad, se obtiene la denominada curva de respuesta (ver la figura 5.1-(a)), que consiste en una representación gráfica de la variación del incremento de absorbancia (eje Y) frente a la concentración de aglutinante (eje X).

5.4 Determinación del tamaño de partícula por turbidimetría

Existen varios métodos turbidimétricos (18-21) para determinar el diámetro de partícula de un sistema monodisperso, dentro de los cuales está la razón de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes. La principal ventaja de este método radica en que sólo depende del tamaño y no del número de partículas. En efecto, a partir de la expresión [2.23] o [2.26] se deduce que el cociente de absorbancias a dos λ_0 distintas es igual a la razón entre las secciones eficaces de dispersión. El cambio de la razón de absorbancias en función del diámetro es más elevado cuanto mayor sea la diferencia entre las dos λ_0 . En esta Memoria se utiliza el cociente a 340 y 600 nm, lo que permite cubrir un amplio rango de tamaños con un valor de la razón bien diferenciado.

Este método no suministra información (22) en los casos siguientes

- ▶ Para partículas muy grandes donde el factor de eficacia es constante (figura 4.3). Si $Q_{sca} \sim 2$ la razón de absorbancias tiende a hacerse igual a la unidad.
- ▶ Para partículas muy pequeñas donde el cociente de absorbancias es independiente del tamaño. En este caso se puede aplicar la teoría de Rayleigh (expresión [2.9]) y se comprueba que la razón es siempre igual a

$$\frac{\lambda_2^4 \left(\frac{n_1^2 - 1}{n_1^2 + 2} \right)^2}{\lambda_1^4 \left(\frac{n_2^2 - 1}{n_2^2 + 2} \right)^2} \quad [5.2]$$

donde λ_1 (340 nm), n_1 y λ_2 (600 nm), n_2 son la longitud de onda en el vacío y su índice de refracción relativo al medio correspondiente.

El diámetro medio de monómero o del complejo Ix-proteína, se calcula experimentalmente a partir de una curva patrón (figura 5.5), elaborada con la razón 340/600 de diferentes monómeros de poliestireno (tabla 5.4) de las casas IDC (International Dynamics Corporation) y Duke Scientific Corporation, partículas que están validadas por los métodos de la NIST (National Institute of Standards and Technology). Los diámetros de los calibradores se han determinado por microscopía electrónica. Interpolando el valor de la razón experimental en la curva se puede saber el tamaño aproximado de los monómeros o de los complejos Ix-Ag P-B.

Para reproducir que la curva experimental de la figura 5.5 mediante las teorías de dispersión de luz, y de esta manera comprobar su validez, hay que tener en cuenta que el índice de refracción del medio (n_m) y del poliestireno (n_e) varían con la longitud de la radiación incidente λ_0 , lo que afecta al valor de la sección eficaz de dispersión. Las expresiones analíticas que se han utilizado para calcular n_m y n_e en función de λ_0 son las de la ecuación [3.51], a partir de las cuales se obtiene que a 340 nm $n_m=1.3499$ y $n_e=1.6665$ ($m=1.235$), mientras que a 600 nm $n_m=1.3322$ y $n_e=1.5884$ ($m=1.192$). Introduciendo estos valores en las expresiones correspondientes se determina la sección eficaz de dispersión a 340 nm y 600 nm para cada una de las teorías.

| Diámetro ϕ (nm) | Fabricante |
|----------------------|------------|
| 50 \pm 2 | Duke |
| 60 \pm 3 | Duke |
| 73 \pm 2 | Duke |
| 96 \pm 3 | Duke |
| 102 \pm 3 | Duke |
| 126 \pm 3 | Duke |
| 144 \pm 6 | I.D.C |
| 204 \pm 6 | Duke |
| 220 \pm 6 | Duke |
| 240 \pm 6 | Duke |
| 308 \pm 10 | I.D.C |
| 488 \pm 8 | I.D.C |
| 519 \pm 5 | Duke |
| 683 \pm 12 | I.D.C |
| 802 \pm 6 | Duke |
| 1000 \pm 24 | I.D.C |

Tabla 5.4. Diámetros determinados por microscopía electrónica (T.E.M), de las partículas utilizadas en la curva experimental de la razón 340/600 (figura 5.5). Casas comerciales: IDC (International Dynamics Corporation) y Duke Scientific Corporation.

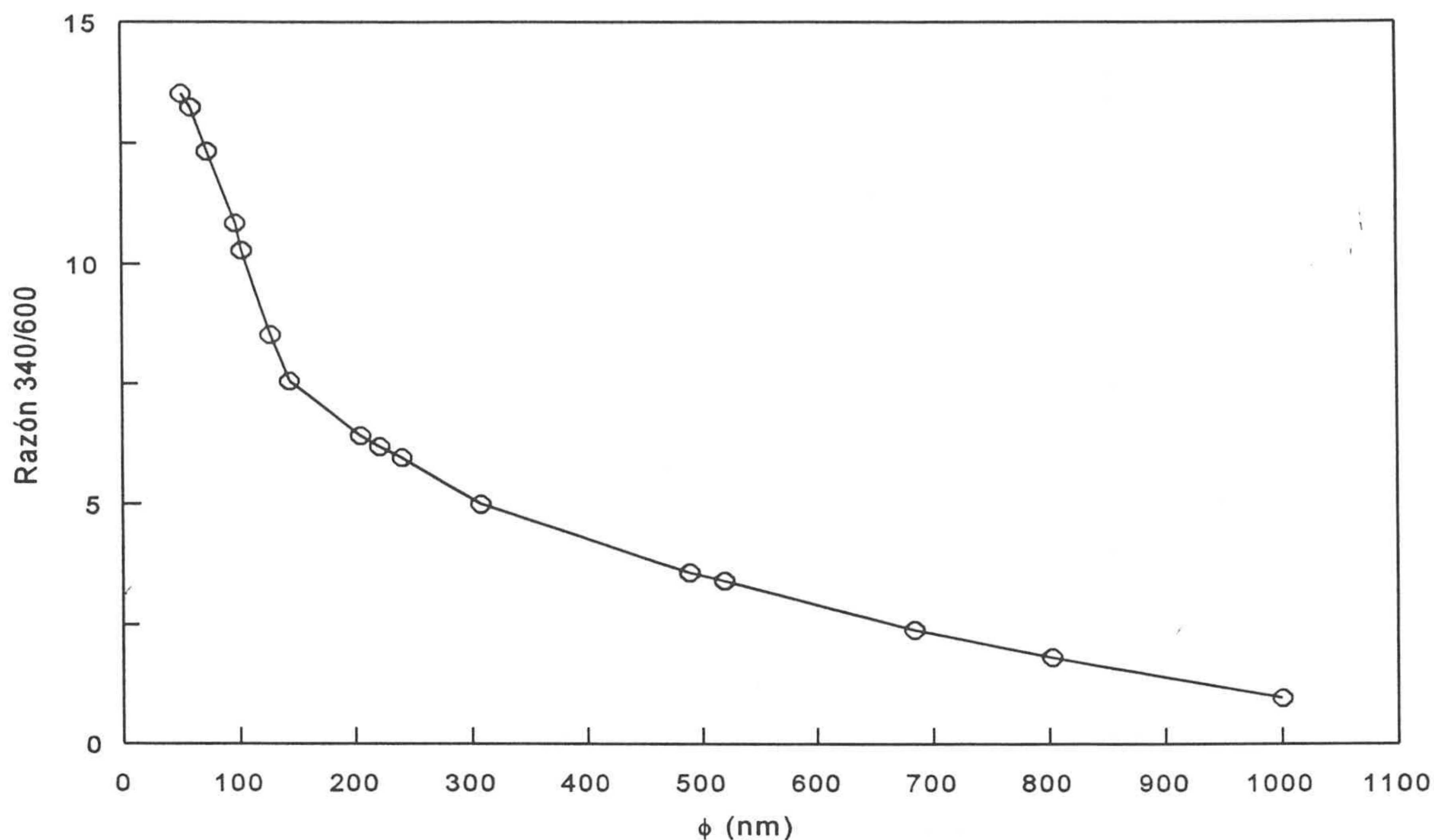


Figura 5.5. Cociente de absorbancias (Razón 340/600) experimental de las partículas (tabla 5.4).

En la figura 5.6 se presentan los resultados experimentales y teóricos (Rayleigh y RGD) de la razón 340/600. Los valores teóricos se han obtenido sustituyendo los índices de refracción n_m y n_e en la expresión [2.24]. La teoría de Rayleigh solo sirve para determinar el valor máximo que puede tener la razón (≈ 14.2), lo que se confirma por Rayleigh-Gans-Debye, donde además de las partículas de la tabla 5.4 se ha calculado la razón para dos monómeros muy pequeños, uno de 10 y otro de 20 nm, resultando el cociente de absorbancias de 14.3 y 14.2 respectivamente. La teoría RGD se ajusta a los datos experimentales hasta un valor de α alrededor de 5. En efecto, para partículas entre 308 y 488 nm, la sección eficaz de dispersión a 340 nm corresponde a un α entre 4 y 6, por lo que la RGD se encuentra fuera de su rango de validez (apartado 2.6). Por encima de $\alpha \approx 5.5$ hay que utilizar la teoría de Mie.

La figura 5.7 corresponde a los valores de la razón 340/600 para la teoría Mie. Esta gráfica confirma a nivel teórico los resultados experimentales, aunque existe una diferencia evidente para las partículas por debajo de 73 nm. La razón 340/600 con Mie se obtiene a partir de unas tablas elaboradas por Heller y Pangonis (23), donde la sección eficaz de dispersión para α pequeñas (< 0.4) es en la mayor parte de los casos diferente de las obtenidas con la teoría RGD. En la figura 5.5 se ha podido comprobar que la razón teórica 340/600 con diámetros inferiores a 73 nm se corresponde bastante bien con su valor experimental, por lo que las diferencias encontradas con la teoría de Mie se pueden asociar más a un problema "matemático" que a una discrepancia real.

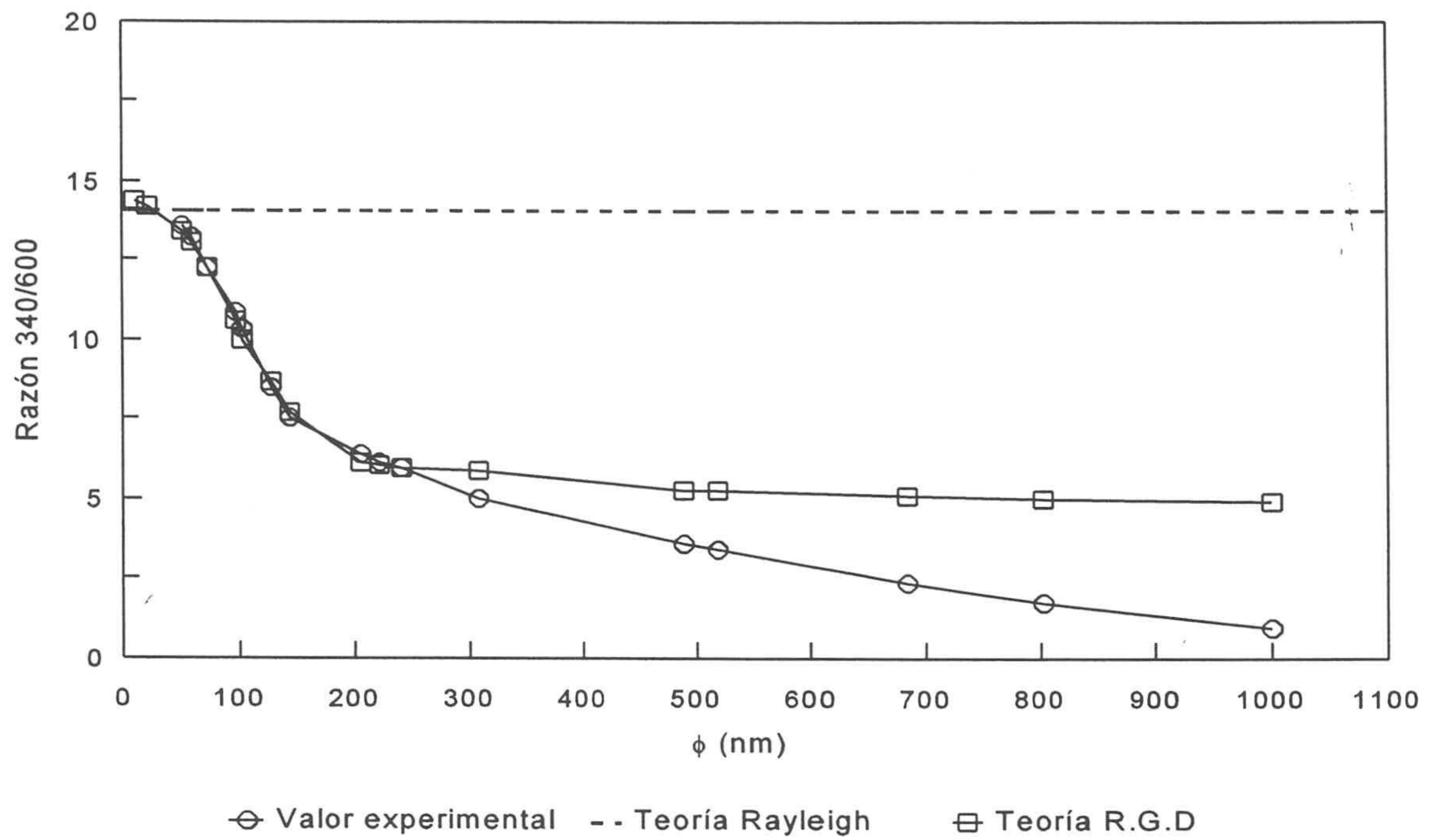


Figura 5.6. Comparación teórico-experimental de la razón 340/600. Teoría de Rayleigh y Rayleigh-Gans-Debye.

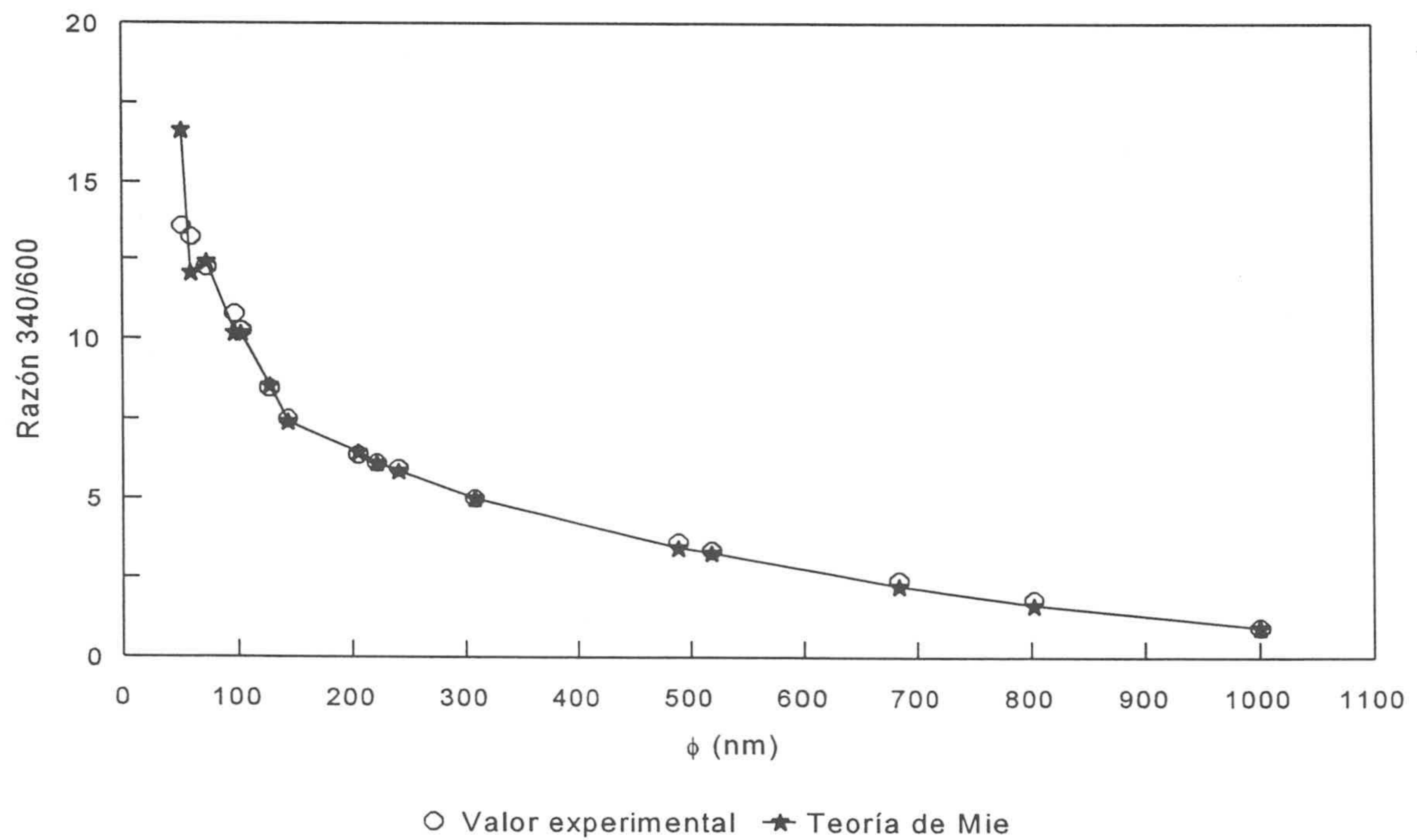


Figura 5.7. Comparación teórico-experimental de la razón 340/600. Teoría de Mie.

Casi todos los sistemas de medida de tamaños por dispersión de luz tienen como principal inconveniente estar diseñados para trabajar con muestras diluidas y monodispersas. Al utilizar cualquiera de estos métodos en un sistema polidisperso, siempre influirán más los agregados “grandes” que los “pequeños”, aunque estos últimos estén en mayor número que los primeros. El tamaño será tan solo un valor medio que no contempla el número de unidades individuales que componen el agregado. Por tanto, el cociente de absorbancias 340/600 puede servir, como cualquier otra técnica, para estudiar la evolución temporal de la agregación en un inmuno-ensayo de soporte coloidal. Además, como mayor ventaja sobre todos los demás, está el hecho de que en la turbidimetría el efecto de la dispersión múltiple es prácticamente nulo (24), lo que permite trabajar con una concentración de partículas relativamente elevada. Sin embargo y tal y como se verá en el capítulo 6, parece que la razón 340/600 sobrevalora algo más los agregados grandes, ya que los diámetros de los complejos son siempre más elevados que los que suministra la técnica PCS.

5.5. Ajuste matemático de la curva experimental absorbancia-tiempo

En un inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal, la variación del estado de agregación provocado por la aglutinación de las partículas se mide por el cambio de la turbidez o de la absorbancia óptica en un determinado periodo de tiempo. En la elección de este intervalo hay tener en cuenta que el sistema no evoluciona de la misma manera en todas las concentraciones de aglutinante; en unas la reacción es muy rápida y acaba pronto, mientras que en otra necesita de más tiempo para finalizar completamente. En unos casos habrá un exceso de información y en otros una falta. Además, sólo con el valor de la reactividad no es suficiente para distinguir varios sistemas entre sí. Por ejemplo, dos inmuno-ensayos pueden tener una respuesta similar con la misma muestra, pero con una evolución temporal diferente. Por consiguiente hay que buscar un modelo teórico que permita obtener no sólo el valor de la reactividad y de la velocidad inicial de reacción, sino que también que elimine la variable tiempo de medida, tal y como se ha hecho en otros reactivos (25- 28).

Para obtener un modelo teórico que relacione a la absorbancia óptica y el tiempo, hay que tener presente que

- La relación entre las dos variables es no lineal.

- ▶ Debido a las características del sistema de reacción, las curvas tienen un comportamiento creciente y asintótico.
- ▶ No existe una única ecuación que correlacione los dos parámetros.

Todo esto se pone de manifiesto en la tabla 5.5, donde se presentan algunos de los resultados realizados en el Monarch a una longitud de onda de 570 nm correspondientes a la partícula RP-130, con un recubrimiento de 34 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$ y un número de partículas de $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. En esta tabla, al igual que en la figura 5.7, se comprueba que el sistema tiene una evolución temporal diferente dependiendo de la cantidad de aglutinante. Con 256 y 128 U.P-B/ml la reacción es muy rápida al principio y el valor máximo de absorbancia se alcanza relativamente pronto, mientras que en las demás concentraciones el cambio es mucho más lento.

En el campo de la física y la química, la manera más habitual de analizar los resultados experimentales es mediante una regresión lineal y más concretamente utilizando el método de los mínimos cuadrados (29). A veces, si la relación entre las variables es no lineal, se puede conseguir que lo sea usando la función logaritmo por ejemplo. Ahora bien, estos arreglos sólo son aplicables en ciertos casos, ya que un cambio en los datos modifica también los errores asociados. El método de los mínimos cuadrados sólo se puede utilizar cuando la variable independiente x se ha medido sin error y la variable dependiente y es aleatoria. Esto último significa que la diferencia entre los valores observados y determinados por el ajuste (residuos) es aleatoria e independiente de la x y de la y (30), y que además la distribución gaussiana de los residuos tiene una media igual a cero. La desviación estándar S_{yx} de esta distribución debe ser constante para cualquier x . Si por el contrario la variable y tiene siempre el mismo error para todas y cada una de las x , S_{yx} será mayor a medida que aumente χ^2 con lo que método de los mínimos cuadrados queda invalidado. Por ejemplo, las curvas absorbancia-tiempo se pueden linealizar mediante una expresión logarítmica, pero para que el ajuste fuese correcto habría que utilizar un sistema de compensación de errores ("weighting analysis"), nunca el de mínimos cuadrados. Por esta razón se ha decidido usar los ajustes no lineales, ya que de esta forma no se distorsiona la distribución original de errores.

Las regresiones no lineales son conceptualmente lo mismo que las lineales; las diferencias entre el valor experimental y el calculado deben ser mínimas, pero en un caso el mejor ajuste es una curva, mientras que en el otro es un recta

| t(s) | 256 U.P-B/ml | 128 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml |
|------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0.7755 | 0.7755 | 0.7755 | 0.7755 | 0.7755 |
| 5 | 1.6469 | 1.4289 | 1.0448 | 0.8974 | 0.8503 |
| 10 | 1.7666 | 1.5771 | 1.2109 | 0.9808 | 0.8889 |
| 15 | 1.8325 | 1.6720 | 1.3119 | 1.0414 | 0.9124 |
| 20 | 1.8691 | 1.7390 | 1.3685 | 1.0875 | 0.9283 |
| 25 | 1.8958 | 1.7852 | 1.4153 | 1.1237 | 0.9397 |
| 30 | 1.9137 | 1.8196 | 1.4544 | 1.1529 | 0.9483 |
| 35 | 1.9264 | 1.8487 | 1.4887 | 1.1770 | 0.9550 |
| 40 | 1.9319 | 1.8628 | 1.5171 | 1.1971 | 0.9603 |
| 45 | 1.9367 | 1.8820 | 1.5442 | 1.2143 | 0.9648 |
| 50 | 1.9356 | 1.8917 | 1.5657 | 1.2290 | 0.9685 |
| 55 | 1.9427 | 1.8992 | 1.5866 | 1.2418 | 0.9716 |
| 60 | 1.9419 | 1.9084 | 1.6041 | 1.2531 | 0.9743 |
| 65 | 1.9438 | 1.9107 | 1.6193 | 1.2630 | 0.9766 |
| 70 | 1.9427 | 1.9144 | 1.6341 | 1.2719 | 0.9786 |
| 75 | 1.9407 | 1.9167 | 1.6476 | 1.2798 | 0.9804 |
| 80 | 1.9408 | 1.9211 | 1.6598 | 1.2870 | 0.9820 |
| 85 | 1.9383 | 1.9259 | 1.6706 | 1.2935 | 0.9835 |
| 90 | 1.9387 | 1.9257 | 1.6810 | 1.2994 | 0.9835 |
| 95 | 1.9351 | 1.9240 | 1.6892 | 1.3048 | 0.9850 |
| 100 | 1.9351 | 1.9246 | 1.6982 | 1.3097 | 0.9870 |

Tabla 5.5. Datos de absorbancia de la partícula RP-130. ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). Espectrofotómetro Monarch. Longitud de onda: 570 nm.

Para realizar una regresión no lineal de las curvas absorbancia-tiempo hay que tener en cuenta que:

- ▶ Es un método iterativo, lo que implica fijar unos valores iniciales de los parámetros de ajuste y realizar el número suficiente de iteraciones que aseguren el resultado final.
- ▶ La bondad del ajuste se determina a partir del valor de χ^2 (30),

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(y_i(\text{calculado}) - y_i(\text{experimental}))^2}{\sigma_i^2} \quad [5.3]$$

donde N es el número de observaciones, y_i la variable dependiente (absorbancia o reactividad) y σ_i^2 la desviación estándar de cada punto. El criterio para obtener el mejor ajuste es minimizar χ^2 . Para esto se realizan un número elevado de iteraciones (200), lo que garantiza el χ^2 más pequeño.

- ▶ La variable dependiente (tiempo) es exacta.

Para encontrar el mejor ajuste teórico de las curvas absorbancia-tiempo, se han probado varios modelos no lineales, como por ejemplo el exponencial y doble exponencial, el potencial, etc (26, 29, 31) de los cuales el hiperbólico es el ha dado mejores resultados, no sólo a nivel de ajuste, sino también de la información que se puede obtener. Permite calcular, además de la reactividad máxima del sistema (tiempo infinito), la velocidad inicial de la curva y el tiempo necesario para que la respuesta alcance la mitad de su valor máximo. Este modelo es el que utiliza la cinética enzimática (ecuación de Michaelis-Menten) (32, 33).

Modelo hiperbólico

En este modelo la ecuación absorbancia-tiempo viene dada por:

$$A = \frac{A_{\max}(t-t_0) + A_0C}{C + (t-t_0)} \quad [5.4]$$

donde A es la absorbancia óptica y t el tiempo en segundos. A_0 representa el valor de A para un tiempo de medida t_0 . En la mayoría de los casos A_0 corresponde a los cero segundos

(absorbancia del "blanco"), mientras que en otros se toma el valor a los 5s, ya que este es el primer dato que suministra el Monarch en cada una de las curvas. A_{\max} es el valor asintótico de A, mientras que C es un parámetro cuyo significado se verá más adelante.

Si en la ecuación [5.4] se resta A_0 en ambos miembros resulta:

$$R = \frac{R_{\max} (t-t_0)}{C + (t-t_0)} \quad [5.5]$$

siendo R la reactividad y R_{\max} el valor máximo (asintótico) de R. Esta expresión corresponde a una rama de una hipérbola (34), lo que da su nombre a este modelo. A partir de [5.5] se obtiene no sólo el valor de R_{\max} sino también la pendiente inicial V_0 de la curva de absorbancias. En efecto, derivando R respecto a t,

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_{\max} C}{(C + (t-t_0))^2} \quad [5.6]$$

de manera que,

$$t \rightarrow t_0 \Rightarrow \left(\frac{dA}{dt}\right)_{t_0} \approx \left(\frac{dR}{dt}\right)_{t_0} = \frac{R_{\max}}{C} = V_0 \quad [5.7]$$

Si en la ecuación [5.5] se iguala C a $(t-t_0)$, R es igual $R_{\max}/2$, de lo que se deduce que C es el tiempo necesario para que el sistema alcance la mitad de su valor máximo. El valor de C puede informar también sobre la mayor o menor velocidad del sistema (figura 5.7).

En la tabla 5.6 están recogidos los ajustes hiperbólicos correspondientes al experimento realizado con la partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ p/cm}^3$, 2-256 U.P-B/ml). Vease que en las concentraciones más elevadas (128 y 256 U.P-B/ml), la R_{\max} es próxima al valor experimental a los 100 s de medida (tabla 5.5), lo que indica que la reacción está prácticamente finalizada. Sin embargo en los otros tres casos (64, 32 y 16 U.P-B/ml), la reactividad máxima es superior a la experimental. Tal y como se comentaba anteriormente, el modelo hiperbólico permite obtener la máxima información de la curva absorbancia-tiempo.

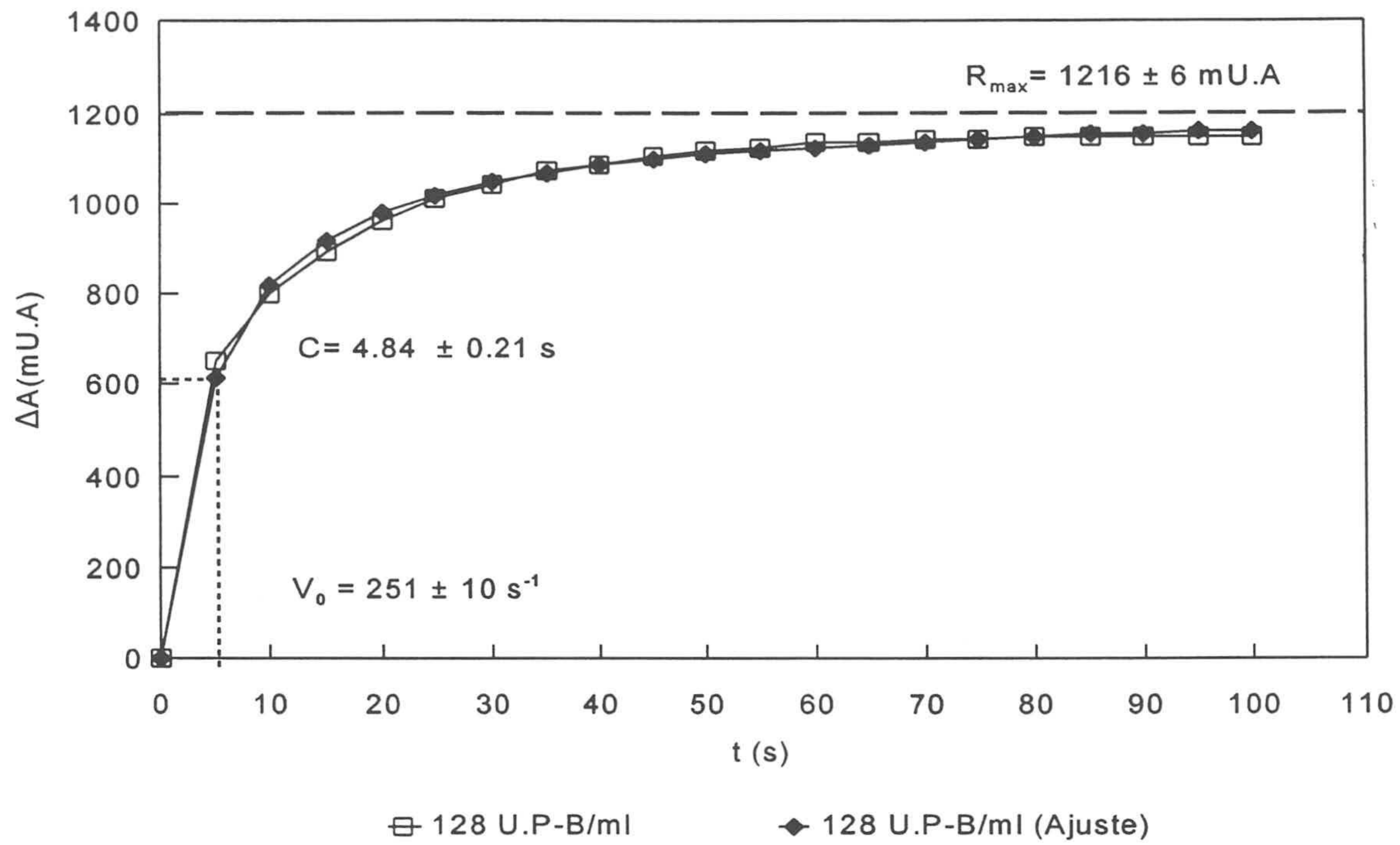


Figura 5.7. Parámetros del ajuste hiperbólico que definen una curva absorbancia-tiempo. Concentración de anticuerpo: 128 U.P-B/ml. RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$).

| U.P-B/ml | $R_{\max}(\text{mU.A})$ | $V_0(\text{mU.As}^{-1})$ | Nº Datos | χ^2 |
|----------|-------------------------|--------------------------|----------|---------------------|
| 2 | 11.8 ± 0.2 | 5 ± 1 | 13 | $2.4 \cdot 10^{-7}$ |
| 4 | 40.0 ± 0.3 | 10 ± 1 | 17 | $4.5 \cdot 10^{-7}$ |
| 8 | 90 ± 1 | 15 ± 1 | 21 | $1.9 \cdot 10^{-6}$ |
| 16 | 234 ± 2 | 22 ± 2 | 21 | $1.6 \cdot 10^{-5}$ |
| 32 | 650 ± 8 | 30 ± 4 | 21 | $1.6 \cdot 10^{-4}$ |
| 64 | 1047 ± 9 | 68 ± 2 | 21 | $7.5 \cdot 10^{-4}$ |
| 128 | 1216 ± 6 | 250 ± 10 | 19 | $1.6 \cdot 10^{-4}$ |
| 256 | 1209 ± 4 | 600 ± 20 | 14 | $5.0 \cdot 10^{-5}$ |

Tabla 5.6. Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ p/cm}^3$). Ajuste hiperbólico.

La figura 5.8 presenta algunas curvas de la tabla 5.5 junto con sus ajustes teóricos. Con el método hiperbólico es posible distinguir los sistemas no sólo por su reactividad máxima, sino también por V_0 o su constante C. Por ejemplo, tal y como se verá en el capítulo de resultados, las partículas RP-214 y SN9 tienen en ciertas condiciones la misma R_{max} pero con una evolución temporal diferente.

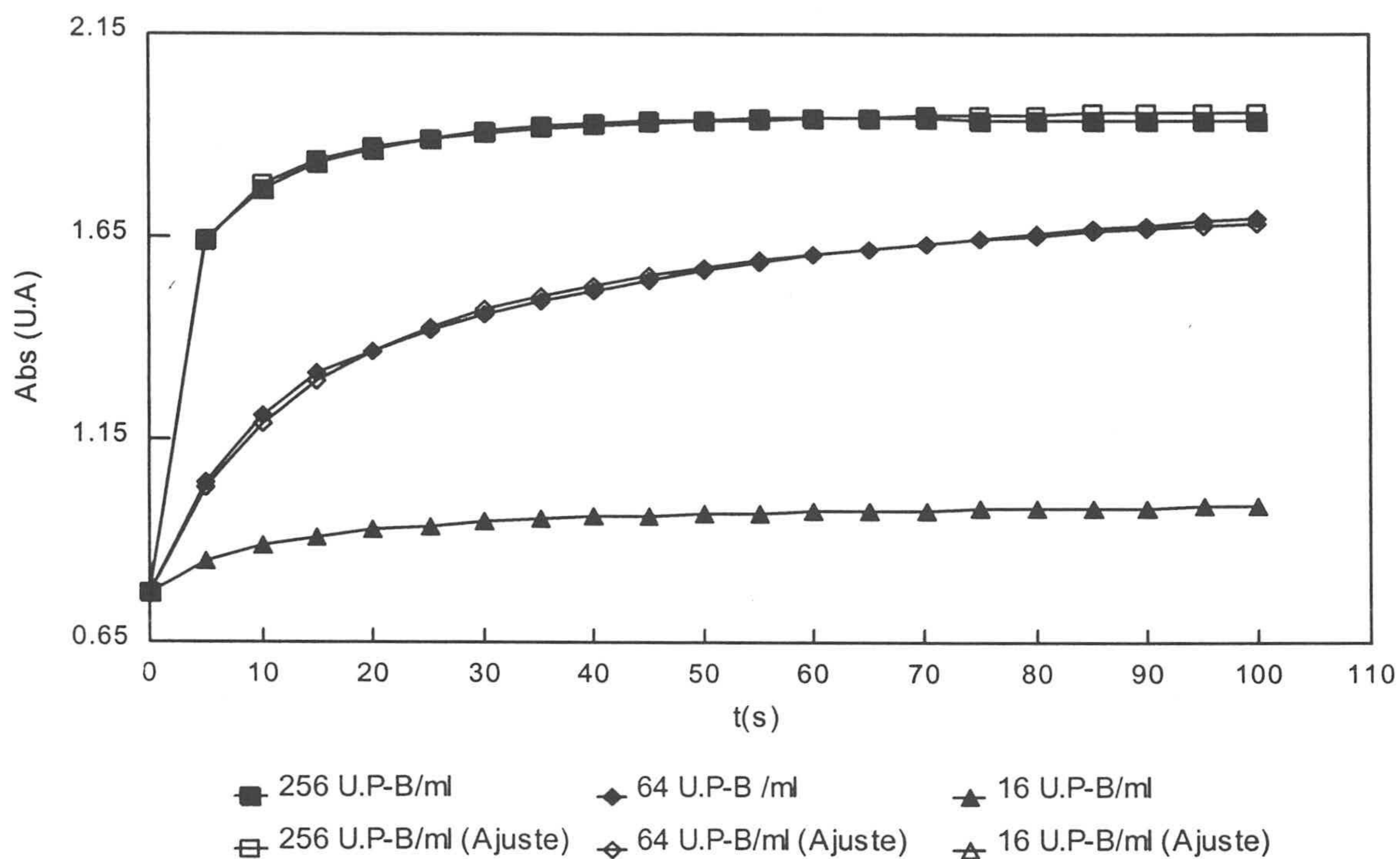


Figura 5.8. Ajuste hiperbólico (tabla 3.3). Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$).

Tras escoger el modelo hiperbólico para ajustar las curvas absorbancia-tiempo, es necesario realizar un estudio de repetitividad del sistema $[\text{Ix-Ag P-B}]-\text{Ac P-B}$, donde se evalúen tanto los resultados experimentales como los teóricos. Esta repetitividad es la que permite comparar las distintas medidas realizadas con muestras de igual concentración. También hay que establecer un criterio de elección del número de valores útiles para realizar el ajuste, así como un protocolo de rechazo o aceptación del mismo. Todos estos estudios se presentan a continuación.

5.5.1 Repetitividad. Criterios de aceptación de un ajuste

Para realizar un ajuste hiperbólico de una curva absorbancia-tiempo, han de cumplirse dos requisitos,

- ▶ La aglutinación del sistema [Ix-Ag]-Ac debe ser repetitiva con todas y cada una de las diluciones de anticuerpo.
- ▶ El número de puntos del ajuste han de ser los adecuados para obtener el mínimo χ^2 y unos valores de R_{\max} y V_0 lo más reales posibles.

Si cada valor de reactividad es igual a la media de varias determinaciones, la aceptación del ajuste se puede llevar a cabo mediante la prueba de la t de Student (35, 36). Esto no siempre es posible, ya que normalmente la respuesta para cada concentración de aglutinante proviene de una sola medida.

En los siguientes apartados se verá en primer lugar si el sistema [Ix-Ag]-Ac es repetitivo y después cuales son los criterios de aceptación o de rechazo de un ajuste, dependiendo de si la medida es el resultado de una o varias determinaciones.

Repetitividad

Para evaluar la repetitividad se utilizarán los datos correspondientes a un estudio de precisión realizado con el RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$) en el Monarch, a una concentración de partículas de $2.38 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, 340 nm de longitud de onda y un tiempo de medida de 385 s . De cada concentración (1-256 U.P-B/ml) se han medido 9 muestras provenientes de 3 diluciones diferentes (3 copas por dilución). La concentración de aglutinante que se ha escogido para estudiar la repetitividad y el criterio de aceptación del ajuste es la de 16 U.P-B/ml (tabla 5.7), ya que se trata de una dilución intermedia con una buena respuesta y que a 385 s no está totalmente agotada. A un tiempo de medida tan elevado la reacción puede haber finalizado, por exceso de aglutinante (256, 128 y 64 U.P-B/ml) o por falta del mismo (8, 4, 2, 1 U.P-B/ml).

En estadística existen varias formas de medir la dispersión de un grupo de valores alrededor de una media, aunque los más habituales son la desviación estándar (S.D) de muestra y el coeficiente de variación (CV (%)). La S.D se obtiene a partir de la curva de distribución normal y tiene una relación significativa con el área que se encuentra dentro de la curva. Por ejemplo, la superficie que representa la media $\pm 2 \text{ S.D}$ es el 95.45% del área

total. El C.V es el cociente entre la S.D y la media y se expresa en %. Relaciona la desviación estándar y el nivel al que se han hecho las medidas.

| Tiempo | 1º | 2º | 3º | 4º | 5º | 6º | 7º | 8º | 9º |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 1.3114 | 1.3114 | 1.3114 | 1.3104 | 1.3104 | 1.3104 | 1.3107 | 1.3107 | 1.3107 |
| 5 | 1.4251 | 1.4259 | 1.4239 | 1.4238 | 1.4263 | 1.4225 | 1.4222 | 1.4242 | 1.4085 |
| 25 | 1.5333 | 1.5358 | 1.5308 | 1.5357 | 1.5392 | 1.5302 | 1.5334 | 1.5326 | 1.5182 |
| 45 | 1.5991 | 1.5954 | 1.5905 | 1.5945 | 1.6000 | 1.5878 | 1.5908 | 1.5908 | 1.5778 |
| 65 | 1.6313 | 1.6363 | 1.6297 | 1.6336 | 1.6388 | 1.6280 | 1.6292 | 1.6310 | 1.6174 |
| 85 | 1.6607 | 1.6661 | 1.6604 | 1.6634 | 1.6706 | 1.6610 | 1.6639 | 1.6620 | 1.6470 |
| 105 | 1.6875 | 1.6864 | 1.6857 | 1.6829 | 1.6880 | 1.6842 | 1.6866 | 1.6849 | 1.6678 |
| 125 | 1.7023 | 1.7016 | 1.6998 | 1.7035 | 1.7050 | 1.7012 | 1.7024 | 1.7003 | 1.6828 |
| 145 | 1.7153 | 1.7176 | 1.7130 | 1.7183 | 1.7201 | 1.7198 | 1.7217 | 1.7195 | 1.6959 |
| 165 | 1.7281 | 1.7281 | 1.7277 | 1.7273 | 1.7208 | 1.7313 | 1.7332 | 1.7332 | 1.7080 |
| 185 | 1.7380 | 1.7392 | 1.7368 | 1.7380 | 1.7411 | 1.7448 | 1.7452 | 1.7448 | 1.7168 |
| 205 | 1.7498 | 1.7474 | 1.7433 | 1.7462 | 1.7482 | 1.7544 | 1.7532 | 1.7508 | 1.7248 |
| 225 | 1.7582 | 1.7540 | 1.7483 | 1.7556 | 1.7548 | 1.7611 | 1.7611 | 1.7611 | 1.7322 |
| 245 | 1.7601 | 1.7617 | 1.7555 | 1.7615 | 1.7611 | 1.7638 | 1.7638 | 1.7642 | 1.7395 |
| 265 | 1.7701 | 1.7689 | 1.7637 | 1.7651 | 1.7643 | 1.7689 | 1.7718 | 1.7701 | 1.7418 |
| 285 | 1.7729 | 1.7742 | 1.7686 | 1.7697 | 1.7713 | 1.7756 | 1.7760 | 1.7760 | 1.7508 |
| 305 | 1.7782 | 1.7791 | 1.7704 | 1.7754 | 1.7742 | 1.7787 | 1.7817 | 1.7783 | 1.7527 |
| 325 | 1.7793 | 1.7798 | 1.7724 | 1.7802 | 1.7800 | 1.7825 | 1.7842 | 1.7834 | 1.7553 |
| 345 | 1.7794 | 1.7838 | 1.7737 | 1.7878 | 1.7857 | 1.7863 | 1.7838 | 1.7859 | 1.7620 |
| 365 | 1.7836 | 1.7862 | 1.7739 | 1.7911 | 1.7876 | 1.7883 | 1.7861 | 1.7883 | 1.7649 |
| 385 | 1.7832 | 1.7877 | 1.7793 | 1.7914 | 1.7892 | 1.7907 | 1.7876 | 1.7903 | 1.7714 |

Tabla 5.7. Partícula RP-130 ($2.38 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). Instrumento: Monarch (340 nm de longitud de onda). Tiempo de medida: 385 s. Concentración de aglutinante: 16 U.P-B/ml.

Otra forma de evaluar la repetitividad es el error estándar EE. El valor medio de una serie de pruebas está probablemente más cerca del real que una única determinación. Por consiguiente la dispersión de la media es inferior a la que tiene un sólo valor y se expresa

como error estándar (EE) (35),

$$EE = \frac{S.D}{\sqrt{n}} \quad [5.8]$$

donde n es el número de medidas. La diferencia entre desviación estándar y error estándar radica en que la primera mide la desviación de las medidas respecto de la media, mientras que E.E expresa la dispersión de la propia media. El error estándar es por consiguiente menor que la desviación estándar.

En la tabla 5.8 se presentan los valores de la reactividad experimental a 385 s ($R_{exp}(385s)$) calculados mediante la adaptación final-cero, junto con los valores de S.D, C.V(%) y EE correspondientes al experimento de precisión descrito anteriormente (tabla 5.7). Los parámetros estadísticos indican que la respuesta del sistema con 16 U.P-B/ml es bastante repetitiva. Por ejemplo, una desviación estándar de 4 mU.A implica que un intervalo tan pequeño como 476 ± 12 mU.A ($12 = 3 \cdot S.D$), está el 99.74% de todas las medidas, mientras que un error estándar de 1.3 mU.A supone que el 67% de las medidas de nueve valores difieren menos de 1.3 mU.A de 476 mU.A. Este % se calcula determinando que porcentaje de la desviación estándar le corresponde al E.E.

| Medidas | R _{exp} (385 s) (mU.A) |
|---------------|---------------------------------|
| 1ª | 472 |
| 2ª | 477 |
| 3ª | 467 |
| 4ª | 481 |
| 5ª | 479 |
| 6ª | 480 |
| 7ª | 477 |
| 8ª | 480 |
| 9ª | 472 |
| Media | 476 |
| S.D | 4 |
| C.V(%) | 0.8 |
| E.E | 1.3 |

Tabla 5.8. Reactividad máxima experimental (385 s). Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $2.38 \cdot 10^{11} \text{cm}^{-3}$). Longitud de onda 340 nm (Monarch). Cantidad de aglutinante: 16 U.P-B/ml.

Aceptación de un ajuste. Varias medidas por determinación.

Dentro de este apartado se estudia el caso en que una medida provenga de la media de varias determinaciones. También se evalúa que efecto tiene el número de datos utilizados sobre el valor de R_{\max} . En este caso, el protocolo para aceptar o rechazar un ajuste es el siguiente:

- ▶ Con todos los puntos útiles de cada curva absorbancia-tiempo, realizar el ajuste teórico y obtener los correspondientes R_{\max} y V_0 . El χ^2 ha de ser mínimo. El número de valores elegidos y por tanto el tiempo de medida, t , dependen de la evolución temporal de la absorbancia. Se toman datos hasta que la absorbancia comienza a disminuir por falta de aglutinante o por haber llegado a su valor máximo.
- ▶ Calcular para cada curva la reactividad experimental ($R_{\text{exp}}(t)$) y la teórica ($R_{\text{teo}}(t)$) para el instante de medida t . La respuesta teórica se obtiene a partir de los valores de R_{\max} y V_0 (expresión [5.5] y [5.7]). Realizar la media de cada una de las $R_{\text{exp}}(t)$ y $R_{\text{teo}}(t)$.
- ▶ Comparar las dos reactividades medias, experimental y teórica, mediante la prueba de la t de Student. La diferencia entre ambas debe tener un nivel de probabilidad igual o superior al 5%.

Este protocolo permite obtener la máxima información de las curvas, ya que el resultado es siempre el óptimo independientemente del número de puntos y de la concentración de aglutinante.

La prueba de la t de Student es una manera de calcular la probabilidad de que distintas medias no provengan de la misma muestra. Esta diferencia se expresa en forma de nivel de probabilidad y los más usuales son 5%, denominado menudo significativo y 1% o altamente significativo. Existen tablas para muestras de varios tamaños (grados de libertad) y para niveles entre el 50 y el 1% (35, 36). Normalmente, en la mayor parte de los experimentos se exige un nivel de probabilidad del 5%, lo que significa que sólo en un 5% de los casos la diferencia entre las medias es significativa y no proceden de la misma muestra. Para calcular el valor de la t de Student se utiliza la siguiente fórmula

$$t = \frac{|R_{\text{teo}}(t) - R_{\text{exp}}(t)| \sqrt{(n)}}{S.D} \quad [5.9]$$

donde n es el número de determinaciones y S.D la desviación estándar de la cantidad comparada, o sea $R_{teo}(t)$

En la tabla 5.9 se presentan, para los datos del experimento de repetitividad de la tabla 5.7, los ajustes hiperbólicos de las nueve curvas absorbancia-tiempo utilizando diferente número de valores, 6, 11, 16 y 21 puntos, junto con su χ^2 , media, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y error estándar respectivamente. Las diferencias en el valor medio de χ^2 no son suficientes como para determinar cual de los ajustes, 6, 11, 16 o 21 es el mejor de todos. Sólo indica un cierto empeoramiento a medida que disminuye el número de puntos. Por esta razón se ha introducido la comparación mediante la t de Student entre la reactividad experimental y teórica.

| Medida | 6 puntos | | 11 puntos | | 16 puntos | | 21 puntos | |
|----------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|
| | R_{max} | χ^2 | R_{max} | χ^2 | R_{max} | χ^2 | R_{max} | χ^2 |
| 1 ^a | 405 | $2.56 \cdot 10^{-4}$ | 478 | $2.56 \cdot 10^{-4}$ | 505 | $2.27 \cdot 10^{-4}$ | 513 | $1.80 \cdot 10^{-4}$ |
| 2 ^a | 412 | $2.96 \cdot 10^{-4}$ | 478 | $2.51 \cdot 10^{-4}$ | 503 | $2.18 \cdot 10^{-4}$ | 514 | $1.82 \cdot 10^{-4}$ |
| 3 ^a | 406 | $2.98 \cdot 10^{-4}$ | 480 | $2.67 \cdot 10^{-4}$ | 500 | $2.10 \cdot 10^{-4}$ | 507 | $1.60 \cdot 10^{-4}$ |
| 4 ^a | 409 | $2.58 \cdot 10^{-4}$ | 479 | $2.47 \cdot 10^{-4}$ | 502 | $2.05 \cdot 10^{-4}$ | 515 | $1.86 \cdot 10^{-4}$ |
| 5 ^a | 417 | $2.81 \cdot 10^{-4}$ | 475 | $2.29 \cdot 10^{-4}$ | 498 | $1.99 \cdot 10^{-4}$ | 510 | $1.78 \cdot 10^{-4}$ |
| 6 ^a | 407 | $3.06 \cdot 10^{-4}$ | 492 | $3.00 \cdot 10^{-4}$ | 516 | $2.33 \cdot 10^{-4}$ | 523 | $1.80 \cdot 10^{-4}$ |
| 7 ^a | 407 | $2.82 \cdot 10^{-4}$ | 492 | $2.83 \cdot 10^{-4}$ | 514 | $2.21 \cdot 10^{-4}$ | 521 | $1.72 \cdot 10^{-4}$ |
| 8 ^a | 409 | $2.97 \cdot 10^{-4}$ | 489 | $3.00 \cdot 10^{-4}$ | 513 | $2.37 \cdot 10^{-4}$ | 522 | $1.82 \cdot 10^{-4}$ |
| 9 ^a | 411 | $2.45 \cdot 10^{-4}$ | 468 | $1.89 \cdot 10^{-4}$ | 487 | $1.57 \cdot 10^{-4}$ | 500 | $1.57 \cdot 10^{-4}$ |
| Media | 409 | $2.80 \cdot 10^{-4}$ | 481 | $2.58 \cdot 10^{-4}$ | 504 | $2.12 \cdot 10^{-4}$ | 514 | $1.75 \cdot 10^{-4}$ |
| S.D | 3.5 | - | 7.6 | - | 8.5 | - | 7.1 | - |
| CV(%) | 0.9 | - | 1.6 | - | 1.7 | - | 1.4 | - |
| EE | 1.2 | - | 2.5 | - | 2.8 | - | 2.4 | - |

Tabla 5.9. R_{max} y parámetros estadísticos de los ajustes a 6, 11, 16, 21 puntos. Partícula RP-130 ($2.38 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Concentración de aglutinante 16 U.P-B/ml.

En la tabla 5.10 se presentan los valores de $R_{teo}(t)$ en mU.A a los 385 s, calculada a partir de los parámetros R_{max} y V_0 de cada uno de los ajustes. Aplicando el criterio de aceptación definido anteriormente, sólo a 16 y 21 puntos se cumplirían todos los requisitos, ya que el valor de la t de Student (expresión [5.9]) para nueve determinaciones (8 grados de libertad) indica un nivel de probabilidad cercano al 5%. Con 11 y 6 no hay suficiente

información para definir la curva absorbancia-tiempo, lo que se puede ver claramente en la figura 5.9, donde está representada la curva experimental junto con sus diferentes ajustes. Esto es un comportamiento que se ha encontrado en la práctica, es decir, que el ajuste hiperbólico tiende a mejorar a medida que aumenta el número de datos, aunque no siempre es así, ya que depende de la concentración de aglutinante o del intervalo de tiempo entre los valores de las absorbancias. Esto se puede ver en las tablas del final del capítulo, donde en algunos casos ($1.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, 256 U.P-B/ml) basta con pocos puntos para definir el valor de R_{max} .

| Número de puntos | R _{exp} (385 s) (mU.A) | R _{max} (mU.A) | V ₀ (mU.As ⁻¹) | R _{teo} (385 s) (mU.A) | t de Student |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| 6 | 476 | 409±26 | 23±4 | 391±3 | 56.6 |
| 11 | 476 | 481±17 | 17±2 | 448±4 | 10.7 |
| 16 | 476 | 504±11 | 15±1 | 464±5 | 3.9 |
| 21 | 476 | 514±7 | 14±1 | 469±4 | 2.5 |

Tabla 5.10. Prueba t de Student. Comparación teórica experimental. Concentración de aglutinante 16 U.P-B/ml. Partícula RP-130 ($2.38 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, 34 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$).

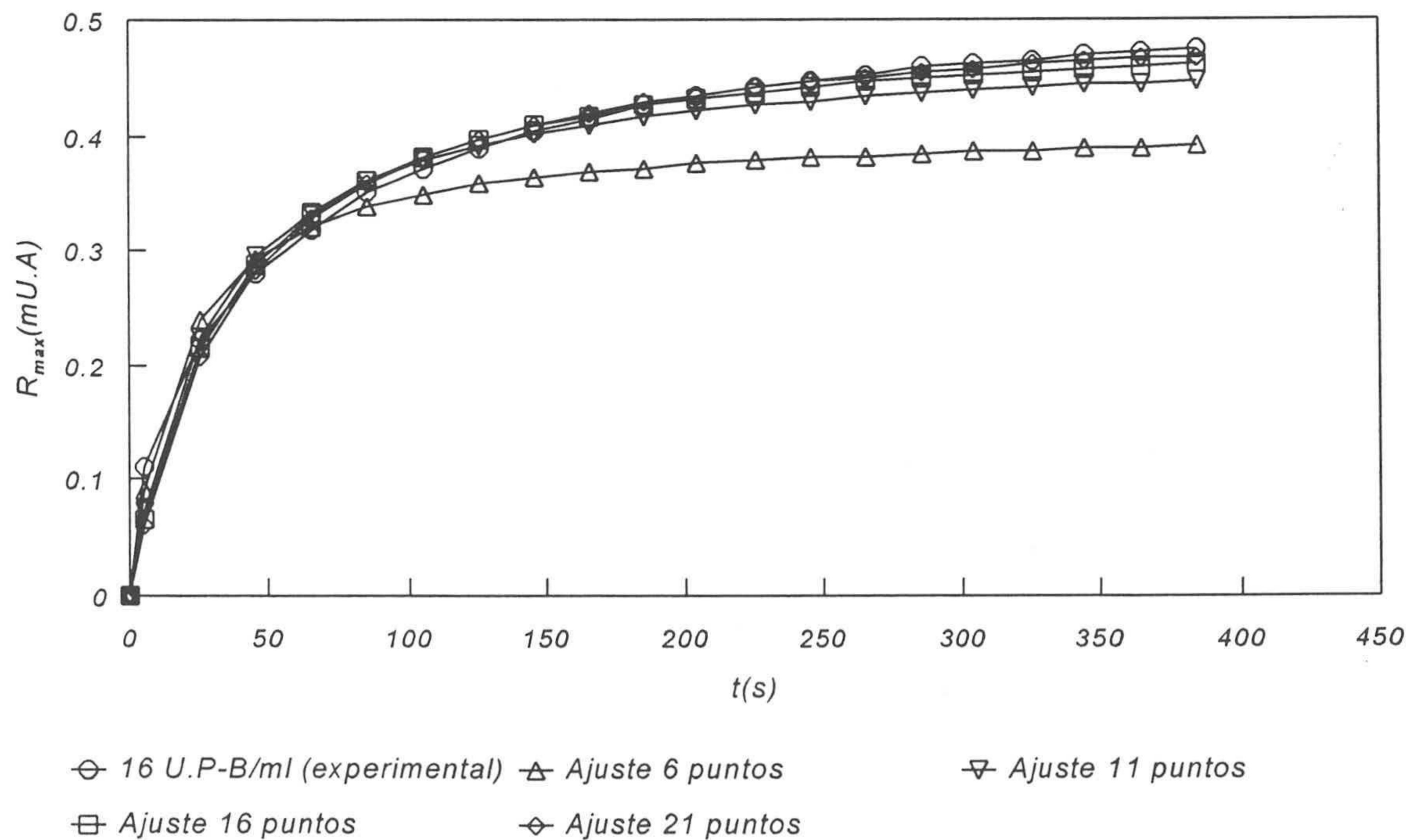


Figura 5.9. Curva experimental-teórica. Ajuste a diferente número de puntos. Partícula RP-130 ($2.38 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, 34 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). Aglutinante: 16 U.P-B/ml.

Todas las curvas absorbancia-tiempo de esta Memoria son de 21 puntos, contando con el valor de respuesta los cero segundos. Lo único que varía es el tiempo de medida y por tanto la separación entre los datos. A nivel experimental se ha comprobado que los ajustes mejoran cuanto menor sea el tiempo total de medida, lo que afecta principalmente a baja concentración de aglutinante. Al aumentar la proximidad temporal de las absorbancias, las curvas quedan mejor definidas y existe un descenso de la cantidad mínima detectada.

Aceptación de un ajuste. Una única determinación por medida

La mayor parte de los valores de reactividad provienen de una única determinación, por lo que ya no se puede utilizar la prueba t de Student para aceptar o rechazar un ajuste. Sin embargo, se ha establecido un protocolo que en líneas generales es similar al anterior:

- ▶ Realizar el ajuste teórico con todos los datos útiles de la curva absorbancia-tiempo, y obtener los valores de R_{\max} y V_0 correspondientes. El χ^2 debe ser lo más pequeño posible. El criterio de elección de los datos es igual que en el caso de varias determinaciones por medida.
- ▶ Calcular $R_{\text{exp}}(t)$ y $R_{\text{teo}}(t)$ para el tiempo de medida t . El tiempo t viene determinado por el número de puntos escogidos.
- ▶ Comparar las reactividades experimental y teórica. Un ajuste se acepta si $R_{\text{teo}}(t)$ está dentro del rango del $R_{\text{exp}}(t) \pm 3$ veces el error obtenido durante el ajuste hiperbólico. En este caso, el error de R_{\max} es el parámetro que se utiliza para aceptar o rechazar un ajuste.

Para ilustrar este protocolo, al final del capítulo se presentan los datos y ajustes hiperbólicos correspondientes a las curvas absorbancia-tiempo del estudio de variación del número de partículas con el RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) realizadas en el Monarch a una longitud de onda de 570 nm. Las concentraciones varían entre $2.9 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ y $1.43 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. En este caso se han podido obtener resultados desde 1 hasta 256 U.P-B/ml lo que ha permitido evaluar el criterio de aceptación del ajuste en todas las cantidades de aglutinante.

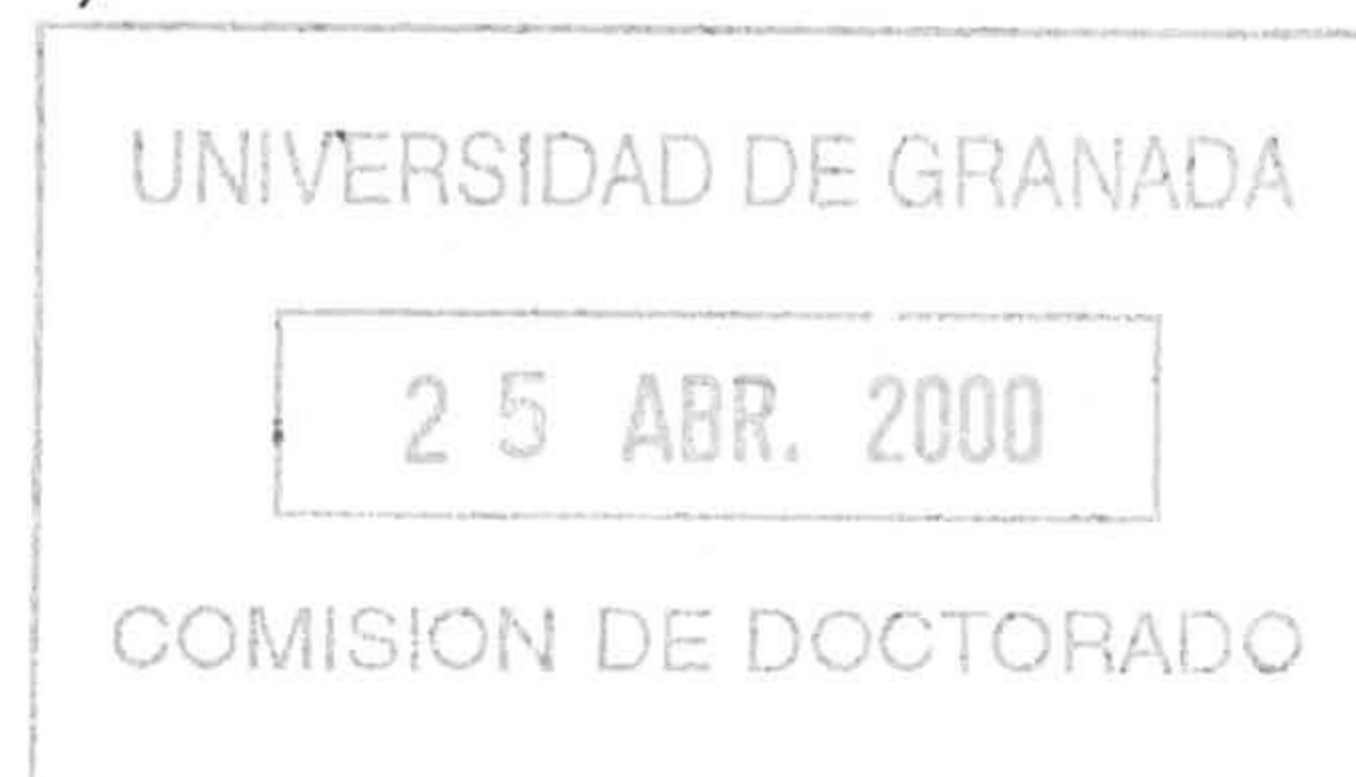
Para finalizar diremos que los resultados que se presentan en esta Memoria tienen un enfoque diferente al de los estudios habituales, ya que no se utilizan los datos experimentales de reactividad, sino los que se obtienen a partir de los ajustes matemáticos de las curvas absorbancia-tiempo. Por este motivo en todas las gráficas se consignará el número medio de datos computados por curva de respuesta, lo que da una idea de los puntos utilizados en cada concentración de aglutinante.

► Concentración de partículas: $1.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$.

| t(s) | U.P-B/ml | | | | | | | | |
|-------------------------|----------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| 0 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 | 2.0373 |
| 5 | 2.0576 | 2.0789 | 2.0949 | 2.1572 | 2.2688 | 2.4408 | 2.6449 | 2.7339 | 2.7753 |
| 10 | 2.0478 | 2.0746 | 2.0950 | 2.1711 | 2.3050 | 2.4989 | 2.6998 | 2.7667 | 2.7976 |
| 15 | 2.0501 | 2.0780 | 2.1115 | 2.2012 | 2.3586 | 2.5877 | 2.7709 | 2.8458 | 2.8509 |
| 20 | 2.0535 | 2.0887 | 2.1240 | 2.2142 | 2.3933 | 2.6169 | 2.7930 | 2.8259 | 2.8722 |
| 25 | 2.0550 | 2.0840 | 2.1219 | 2.2225 | 2.4191 | 2.6645 | 2.7974 | 2.8561 | 2.8660 |
| 30 | 2.0501 | 2.0788 | 2.1239 | 2.2349 | 2.4328 | 2.6997 | 2.8210 | 2.8407 | 2.8407 |
| 35 | 2.0501 | 2.0841 | 2.1298 | 2.2424 | 2.4489 | 2.7070 | 2.8407 | 2.8458 | 2.8458 |
| 40 | 2.0517 | 2.0895 | 2.1367 | 2.2476 | 2.4634 | 2.7338 | 2.8516 | 2.8614 | 2.8614 |
| 45 | 2.0533 | 2.0903 | 2.1346 | 2.2488 | 2.4829 | 2.7220 | 2.8306 | 2.8257 | 2.8457 |
| 50 | 2.0526 | 2.0895 | 2.1377 | 2.2593 | 2.4852 | 2.7666 | 2.8407 | 2.8509 | 2.8458 |
| 55 | 2.0518 | 2.0922 | 2.1388 | 2.2647 | 2.4920 | 2.7710 | 2.8510 | 2.8459 | 2.8358 |
| 60 | 2.0552 | 2.0905 | 2.1399 | 2.2688 | 2.5129 | 2.7797 | 2.8511 | 2.8260 | 2.8163 |
| 65 | 2.0527 | 2.0914 | 2.1408 | 2.2689 | 2.5225 | 2.7753 | 2.8259 | 2.8068 | 2.8358 |
| 70 | 2.0536 | 2.0905 | 2.1450 | 2.2716 | 2.5299 | 2.7798 | 2.8511 | 2.8164 | 2.8212 |
| 75 | 2.0494 | 2.0877 | 2.1428 | 2.2783 | 2.5249 | 2.7624 | 2.8115 | 2.7885 | 2.8022 |
| 80 | 2.0535 | 2.0932 | 2.1500 | 2.2854 | 2.5424 | 2.7841 | 2.8260 | 2.7976 | 2.7976 |
| 85 | 2.0535 | 2.0914 | 2.1521 | 2.2882 | 2.5632 | 2.7886 | 2.8211 | 2.7886 | 2.7841 |
| 90 | 2.0511 | 2.0905 | 2.1480 | 2.2868 | 2.5552 | 2.7797 | 2.8069 | 2.7710 | 2.7797 |
| 95 | 2.0536 | 2.0951 | 2.1563 | 2.2940 | 2.5686 | 2.7977 | 2.8069 | 2.7977 | 2.7977 |
| 100 | 2.0503 | 2.0879 | 2.1491 | 2.2897 | 2.5606 | 2.7754 | 2.7754 | 2.7626 | 2.7668 |
| t. Medida (s) | - | - | 70 | 100 | 100 | 60 | 40 | 40 | 20 |
| R _{max} (mU.A) | - | - | 118±3 | 270±5 | 569±11 | 802±17 | 841±12 | 855±20 | 858±16 |
| V ₀ (mU.A/s) | - | - | 14±2 | 28±3 | 50±6 | 125±16 | 390±50 | 692±167 | 958±234 |
| χ ² | - | - | 2.5·10 ⁻⁵ | 8.1·10 ⁻⁵ | 3.4·10 ⁻⁴ | 5.2·10 ⁻⁴ | 2.7·10 ⁻⁵ | 3.7·10 ⁻⁴ | 2.6·10 ⁻⁴ |
| R exp (t) | - | - | 112 | 252 | 523 | 742.4 | 819 | 824 | 835 |
| R teo (t) | - | - | 109 | 246.3 | 511 | 724.3 | 798 | 830 | 822 |
| Ajuste | NO | NO | SI | SI | SI | SI | SI | SI | SI |

5.6 Bibliografía

- (1) Hidalgo-Álvarez, R; Galisteo-Gonzalez, F. The Adsorption Characteristics of Immunoglobulins. *Heterogeneous Chem. Rev.*, 2, 249, (1995).
- (2) Bernard, A.M; Foidart, J.M; Mahieu, P.; Viau, C.; Lauwrys, R.R.. Detection of Anti-Laminin Antibodies in Sera by Latex Agglutination. *Clin. Chem.*, 32, 1468,(1986).
- (3) Baghi, P; Birnbaum, S. Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin G on anionic poly(vinyltoluene) model latex particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 83, 460, (1981).
- (4) Borque, L.A; Cambiaso, C.L; Masson, P.L. Immunoassay of Rheumatoid Factor by Latex Particle Counting. *Clin. Chem.*, 33, 704, (1987).
- (5) Dulm, P; Norde, W; Lyklema, J. *J. Colloid Interface. Sci.*, 82, 77, (1987).
- (6) Martín-Rodríguez, A; Cabrerizo-Vilchez, M .A; Hidalgo-Álvarez, R. A comparative study on the electrokinetic behaviour of bovine serum albumin molecules adsorbed onto different polymer colloids. *Colloids Surf. A*, 92, 113, (1994).
- (7) Shirahama, H; Suzawa, T. Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Styrene/2-Hydroxyethyl Methacrylate Copolymer Latices. *J. Colloid Interface. Sci.*, 104(2), 416, (1985).
- (8) Fukuzaki, S; Urano, H; Nagata, K. Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Metal Oxide Surfaces. *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 163, (1996).
- (9) Norde, W; MacRtchie, G; Nowicka, G; Lyklema, J. Protein Adsorption at Liquid-Interfaces: Reversibility and Conformation Aspects. *J. Colloid Interface Sci.*, 112(2), 447, (1986).
- (10) Norde, W; Lyklema, J. Biopolymer Adsorption, with Special Reference to the Serum Albumin-Polystyrene Latex System. *Croatia Chem. Acta.*, 45, 67, (1973).
- (11) Suzawa, T; Shirahama, H; Fujimoto, T. Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Polymer Latices. *J. Colloid Interface Sci.*, 86(1), 144, (1982).



-
- (12) Reisch C. H. Smoothing by spline functions. *Numer. Math*, 10, 177, (1967).
- (13) Reisch C. H. Smoothing by spline functions II. *Numer. Math*, 16, 451, (1971).
- (14) Doulah, M. S. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotech. Bioeng*; XIX, 649, (1977).
- (15) Fuchs, N. *Z. Phys.*, 89, 736, (1934).
- (16) Reerink, H; Overbeek, J.Th. G. *Disc. Faraday Soc.* 18, 74, (1954).
- (17) Stenberg, M; Nygren, H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J. Immunol. Meth.*, 113, 3, (1988).
- (18) Wallach, M. L; Heller, W. Theoretical investigations on the Light Scattering of Colloidal Spheres. XII. The Determination of Size Distribution Curves from Turbidity Spectra. *J. Chem. Phys*, 43, 1796, (1962).
- (19) Zollars, R. Turbidimetric Method for On-Line Determination of Latex Particle Number and Particle Size Distribution. *J. Colloid Interface Sci*; 74, 163, (1980).
- (20) Wales, M. Particle Size Distribution in Rubber Latex. *J. Phys Chem*; 66, 1768, (1962).
- (21) Yang, K. C; Hogg, R. Estimation of Size Distributions from Turbidimetric Measurements. *Analytical Chem*; 51, 758, (1979).
- (22) Kourti, T; Macgregor, J. F. Particle Size Determination Using Turbidimetry. Capabilities, Limitations, and Evaluation for On-Line Applications. *ACS Symposium Series*; 34, (1991).
- (23) Heller, W; Pangonis, W, J. Theoretical Investigations on the Light Scattering of Colloidal Spheres. I. The Specific Turbidity. *J. Chem Phys*; 26, 3, 498, (1957).
- (24) Kerker, M. *The Scatter of Light and Other Electromagnetic Radiation*. (Eds: Loebel, E. M). Academic Press, (1969).
- (25) Skoug, J. W; Pardue, H. L. Effects of reaction variables on nephelometric and turbidimetric responses for the immunochemical reaction of immunoglobulin G. *Clin. Chem*;

34/2, 300, (1988).

(26) Gill, A; Leathbarrow, R. J; Horare, M; Pollard-Knight, D. V; Lowe, P. A; Fortune, D. H. Analysis of kinetic data of antibody-antigen interaction from an optical biosensor by exponential curve fitting. *J. Biotech*; 48, 117,(1996).

(27) Rovati, G. E; Shrager, R; Nicosia, S; Munson, P. KINFIT II: A Nonlinear Least-Squares Program for Analysis of Kinetic Binding Data. *Molecular Pharmacology*; 50, 86, (1996).

(28) Edwards, P. R; Gill, A; Polard-Knight, D. V; Hoare, M; Buckle, P. E; Lowe, P. A; Leathbarrow, R. J. Kinetics of protein-protein interactions at the surface of an optical biosensor. *Anal. Chem*; 231, 210, (1995).

(29) Leathbarrow, R. J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends. Biochem. Sci*; 15, 455, (1990).

(30) Cornbleet, P. J; Gochman, N. Incorrect Least-Squares Regression Coefficients in Method-Comparison Analysis. *Clin. Chem*; 25/3, 432 (1979).

(31) Morton, T. A; Myszka, D. G; Chaiken, I. M. Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal. Biochem*; 227, 176, (1995).

(32) Hernández, A; Ruiz, M. T. An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics, Applications note*; 14, 227, (1998).

(33) Südi, J. How to derive flux control coefficients from the rate equations of classical enzyme kinetics. *Mathematical Biosciences*; 138, 45 (1996). Elsevier Science.

(34) Spiegel, M. R; Abellanas, L. Formulas y tablas de matemática aplicada. Ed McGraw-Hill. Madrid, 300, (1988).

(35) Barnett, R. N. Estadística en el laboratorio clínico. Aplicaciones al control de calidad y valores de referencia. Editorial Reverté, 22, (1983).

(36) Day, L. A; Underwood, L. A. Química Analítica Cuantitativa. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, 9, (1989).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Introducción

6.2 Parámetros propios del reactivo: adsorción del Ag P-B

6.3 Parámetros propios del reactivo: efecto del grado de recubrimiento en la inmuno-reactividad

6.4 Parámetros propios del reactivo: efecto del número inicial de partículas en la inmuno-reactividad

6.5 Parámetros ópticos: estudio de la inmuno-aglutinación a distinta longitud de onda

6.6 Parámetros del medio de reacción: interacción primaria y secundaria

6.7 Parámetros del medio de reacción: efecto del pH, naturaleza del electrolito y la fuerza iónica en la inmuno-reactividad

6.8 Cinética de reacción: obtención de la constante de formación de dímeros

6.9 Morfología de los agregados: obtención de la dimensión fractal

6.1 Introducción

Los resultados de esta Memoria se pueden dividir en dos grandes bloques, que son los siguientes:

Estudio de las variables que afectan la respuesta de un inmuno-ensayo

Existe un gran número de factores que modifican la cinética de aglutinación de un inmuno-diagnóstico de soporte coloidal. Se pueden distinguir tres grandes grupos:

- ▶ Parámetros propios del reactivo (apartados 6.2-6.4), como diámetro de partícula, grado de recubrimiento y concentración inicial de monómeros. Dentro de este apartado se estudian las isotermas de adsorción de las partículas RP-130, SN9 y RP-214 obtenidas con el método descrito en el apartado 5.2. Seguidamente, de todos los recubrimientos y para las tres partículas, se escogerá aquel que cumpla mejor los requisitos exigidos a un inmuno-ensayo, o sea, estabilidad coloidal, especificidad, máxima respuesta a baja concentración de aglutinante y rango de trabajo. Más tarde, con este recubrimiento y tras realizar un “barrido” en número de partículas, se obtendrán las condiciones óptimas del reactivo: tamaño inicial de monómero, cantidad de Ag unida y concentración de partículas. Los monómeros sensibilizados en estas condiciones son los que se utilizan en los siguientes experimentos.
- ▶ Parámetros ópticos (apartado 6.5), como la longitud de la onda de la radiación incidente (λ) y el ángulo de lectura. En este caso sólo se ha estudiado la variación de la reactividad con λ , para lo cual se presenta un experimento realizado con el RP-130 y el RP-214, en el que se mide la respuesta en distintos instantes de tiempo y a diferente longitud de onda (340-700 nm). Se comprueba que existen unas condiciones de tamaño de agregado y λ donde la reactividad es máxima. El ángulo de medida no varía en ningún caso, ya que la fuente de luz, la cubeta de reacción y el detector están en línea (ángulo cero).
- ▶ Parámetros del medio de reacción (apartados 6.6 y 6.7). Dentro de este grupo existe un gran número de variables que pueden afectar a la reactividad, como tensión superficial, presencia de aditivos, temperatura, etc, pero en esta Memoria sólo se ha evaluado el efecto del pH, de la naturaleza del electrolito y de la fuerza iónica. Para esto ha sido necesario llevar a cabo algunas modificaciones en el método de obtención de los complejos (apartado 5.2), con el fin de pasar toda la capacidad tamponadora al medio de reacción. Todo este estudio se ha llevado a cabo con el RP-130. Dentro de este apartado hay que tener en

cuenta que el cambio del pH, del electrolito y de la f.i, suponen una modificación de la viscosidad y del índice de refracción del medio, variables que también influyen en el valor de la respuesta y que por tanto es necesario analizar.

Esta clasificación no es excluyente, ya que algunos parámetros pueden pertenecer a dos categorías a un mismo tiempo. Por ejemplo, el tamaño de monómero, el índice de refracción y la concentración de partículas son también variables ópticas.

El efecto de estos parámetros se determina, excepto para la longitud de onda, a partir de los cambios de R_{\max} o de V_0 . La mayor ventaja sobre el método habitual, que utiliza los valores de la reactividad a un tiempo de medida fijo, es que el ajuste hiperbólico permite obtener la máxima información de la curva absorbancia-tiempo. Por otro lado, con el parámetro V_0 se puede comprobar la validez experimental del modelo teórico desarrollado en el capítulo 3.

Cinética de reacción y morfología de los agregados

A la hora de determinar qué mecanismo, difusión o reacción, controla la unión entre los complejos [I_x-Ag P-B]-Ac P-B, se han seguido dos métodos:

- ▶ Cinética de aglutinación (apartado 6.8). A partir de la variación de k_f con la viscosidad del medio de reacción, estudio a tiempo corto que se realiza a partir del modelo teórico expuesto en el capítulo 3, se puede saber cual es el mecanismo de agregación. Si k_f es inversamente proporcional a la viscosidad, el mecanismo de reacción es DLCA. En este caso se ha usado la partícula RP-214.
- ▶ Morfología de los agregados (apartado 6.9). Se trata de evaluar la formación de los agregados a tiempo largo, para lo cual se utiliza un método turbidimétrico que relaciona la variación de la absorbancia óptica a distinta longitud de onda, con la dimensión fractal d_f . También se ha estudiado el efecto de la cantidad y naturaleza del aglutinante sobre la dimensión fractal. Todo este experimento se ha realizado con el monómero RP-130.

Antes de pasar a describir todos estos resultados, sería interesante exponer, aunque fuese brevemente, los principales factores que modifican la adsorción de una proteína sobre un sorbente coloidal. El análisis de estos parámetros es muy útil a la hora de discutir las isotermas de adsorción o las diferencias entre las distintas partículas. Como punto de partida de este estudio, veamos cuales son las tres condiciones básicas (1) que deben cumplir los complejos látex-proteína de un inmuno-ensayo:

- ▶ La proteína ha de ser estable en la superficie de la partícula, sin que se desorba por un cambio de medio o al ser desplazada por otra proteína.
- ▶ Una alta estabilidad coloidal, tanto en el medio de resuspensión como en el de reacción.
- ▶ La agregación debe estar ocasionada única y exclusivamente por la presencia del Ag/Ac a determinar y no por proteínas no específicas.

Todo esto se puede conseguir con un método de sensibilización apropiado, aunque la elección de las condiciones de adsorción, a la que también se puede llamar fisisorción, no es una tarea fácil, ya que existe un gran número de factores que pueden afectar a las fuerzas de interacción entre el látex y la proteína (2-8). En la tabla 6.1 están recogidos algunos de los parámetros más utilizados como variables de sensibilización y bloqueo y su efecto, al menos en teoría, sobre las interacciones de origen electrostático e hidrofóbico, que son las que tienen una mayor relevancia en el proceso de fisisorción. En este caso se considera la adsorción sobre una partícula aniónica. A la hora de interpretar y utilizar los resultados de la tabla 6.1, hay que tener en cuenta que las particularidades del sistema látex-proteína pueden modificar la influencia de todos los parámetros en el proceso de fisisorción (9). Por ejemplo, en la tabla 6.1 no se ha descrito el efecto que tienen las características de la proteína, como tamaño (10, 11), factores estructurales (11-13), etc.

Fuerzas culombianas

Las interacciones electrostáticas se establecen entre los grupos cargados de la proteína y los de la superficie del sorbente. Este tipo de fuerzas están muy influenciadas por las condiciones del medio y en concreto por el pH, la fuerza iónica y la naturaleza de la sal.

En un gran número de sistemas látex-proteína (14-16) se ha encontrado que el máximo de adsorción aparece a baja fuerza iónica y con pH próximos al punto isoeléctrico de la proteína. En este pH, al estar compensadas las cargas positiva y negativa, la interacción culombiana intramolecular es atractiva lo que da lugar a proteínas con una mayor estructura globular (15, 17). Por esta razón, la cantidad adsorbida es mayor, ya que en primer lugar las moléculas son “más pequeñas” (ocupan menos espacio en la superficie) y además, al tener carga neta nula, las repulsiones laterales entre las mismas son mucho menores.

Ahora bien, en el p.i.e se produce también la denominada precipitación isoeléctrica, fenómeno en el que se basa una técnica muy utilizada para la purificación de proteínas (18). En estas condiciones, al no existir repulsión electrostática (carga neta nula) las proteínas

tienen un mínimo de solubilidad por lo que pueden estar agregadas (figura 6.1). Estos agregados se unirán al sorbente o prepitarán, lo que en ambos casos supone la aparición de un máximo. En el primero, la cantidad adsorbida es mayor ya que la proteína no se encuentra en forma monomérica sino en un estado de agregación superior. En el segundo caso, como los métodos habituales de análisis (BCA, método específico, etc) utilizan la centrifugación para separar las partículas de poliestireno de la proteína no unida, los precipitados de mayor tamaño pueden estar con las partículas y no en el sobrenadante. Esto daría lugar a una sobrevaloración de la cantidad adsorbida.

Las interacciones electrostáticas entre la proteína y la superficie de la partícula juegan un papel muy importante en el proceso de sensibilización, sobre todo a baja fuerza iónica. En este caso, las fuerzas coulombianas intervienen no sólo en la unión sino también en la aproximación de las moléculas a la interfase (19), independientemente del pH. Al aumentar la fuerza iónica, la proteína unida a pH próximos al punto isoeléctrico es menor, ya que disminuyen las interacciones coulombianas atractivas (molécula-molécula, molécula-superficie) por lo que la adsorción corresponderá básicamente a fuerzas de tipo hidrofóbico.

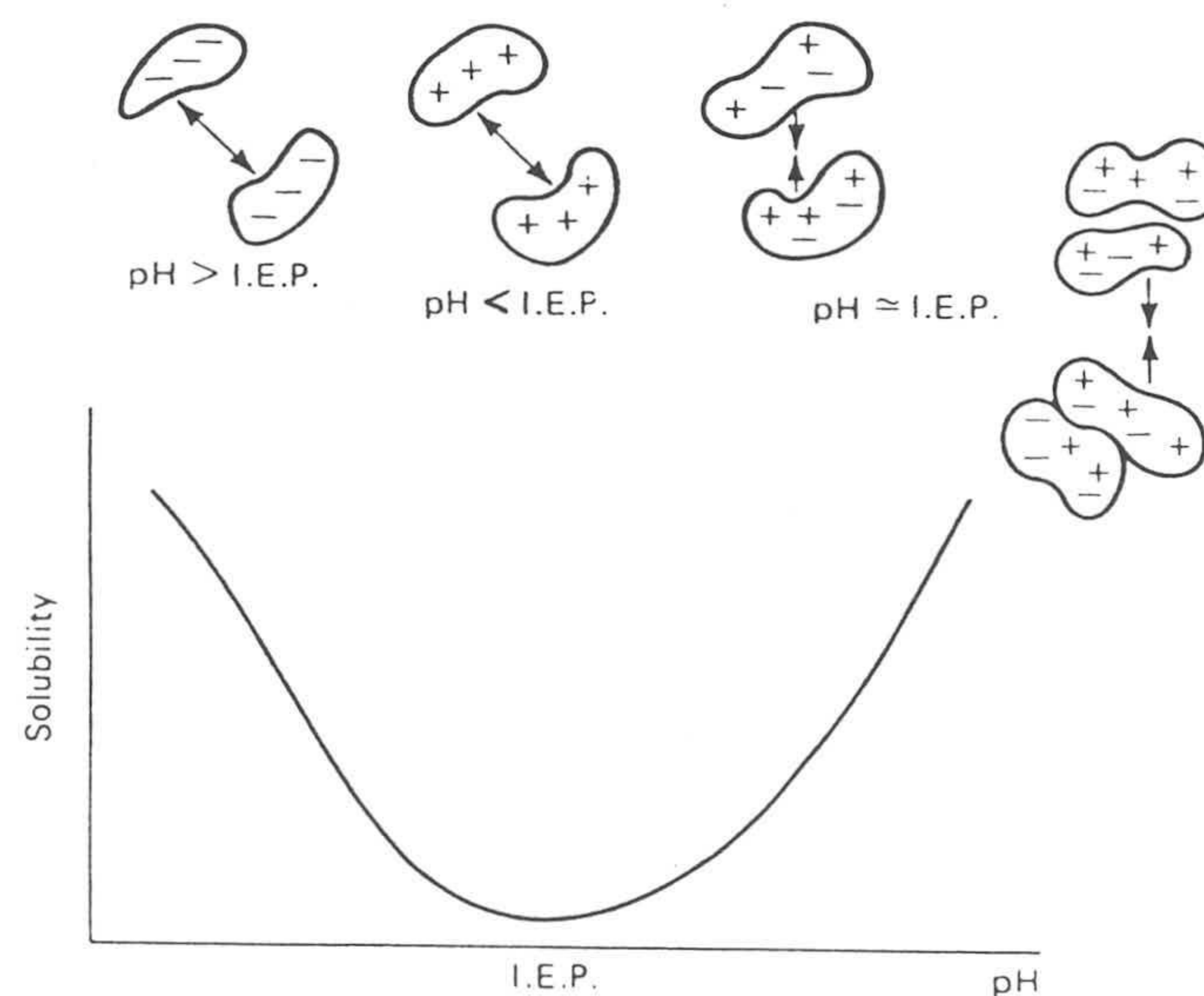


Figura 6.1. Solubilidad de una proteína tipo IgG cerca de su punto isoeléctrico.

Si el pH es superior o inferior al p.i.e, las proteínas son negativas o positivas respectivamente. En estos casos, la conformación es menos estable (16) de manera que las moléculas adsorbidas tienen más tendencia a la reestructuración (más superficie ocupada) y por tanto el grado de recubrimiento máximo es menor que en el p.i.e, sobre todo a baja f.i. Las proteínas pueden variar su estructura durante un largo periodo de tiempo (5) hasta optimizar su interacción con el sorbente.

Fuerzas hidrofóbicas

Proviene de la deshidratación hidrofóbica de las zonas de contacto entre la proteína y la superficie del sorbente. Esta interacción tiene una contribución muy elevada en el proceso de fisisorción, por lo que en la mayoría de los casos, las energías de enlace correspondientes a las demás fuerzas son prácticamente despreciables.

Cuando las proteínas son positivas (baja f.i y $\text{pH} < \text{p.i.e}$) o negativas (baja f.i y $\text{pH} > \text{p.i.e}$), las molecular tienden exponer sus partes hidrofílicas (grupos cargados) a la disolución, lo que perjudica a la interacción hidrofóbica con la superficie de la partícula. A alta fuerza iónica ocurre todo lo contrario y serán los grupos apolares (partes hidrófobas) las que se expondrán al medio.

| Condiciones del medio $\Downarrow \Rightarrow$ | CULOMBIANAS (> 100 Å) | | HIDROFÓBICAS (1.5-5 Å) | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| | Baja f.i | Alta f.i | Baja f.i | Alta f.i |
| $\text{pH} < \text{p.i.e}$ | \uparrow (atrac) | \downarrow (atrac) | \downarrow | $\uparrow \uparrow$ |
| $\text{pH} \approx \text{p.i.e}$ Las proteínas tienen carga neta nula. | *Máxima adsorción. Las moléculas tienen una mayor estabilidad estructural. *Precipitación isoeléctrica. Las proteínas | | $\uparrow \uparrow$ | $\uparrow \uparrow$ |
| $\text{pH} > \text{p.i.e}$ | \uparrow (repul) | \downarrow (repul) | \downarrow | $\uparrow \uparrow$ |
| Aumento de la densidad superficial de carga del látex | $\text{pH} < \text{p.i.e}$ | $\uparrow \uparrow$ (atrac) | \downarrow (atrac) | Depende del número de cargas de la partícula (superficie hidrofóbica libre) |
| | $\text{pH} > \text{p.i.e}$ | $\uparrow \uparrow$ (repul) | \downarrow (repul) | |
| Incremento del tiempo de residencia | - | - | $\uparrow \uparrow$ | $\uparrow \uparrow$ |

* p.i.e: punto isoeléctrico de las proteínas.

* f.i: fuerza iónica

* Atrac: fuerzas coulombianas atractivas.

* Repul: fuerzas coulombianas repulsivas.

Tabla 6.1. Parámetros que afectan a la adsorción de proteínas sobre una partícula aniónica. Interacciones coulombianas e hidrofóbicas.

6.2 Parámetros propios del reactivo: adsorción del Ag P-B

Las condiciones de sensibilización (apartado 5.2.1) son en principio apropiadas para la adsorción del Ag P-B. Con un pH mayor que el p.i.e de la proteína y una fuerza iónica relativamente elevada (tabla 6.1), la carga negativa de las moléculas ha de estar apantallada (disminución de la repulsión electrostática) y las interacciones hidrofóbicas con la superficie deben ser favorables. Por otro lado, aunque las condiciones de unión de la BSA (bloqueo) sean algo menos propicias que las de sensibilización, puede que exista un desplazamiento del Ag P-B por parte de la albúmina, fenómeno que recibe el nombre de desorción. Para determinar si puede ocurrir con el método de bloqueo empleado en la obtención de los complejos Ix-Ag P-B (apartado 5.2.2), es necesario analizar todos los factores que afectan a la desorción en un proceso de adsorción secuencial (20), que son los siguientes

- ▶Tiempo de residencia. Es el tiempo que la primera proteína está adsorbida en la superficie de la partícula antes de añadir la de bloqueo. Cuanto mayor sea este tiempo, más fuertes son los enlaces de las moléculas con el sorbente, lo que dificulta la desorción (21). En el método de sensibilización que se ha utilizado, el tiempo de residencia es más que suficiente como para que se adsorba el Ag P-B.

- ▶Condiciones del medio de sensibilización y bloqueo. El medio de adsorción (pH, f.i) de la primera proteína, determina en gran parte la estabilidad energética de los enlaces de las moléculas adsorbidas y por tanto el efecto de las condiciones de bloqueo. Con el método utilizado, el pH de adsorción del Ag P-B es más favorable que el de la BSA, por la mayor proximidad a su punto isoeléctrico. La fuerza iónica es elevada en ambos casos, lo que favorece la fisisorción por el apantallamiento de la carga superficial de las moléculas de proteína.

- ▶Concentración de la 2ª proteína. El desplazamiento de las moléculas preadsorbidas es mayor a medida que aumenta la concentración de la 2ª proteína. En el método que se ha empleado para obtener los complejos Ix-Ag P-B, la cantidad de BSA añadida es siempre muy superior a la de Ag P-B.

- ▶Grado de ocupación. La cantidad de proteína desorbida aumenta a medida que lo hace el recubrimiento inicial de las partículas (20). Tal y como se verá en las isotermas de adsorción, la cantidad unida de Ag P-B es muy baja si se compara con la BSA añadida.

De todo esto no se puede concluir a priori si la BSA desorbe o no al Ag P-B, ya que las condiciones de sensibilización y bloqueo son en unos casos favorables para la desorción

y en otros no. Sin embargo, no se ha encontrado Ag P-B libre en ninguno de los reactivos elaborados, por lo que se considera al método (apartado 5.2) apropiado para la adsorción del Ag P-B y el bloqueo con albúmina.

Se han utilizado dos sistemas para determinar la cantidad de Ag P-B unida, el BCA y el específico (apartado 5.2.3). Con el primero es necesario sacar una muestra antes de bloquear, mientras que en el otro caso se utiliza el sobrenadante de la primera centrifugación. Las isotermas de adsorción de las tres partículas se han obtenido con el método BCA, mientras que en el resto de los experimentos se ha utilizado el específico.

Hay que destacar que todas las partículas empleadas en este capítulo como en los siguientes han sido previamente lavadas, el RP-130 y RP-214 mediante resinas intercambiadoras de iones, y el SN9 con dos ciclos de centrifugación y un desplazamiento de suero (apartado 4.2.1.4).

6.2.1 Isotermas de adsorción. Partícula RP-130, SN9 y RP-214

La isoterma es una representación gráfica del rendimiento que tiene un protocolo de sensibilización, donde se compara la cantidad unida ($\mu\text{g}/\text{m}^2\text{lx}$) con la que debería haberse adsorbido teóricamente (figuras 6.2-6.4). En la mayor parte de los casos, las isotermas de adsorción con partículas de poliestireno son de alta afinidad, por lo que en un rango de concentración toda la proteína añadida se une. La afinidad de la proteína por la superficie del monómero viene determinada por la pendiente de la parte inicial de la curva (4), y es máxima cuando tiende a 1.

Si toda la superficie de la partícula está cubierta de proteína (monocapa), las moléculas que llegan después no se adsorben o lo hacen en unas condiciones energéticamente desfavorables (22). Se entra en el denominado "plateau de adsorción" de la isoterma, donde un incremento de proteína en el medio no implica más unión.

6.2.1.1 Partícula RP-130

Se trata de un monómero de poliestireno de un tamaño aproximado de 130 nm (T.E.M) con grupos superficiales sulfato ($-\text{SO}_4^-$) y una carga superficial alrededor de los

$-8.7 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. La determinación del Ag P-B unido se ha realizado con el método B.C.A y la isoterma de adsorción es la de la figura 6.2. Esta isoterma indica poca afinidad por la superficie de la partícula, de forma que las cantidades adsorbidas son relativamente bajas y además no se alcanza un "plateau" de adsorción bien definido. La densidad superficial de carga del monómero parece ser la responsable de este comportamiento, ya que el RP-214 tiene la misma síntesis pero adsorbe mucha mayor cantidad de Ag P-B.

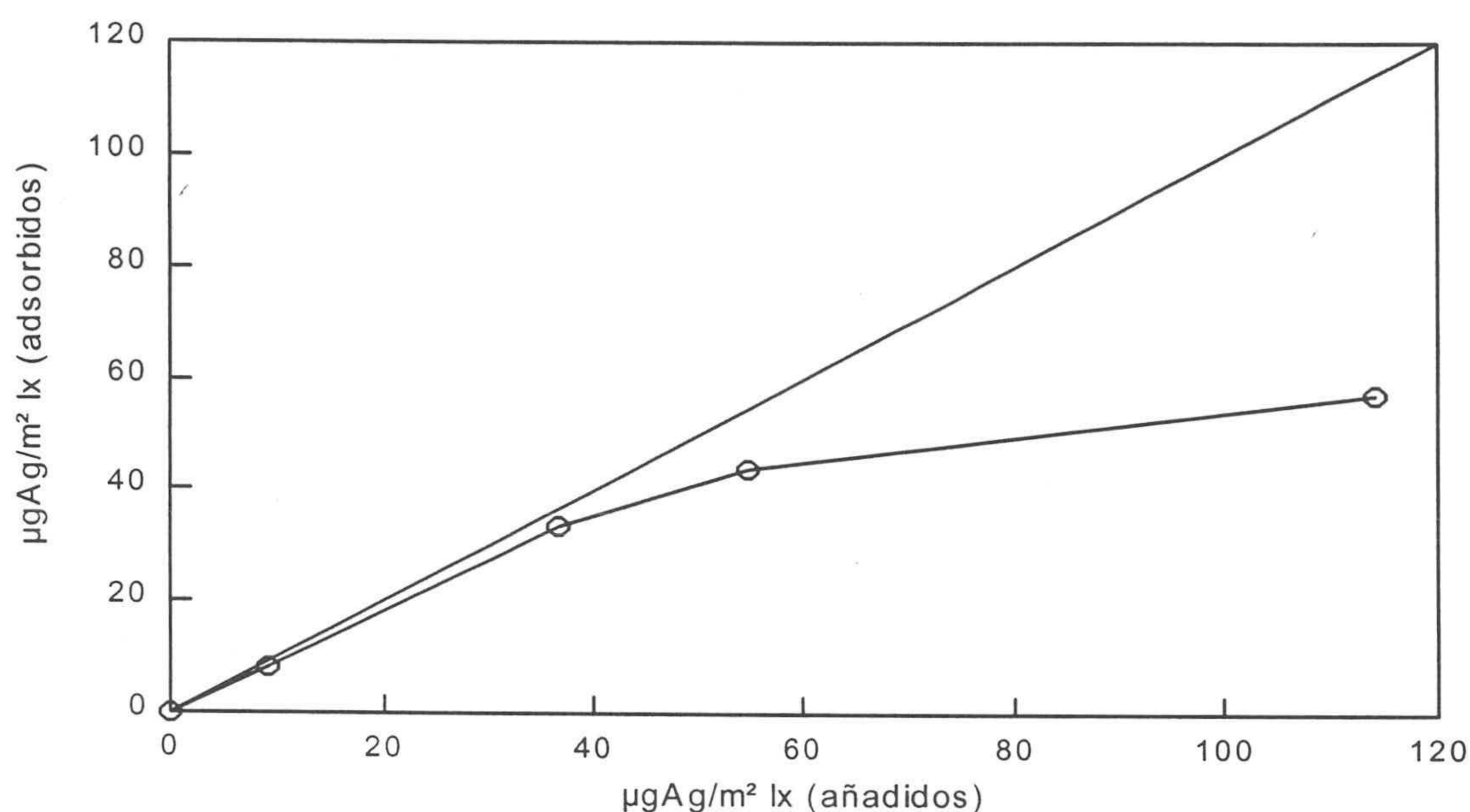


Figura 6.2. Isoterma de adsorción del RP-130. Método BCA.

6.2.1.2 Partícula SN9

Es un látex con un tamaño aproximado de 195 nm (T.E.M) y una carga superficial alrededor de los $-14 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Los grupos superficiales son sulfato y sulfonato ($-\text{SO}_3^{2-}$). La gráfica 6.3 muestra la isoterma correspondiente a la fisisorción del Ag P-B sobre la partícula SN9. El método de determinación del antígeno libre es el B.C.A. La cantidad unida es inferior a la del RP-130 (figura 6.2) y a la del RP-214 (figura 6.4), lo que puede estar debido a su mayor carga superficial y también a que tiene una síntesis diferente. Todo esto se estudiará con más detalle en el apartado 6.2.1.4 y cuando se presenten los resultados de inmunorrespuesta correspondientes a la partícula SN9 recogidos en el apartado 6.3.3.

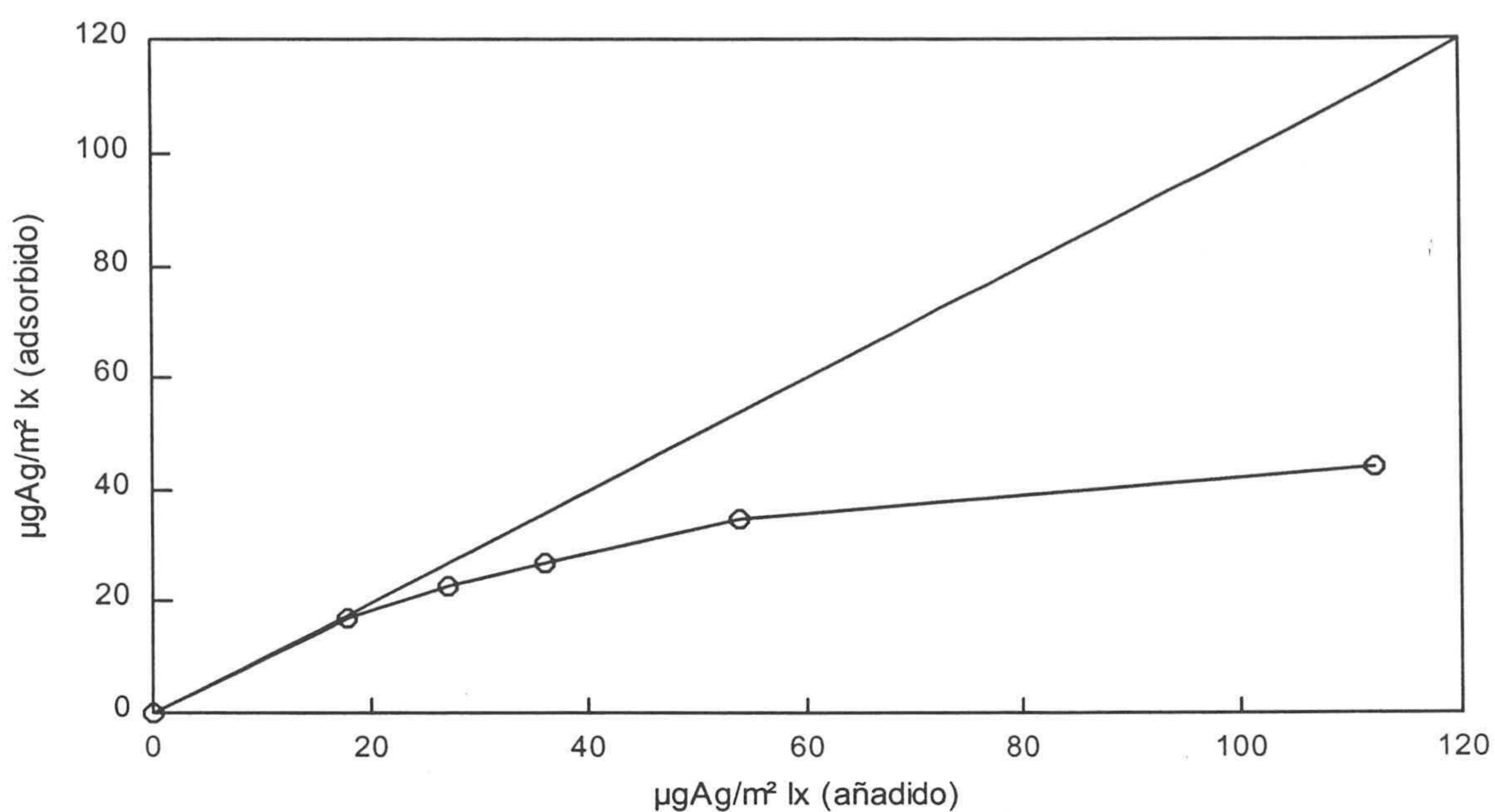


Figura 6.3. Isotherma de adsorción de la partícula SN9. Método BCA.

6.2.1.3 Partícula RP-214

Es una partícula de poliestireno obtenida mediante polimerización en emulsión, con un tamaño de 214 nm (T.E.M). Es la que tiene menor densidad de carga ($-3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$) y sus grupos superficiales son sulfato ($-\text{SO}_4^-$). El método de determinación de proteína es el B.C.A. La figura 6.4 muestra la isoterma correspondiente a la adsorción del Ag P-B sobre el monómero RP-214.

La fisisorción de Ag P-B (figura 6.4) es mayor que en las otras dos partículas (menor carga superficial), pero al estudiar las curvas de reactividad, se verá que por encima de $50 \mu\text{g Ag}/\text{m}^2\text{lx}$ la respuesta específica de los complejos frente al Ac P-B no aumenta proporcionalmente con el recubrimiento, sino que incluso baja. Este descenso parece estar asociado a la manera en que el Ac P-B reacciona con el Ag P-B y a la conformación que adquiere esta unión.

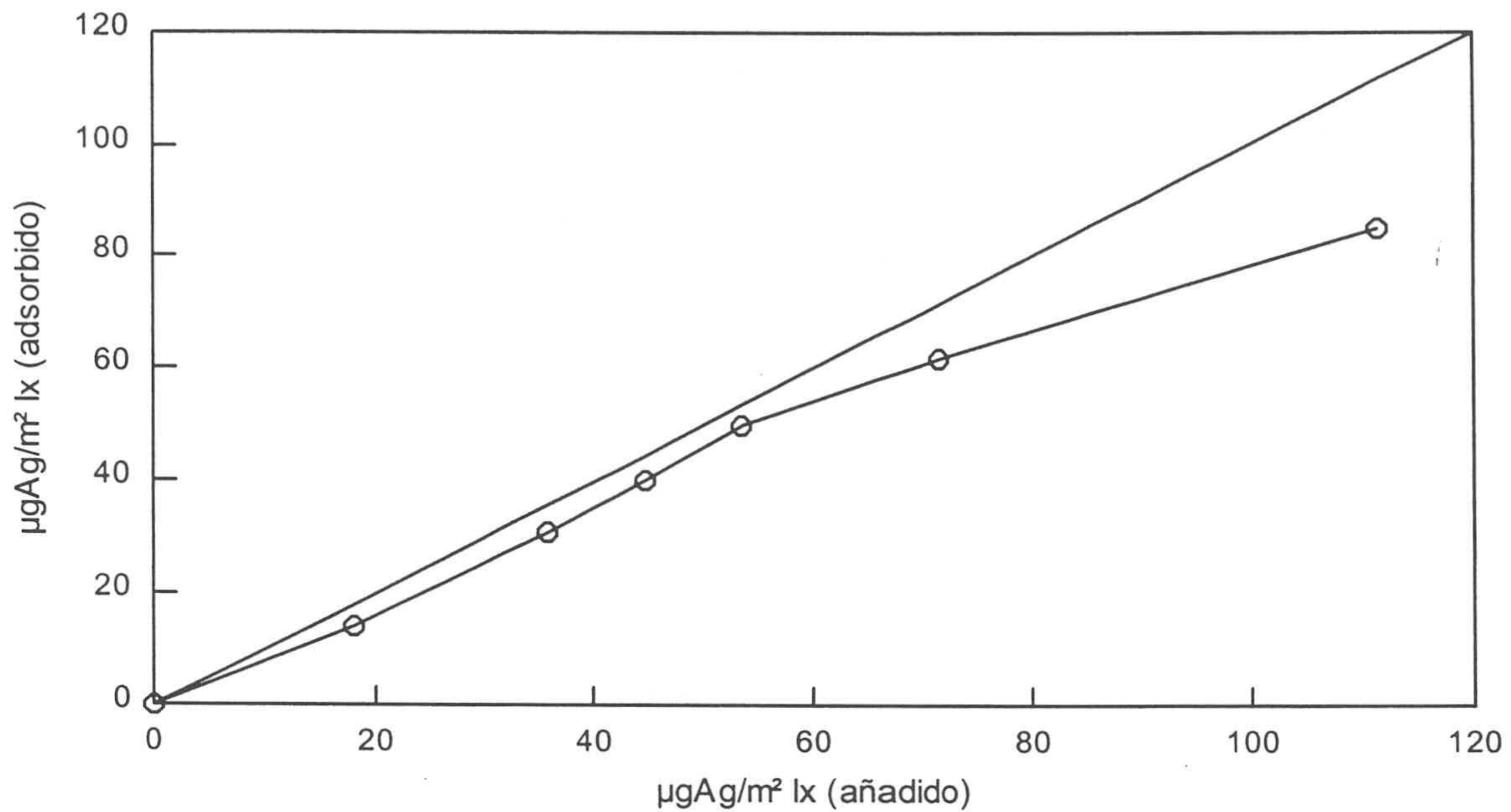


Figura 6.4. Isoterma de adsorção. Partícula RP-214.

6.2.1.4. Análisis comparativo de las partículas RP-130, SN9 y RP-214

Como las condiciones de adsorción son las mismas para los tres látex, factores tales como la superficie de sensibilización o el número de partículas no pueden justificar completamente las diferencias de comportamiento que se han encontrado. Hay que analizar si las características propias de cada partícula pueden ser las responsables.

Densidad superficial de carga

La carga superficial de la partícula afecta en los casos siguientes:

► La carga de la proteína y de la partícula son elevadas y opuestas, lo que normalmente sucede cuando el pH está por encima del p.i.e de la proteína y a baja fuerza iónica (tabla 6.1). Ahora bien, en las condiciones de sensibilización, la f.i es de 0.123, concentración iónica que en otros sistemas es más que suficiente como para apantallar la carga de la proteína (23). Sin embargo, en el caso del Ag P-B, a esa fuerza iónica continúan existiendo interacciones electrostáticas de carácter repulsivo entre las moléculas de proteína y la

superficie del látex, ya que la afinidad del Ag P-B aumenta a medida que disminuye la carga superficial de los monómeros (tabla 4.3), tal y como indican las isotermas de adsorción. Entre el SN9 y el RP-214 es más evidente (figuras 6.3 y 6.4), ya que son dos partículas con un tamaño similar, pero con una gran diferencia en la densidad de carga (~ 5 veces).

► La partícula tiene una carga superficial elevada, con lo que puede que no exista suficiente superficie hidrofóbica libre para la adsorción. En la tabla 6.6 se recoge la proyección del área media de los grupos sulfato y sulfonato así como la superficie total que ocupan en las tres partículas (24). En el SN9 se ha considerado que toda la carga proviene de los grupos sulfonato, lo que es el caso más desfavorable, ya que el ion sulfonato es de mayor tamaño. En realidad el SN9 dispone tanto de grupos sulfato como sulfonato.

| Grupos | Área grupo (Å ²) | Superficie ocupada en cada partícula (%) | | |
|---------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-----|--------|
| | | RP-130 | SN9 | RP-214 |
| Sulfato (-SO ₄ ⁻) | ~13 | 7 | - | 2 |
| Sulfonato (-SO ₃ ²⁻) | ~20 | - | 17 | - |

Tabla 6.6. Superficie ocupada por los grupos sulfato y sulfonato. RP-130, SN9 y RP-214.

Los resultados de la tabla 6.6 indican que la mayor parte de la superficie está libre, por lo que las tres partículas disponen de suficiente zona hidrofóbica para la fisisorción del Ag P-B.

Por otro lado, aunque no esté recogido en la tabla 6.1, el método de síntesis puede cambiar la hidrofobicidad de la superficie (22, 25, 26), como es el caso del SN9 (27), donde interviene el estirén sulfonato, ingrediente que le confiere un carácter más hidrofílico que a las otras dos partículas. Esta sustancia es la responsable de que el SN9 tenga grupos sulfonato y que por tanto disponga de mayor carga superficial.

Se puede concluir que la carga superficial del monómero afecta a la fisisorción debido a la repulsión electrostática entre las moléculas del Ag P-B y la partícula, pero en ningún caso a la falta de superficie hidrofóbica. El grado de hidrofobicidad del monómero SN9 es difícil de evaluar, pero podría explicar en parte las diferencias encontradas con las otras dos partículas.

6.3 Parámetros propios del reactivo: efecto del grado de recubrimiento en la inmunoreactividad

El objetivo de este apartado y del siguiente, es evaluar el efecto que tienen sobre R_{\max} y V_0 (parámetros del ajuste hiperbólico) variables tales como el grado de recubrimiento o el número de partículas (apartado 6.4). De este estudio se determinarán cuales son las condiciones óptimas del reactivo, elección que se realiza en base a los siguientes criterios:

Estabilidad coloidal

Los complejos deben de ser coloidalmente estables en las condiciones de resuspensión y reacción, de forma que la aglutinación esté ocasionada única y exclusivamente por la unión antígeno-anticuerpo.

Especificidad

El reactivo debe de ser específico del anticuerpo o del antígeno a determinar, de manera que no existan reacciones con otras proteínas del suero.

Respuesta a baja concentración de aglutinante

Los mejores inmuno-ensayos son aquellos capaces de detectar la mínima cantidad de analito. En los reactivos comerciales, el límite de detección se determina mediante pruebas de exactitud y precisión, medidas que en este caso no se han realizado, por lo que las condiciones óptimas se establecen en base a los valores de R_{\max} .

Rango de trabajo

La respuesta de un inmuno-ensayo sigue la denominada curva de la precipitina (figura 4.9), de forma que puede haber dos diluciones de aglutinante con la misma respuesta. La máxima cantidad de analito con una reactividad no repetida recibe el nombre de rango de trabajo. Por esta razón, cuando se investiga y diseña un reactivo de inmuno-diagnóstico, es conveniente trabajar con muestras de un título lo más elevado posible. El rango de trabajo depende de varios parámetros, como se vio en el capítulo 3, aunque estas deducciones son validas sólo para un sistema formado por monómeros y dímeros. A pesar

de esto, muchas de ellas se pueden aplicar al caso polidisperso, como se comprobará más adelante. El rango de trabajo varía en función de los siguientes factores:

- ▶ Tamaño del monómero. Cuanto mayor es el diámetro inicial de partícula, menor es la concentración de aglutinante correspondiente al punto de equivalencia, lo que implica que a menos tamaño de monómero más rango de trabajo.
- ▶ Grado de recubrimiento. Teóricamente, la cantidad de agregante correspondiente a la máxima respuesta del sistema depende proporcionalmente del grado de recubrimiento, aunque en la práctica se ha encontrado que esto no es totalmente cierto, como se puede ver en la figura 6.9 y 6.11. Un incremento de la proteína adsorbida desplazará el rango de trabajo hacia concentraciones mayores de aglutinante.
- ▶ Número de partículas. Teóricamente, un aumento del número inicial de partículas implica un incremento del rango de trabajo. Sin embargo con ciertas concentraciones (ver gráficas 6.16 y 6.19), se ha encontrado que esta tendencia desaparece y la curva de reactividad llega a un “plateau”, a partir del cual no existe un aumento significativo de la respuesta con la concentración de aglutinante. En estos casos no es posible determinar correctamente el rango de trabajo del reactivo. Este comportamiento tiene en principio una justificación de carácter óptico, aunque también existen factores biológicos relacionados con la inmun-aglutinación de los complejos. Todo esto se verá con mayor detalle cuando se estudien las curvas de R_{\max} y V_0 en función del número de partículas (apartado 6.4).

A continuación se analizan los resultados de R_{\max} y V_0 correspondientes al experimento de variación del grado de recubrimiento, en primer lugar de cada partícula por separado y al final conjuntamente.

6.3.1 Partícula RP-130

La razón 340/600 de los complejos es de 6.9, lo que corresponde a un diámetro medio de 178 nm. Comparando este tamaño con el del monómero inicial, la desviación es del 37%, que es la más alta de los tres reactivos, valor que está de acuerdo con la polidispersidad inicial del RP-130 (capítulo 4). En los cálculos del número de partículas o de la sección eficaz de dispersión no se utiliza el diámetro obtenido por turbidimetría, sino el que se midió en el Malvern 4700 PCS, que es de 142 ± 2 nm (el recubrimiento es de

34 $\mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$) y un i.p de 0.16 ± 0.02 .

El suero utilizado en este experimento tiene un título de 64 U.P-B/ml y el número medio de partículas por recubrimiento es de $4.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. En la figura 6.5 se presentan las curvas de reactividad correspondientes a 8.5, 34, 44 y 57 $\mu\text{g/m}^2 \text{ lx}$, realizadas en el Monarch, a una longitud de onda 570 nm y un tiempo de reacción de ≈ 7 minutos. En esta gráfica se comprueba que con la concentración que tiene el aglutinante, no se puede distinguir con claridad ni el rango de trabajo ni la zona de equivalencia de la curva de reactividad. De todas maneras, en las figuras 6.5 y 6.7-(a) se observa que a partir de un recubrimiento igual a 34 $\mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$, la R_{max} tiende a disminuir, por lo que el título del suero tiene menos importancia en este caso. En el experimento de variación del número de partículas se dispondrá de un suero con un título de 256 U.P-B/ml, lo que permitirá determinar mejor los parámetros de la curva de inmuno-aglutinación.

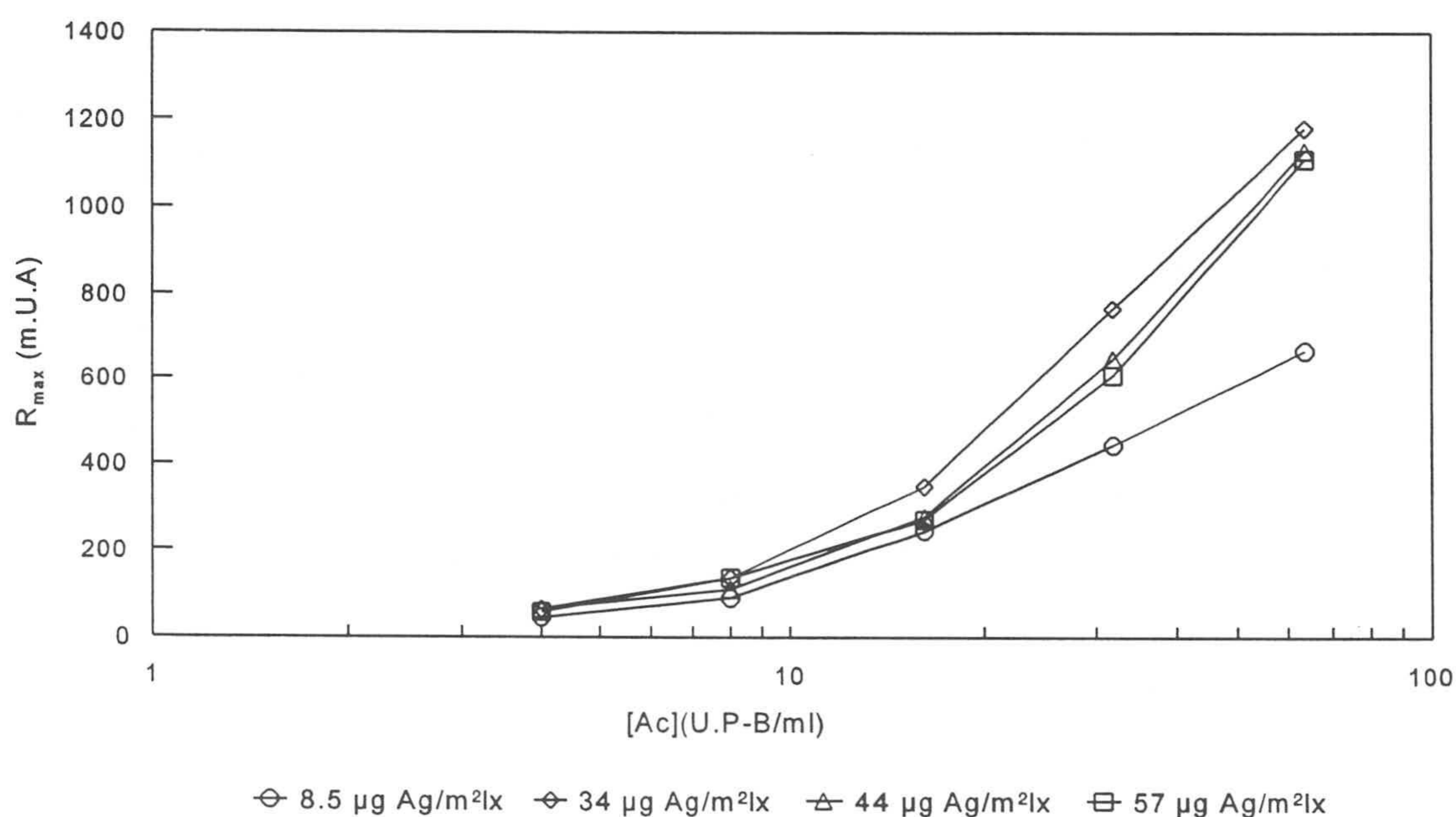


Figura 6.5. Partícula RP-130 ($4.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). Variación del grado de recubrimiento. Curvas de R_{max} . Número medio de puntos analizados por curva: 90.

El descenso de la reactividad a partir de un determinado recubrimiento, es algo que se ha encontrado en otros sistemas lx-proteína. La caída de R_{max} podría deberse a la manera en que el Ac P-B se une al Ag de la superficie del monómero y como varía esta unión en función de S. Todo esto se ve con mayor claridad en la figura 6.6, que ilustra un caso donde el aglutinante es una IgG. En la situación (a), el anticuerpo se une por uno de sus lugares

reactivos al antígeno, dejando el otro libre para que pueda reaccionar con otra partícula. Sin embargo, en el caso (b), si el recubrimiento es muy elevado, existe la posibilidad de que los dos fragmentos específicos del anticuerpo reaccionen con dos antígenos de una misma partícula, lo que provocará un descenso de la reactividad. Esto es lo que puede estar sucediendo en el reactivo para la detección de Ac P-B (IgM), donde los resultados experimentales tanto del RP-130 como del RP-214, muestran un claro decremento de R_{max} cuando el recubrimiento supera un determinado valor. Ahora bien, esta justificación es apropiada si el agregante es una IgG, como se observa en la figura 6.6, pero más difícil de entender si se trata de una IgM, ya que esta proteína dispone de 10 posibles lugares de unión (ver figura 4.12). Sin embargo, ciertos autores han encontrado que la valencia de la IgM se “reduce” si el Ag correspondiente dispone de un peso molecular superior a 1000 kD (28). Los fragmentos específicos del Ac pierden accesibilidad si el Ag es de un gran tamaño. El Ag P-B además de tener un peso molecular por encima de 100000 kD, se encuentra adsorbido, lo que a nivel estérico puede dar lugar a una “disminución” aun mayor de la valencia de la IgM.

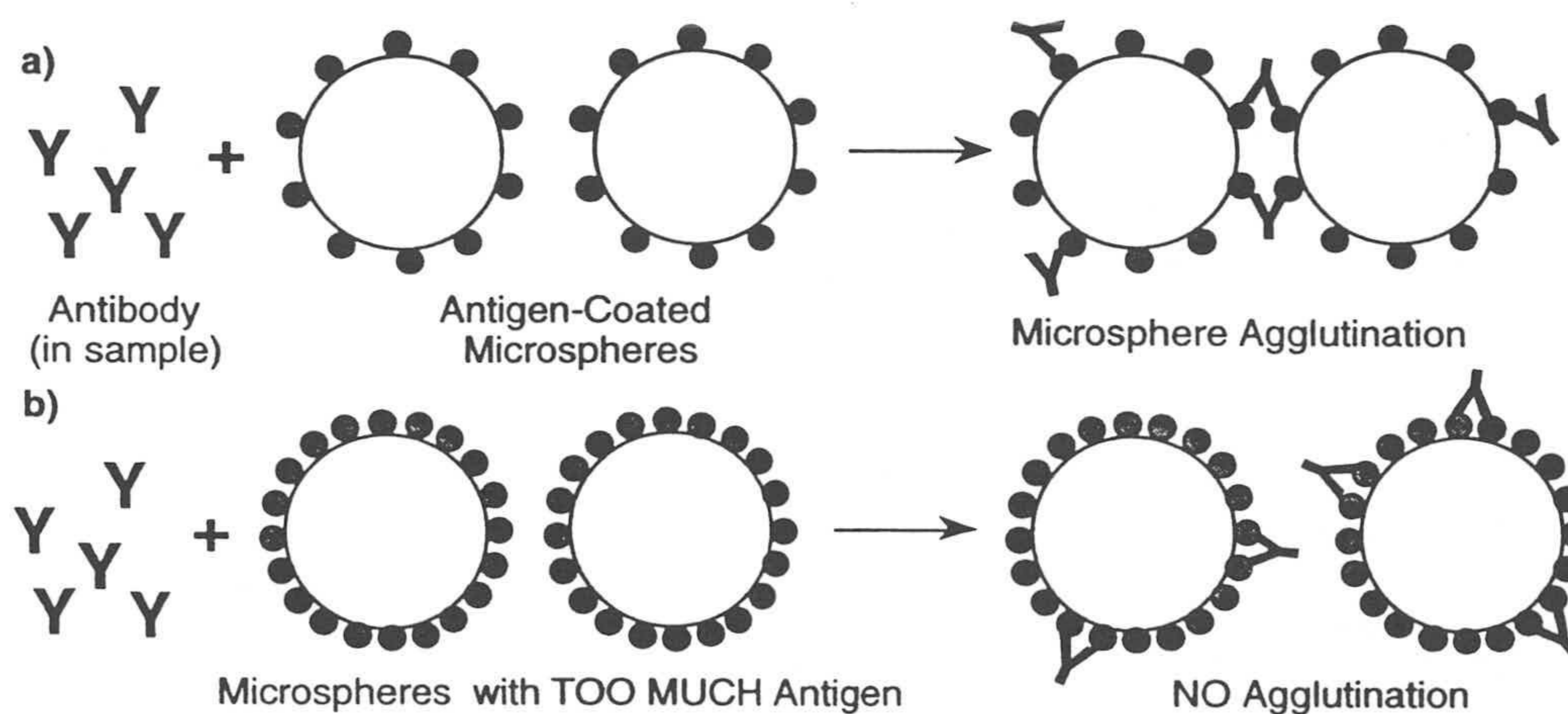


Figura 6.6. Inmuno-diagnóstico de soporte coloidal. El anticuerpo es el agregante. (a) Proporción correcta de Ag y Ac para que se produzca la aglutinación de las partículas. (b) Exceso de recubrimiento. Falta de reactividad.

En la figura 6.7-(a) está representada la variación de R_{max} en función del recubrimiento para tres concentraciones de aglutinante, 16, 32 y 64 U.P-B/ml. Véase como la máxima respuesta corresponde a $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, resultado que también se repite con el parámetro V_0 (gráfica 6.7-(b)), a pesar de que el modelo teórico desarrollado en el capítulo anterior, prevé un crecimiento lineal de V_0 con S. A partir de un determinado recubrimiento

y para una cantidad constante de aglutinante, el número agregantes por partícula (n_A) que pueden reaccionar es cada vez menor (figura 6.6-(b)) y aunque n aumente, el producto $n_A(n - n_A)$ puede llegar a disminuir, lo que explicaría el máximo V_0 .

El límite de detección en todos los recubrimientos es de 4 U.P-B/ml, valor que está por debajo del obtenido con el RP-130 en el experimento de variación del número de partículas (apartado 6.4.1). Esta falta de reactividad en la zona baja (1-2 U.P-B/ml) se debe en parte al propio reactivo (grado de recubrimiento, tamaño de monómero, etc) y también al tiempo de medida utilizado. En estas condiciones, los valores de absorbancia están más separados entre sí, lo que perjudica al ajuste hiperbólico, ya que el número de datos útiles es menor.

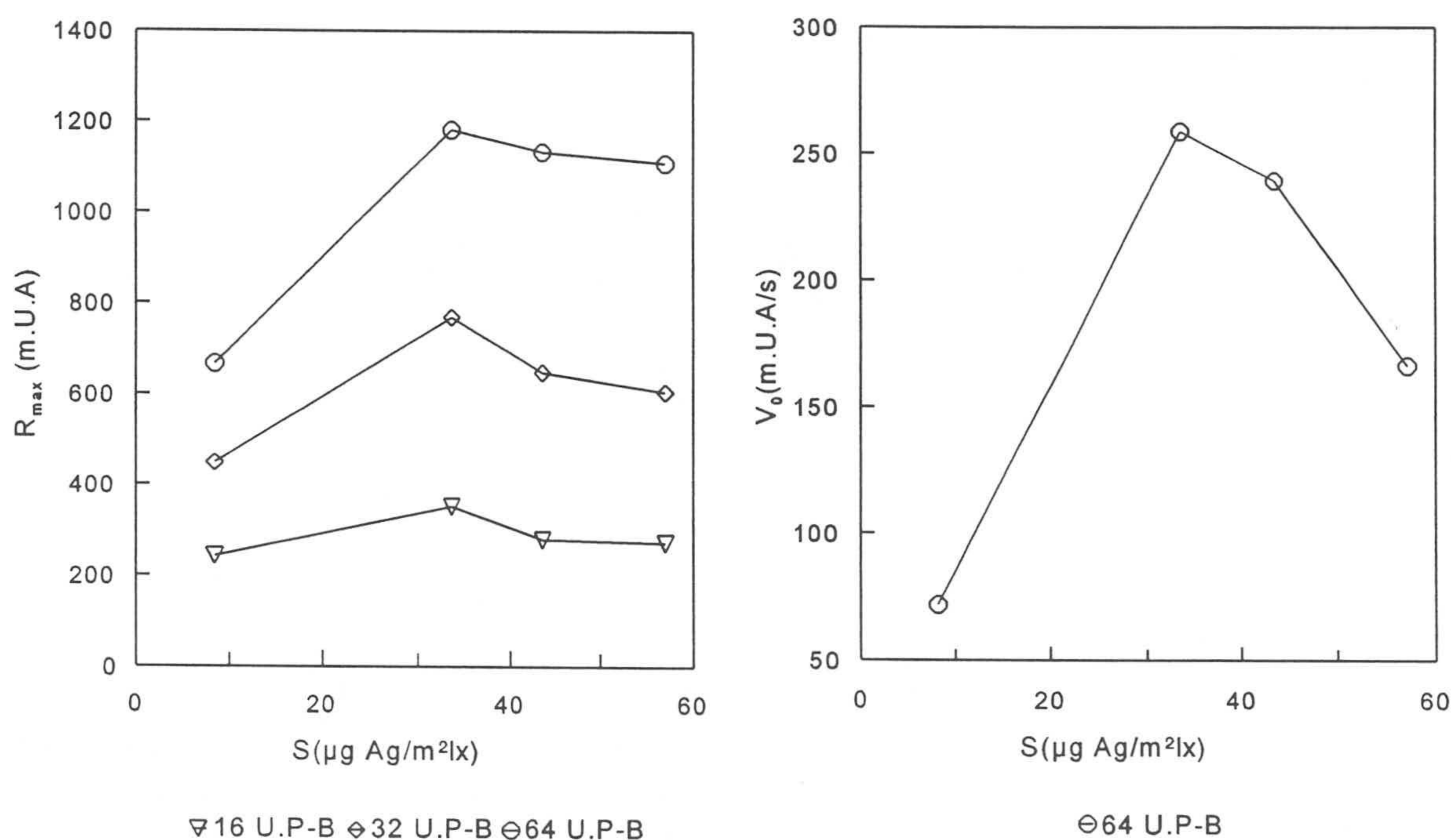


Figura 6.7. Partícula RP-130 ($4.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). (a) Variación de R_{\max} con el recubrimiento para 16, 32 y 64 U.P-B/ml. (b) V_0 en función de S para 64 U.P-B/ml.

En ninguno de los casos han aparecido reacciones inespecíficas con los cinco sueros negativos de mononucleosis infecciosa utilizados y todos los blancos son estables. Las condiciones de medida, tiempo y concentración de aglutinante, no permiten determinar que recubrimiento es el que tiene mayor rango de trabajo o respuesta a baja concentración de aglutinante. Por esta razón se ha escogido $34 \mu\text{gAg/m}^2\text{lx}$ como óptimo, ya que es el más reactivo de todos.

6.3.2 Partícula RP-214

La razón 340/600 y el diámetro medio de agregado calculado por este método es de 234 nm. La desviación respecto al tamaño inicial es de un 9%, que es mucho menor que la del RP-130, lo que está de acuerdo con los valores de polidispersidad inicial del RP-214. Como el tamaño obtenido para los complejos (50 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$) en el PCS es de 211 ± 3 nm ($i.p= 0.10\pm 0.02$), en los cálculos de número de partículas o de la sección eficaz de dispersión de los complejos se ha utilizado un diámetro de 214 nm, que es el que asigna la casa comercial al látex original.

Las medidas se han realizado con un diluciones de un suero de 64 U.P-B/ml, y al igual que sucedía con en el RP-130, faltan diluciones de aglutinante para completar toda la curva de respuesta. El número medio de partículas por recubrimiento es de $7.4\cdot 10^{10}\text{ cm}^{-3}$. Los valores de R_{max} en función del grado de recubrimiento están representados en la figura 6.8 y a partir de esta gráfica se deduce que:

- ▶ El ajuste hiperbólico de los datos absorbancia-tiempo permiten detectar hasta 2 U.P-B/ml en la mayor parte de los recubrimientos. Este descenso respecto del RP-130 se debe a un aumento del diámetro de monómero, ya que el tiempo de medida es el mismo para las dos partículas. El tamaño inicial de la partícula es el factor que más influye en el valor del límite de detección y del rango de trabajo (ver apartado 6.3.4).
- ▶ Existe un máximo de reactividad situado en un recubrimiento entre 40 y 50 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$. Para 62 y 85 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$ se confirma el resultado obtenido con la partícula RP-130, como se observa en la figura 6.9-(a), donde se presenta la variación de R_{max} en función de S a 16, 32 y 64 U.P-B/ml. Con 62 y 85 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$ existe un descenso de R_{max} respecto a recubrimientos inferiores y por tanto una pérdida de límite de detección, que pasa de 2 a 4 U.P-B/ml. Los valores de V_0 confirman que alrededor de 50 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$ es donde los complejos alcanzan sus condiciones óptimas de reacción, como se puede ver en la figura 6.9-(b). Cabe destacar que V_0 tiene un comportamiento lineal con S en el tramo de recubrimientos hasta 50 $\mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, tal y como prevé el modelo teórico.

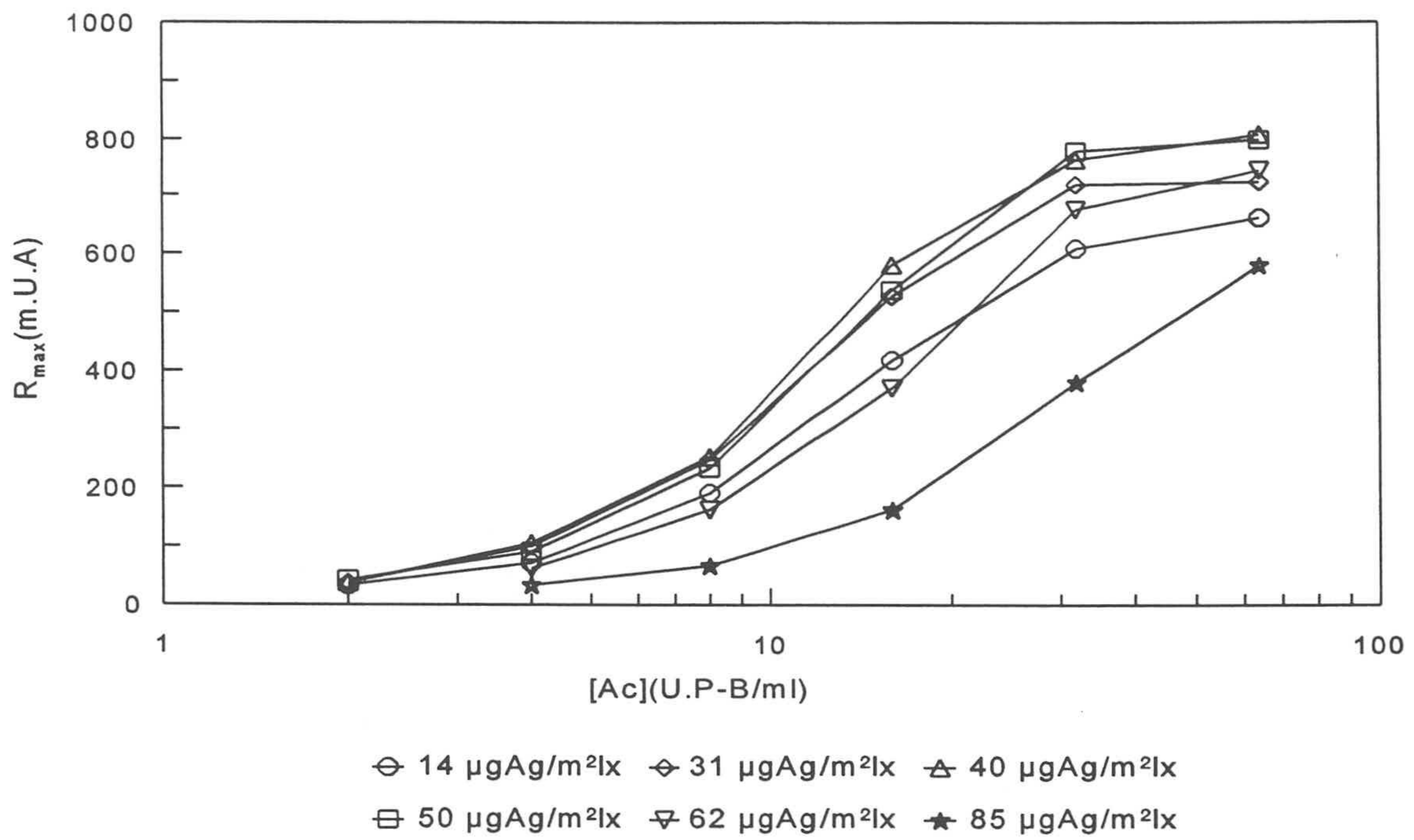


Figura 6.8. Variación de R_{\max} en función del grado de recubrimiento. RP-214 ($7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$).
 Nº medio de datos por curva: 115.

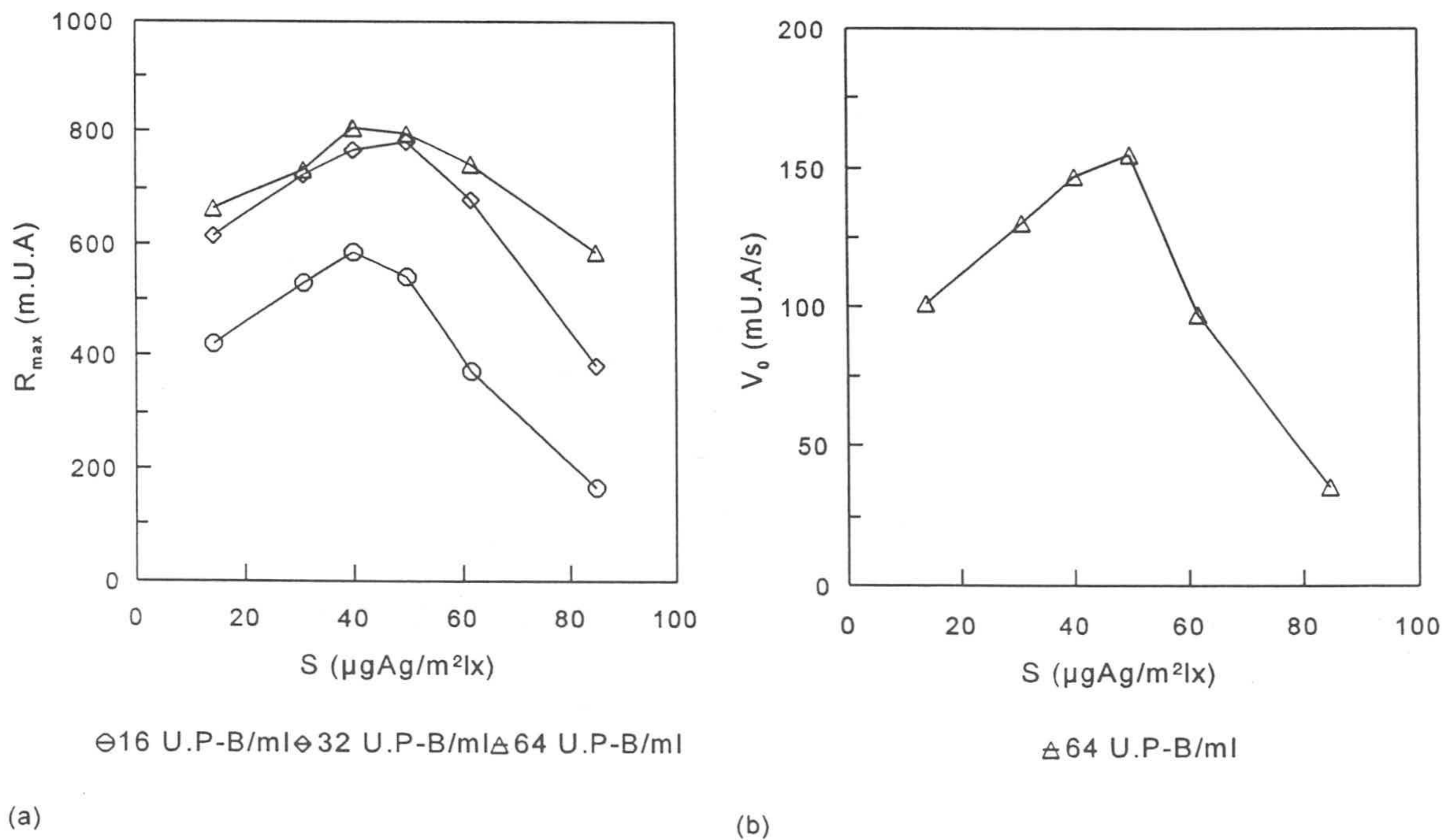


Figura 6.9. Partícula RP-214. (a) Variación de R_{\max} con S ($\mu\text{g Ag}/\text{m}^2\text{lx}$) para tres concentraciones de aglutinante: 16, 32 y 64 U.P-B/ml. (b) Cambio de V_0 (mU.A/s) con el recubrimiento para 64 U.P-B/ml.

El recubrimiento que finalmente se ha elegido como óptimo es $50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, ya que tiene una buena respuesta en todas las concentraciones de anticuerpo y además es el último antes de que comience a descender la reactividad por exceso de Ag P-B. En ninguno de los casos han aparecido reacciones inespecíficas con los sueros analizados y todos los complejos son estables en el medio de reacción.

6.3.3 Partícula SN9

Con esta partícula se han introducido dos nuevas variables respecto de los monómeros comerciales RP-130 y RP-214, que son la carga superficial y la síntesis. Ambos parámetros parecen ser los responsables de las diferencias a nivel de adsorción y respuesta entre esta partícula y las de Rhône-Poulenc, aunque la carga e hidrofiliidad de la superficie no sean en principio tan elevadas como para impedir la adsorción de Ag P-B o la reacción inmunológica.

Las medidas se han realizado con diluciones de un suero de 64 U.P-B/ml y como ocurría en el RP-130 y RP-214, faltan diluciones de aglutinante para completar toda la curva de respuesta. El número medio de partículas por recubrimiento es de $7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Las curvas de R_{max} del SN9 en función de la concentración de anticuerpo para los distintos valores de $S(\mu\text{g Ag/m}^2\text{lx})$ son los de la figura 6.10. Se observa que no ha sido posible llegar a un recubrimiento lo suficientemente elevado, donde se produzca el descenso de la reactividad, tal y como había sucedido en los dos casos anteriores. No han aparecido reacciones inespecíficas con los sueros analizados ni tampoco desestabilización coloidal de los complejos.

La razón 340/600 y el tamaño final de agregado es de 242 nm. Este diámetro es similar al del complejo RP-214-Ag P-B lo que coincide con las medidas de PCS, donde el SN9 sensibilizado tiene un tamaño medido de $216 \pm 3 \text{ nm}$ y un i.p de 0.02 ± 0.01 . Este resultado complica aun más la explicación de las diferencias encontradas entre el RP-214 y el SN9, que son de dos tipos principalmente:

Adsorción.

Tal y como se vio en el apartado 6.2.1.4, la densidad superficial de carga es el factor que puede justificar que en igualdad de proteína añadida, el recubrimiento del SN9 sea siempre menor que el del RP-214. Este hecho invalida al SN9 como base de un reactivo

comercial para la detección del Ac P-B, ya que es necesario añadir mucho más Ag P-B, para conseguir el mismo recubrimiento que en el RP-214. Sin embargo, se considera a esta partícula un soporte ideal para la adsorción de otras proteínas, como la IgG o la BSA (27, 29).

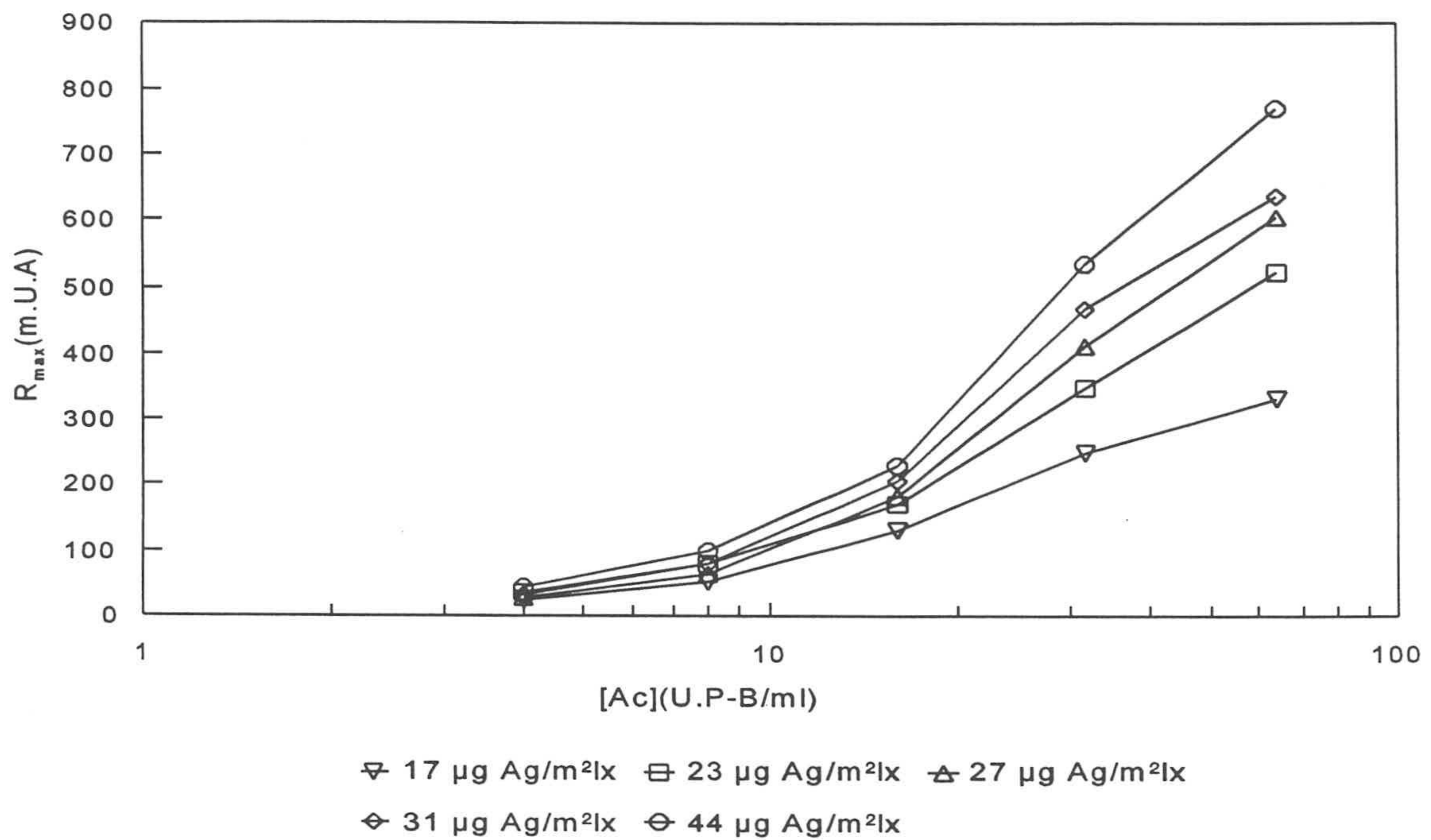


Figura 6.10. Partícula SN9 ($7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$). Variación de R_{max} con el grado de recubrimiento. Número medio de datos por curva: 147.

Reactividad.

Ciertos autores (30) afirman que la carga superficial del monómero afecta a la estabilidad coloidal del complejo lx-proteína. Cuando la densidad de carga del soporte es elevada, las partículas son muy estables (repulsión electrostática), lo que desfavorece la reacción antígeno-anticuerpo. Este fenómeno se manifiesta principalmente en los complejos de bajo recubrimiento (poco Ag P-B) o a medida que disminuye la cantidad de aglutinante, como puede estar sucediendo en la figura 6.11-(a). En esta gráfica están representadas dos curvas absorbancia-tiempo del SN9 ($44 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) y del RP-214 ($40 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) a una concentración de aglutinante de 16 U.P-B/ml. Por otro lado, al incrementar [Ac] o S, la inhibición de la respuesta disminuye, como se puede ver en la figura 6.11-(b), donde se presentan las curvas absorbancia-tiempo del SN9 ($44 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) y el RP-214 ($40 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) para 64U.P-B/ml. Vease como la respuesta final es prácticamente la misma, aunque la velocidad de reacción del SN9 sea

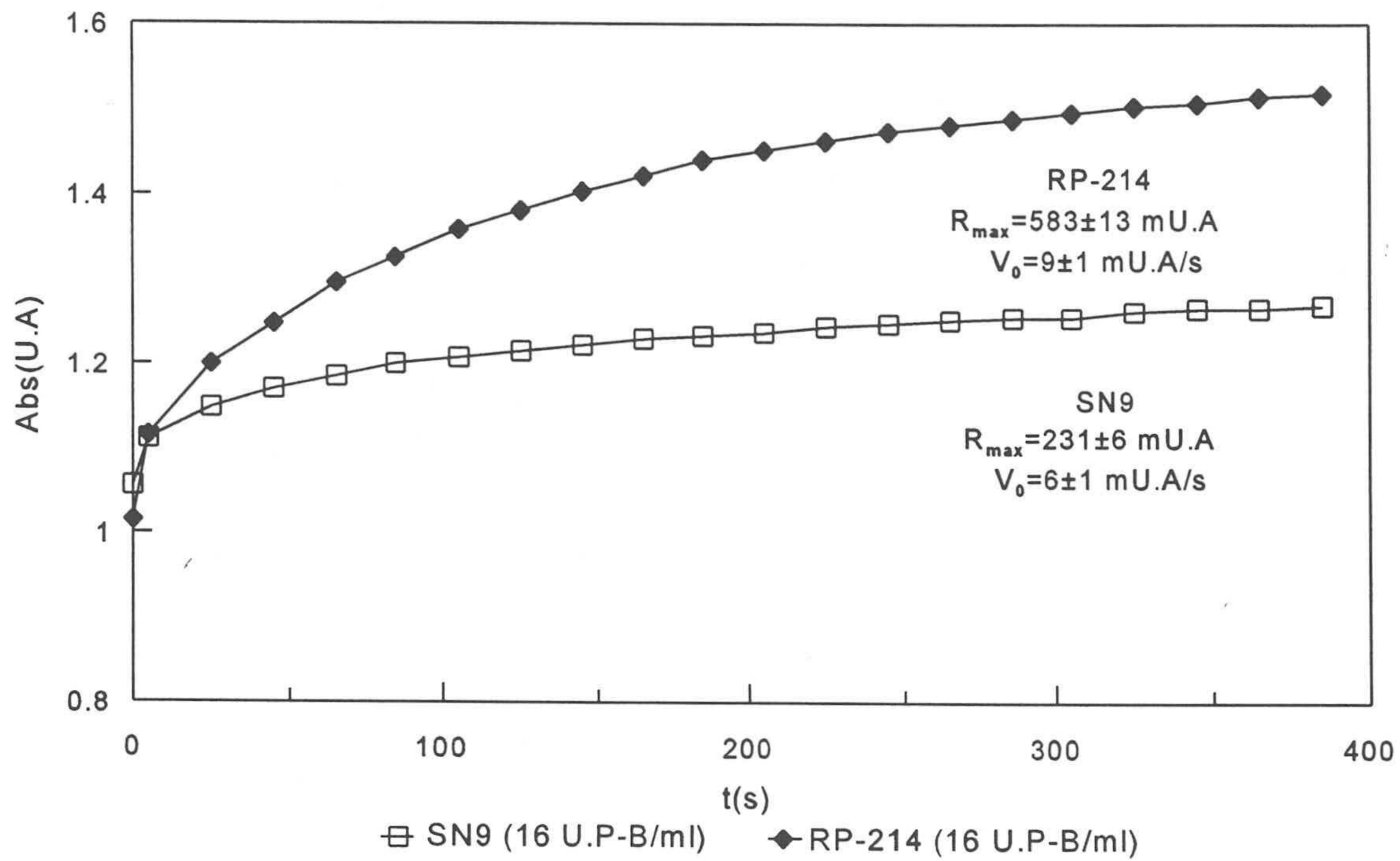
mucho menor. Sin embargo, al disminuir la cantidad de aglutinante (figura 6.11-(a)) la R_{\max} de ambos sistemas es totalmente diferente. Cabe destacar que a pesar de las diferencias, las curvas absorbancia-tiempo del SN9 se pueden ajustar mediante el modelo hiperbólico, con unos valores de χ^2 muy similares a los que tiene el reactivo fabricado a partir del RP-214.

Por el contrario, otros investigadores opinan que las características del soporte no tienen ningún tipo de influencia sobre la reacción antígeno-anticuerpo (19). La afinidad de la unión Ag-Ac ($K_a=10^9$ a 10^{11} mol) es mucho mayor que la energía potencial de repulsión entre dos partículas, de forma que habrá coagulación independientemente de la estabilidad coloidal de los complejos o del soporte. Además las proteínas (31) tienen en determinados casos unas dimensiones (≈ 250 Å para la IgG) superiores a la distancia media de interacción entre dos partículas (≈ 120 Å), de forma que la separación entre las mismas no impedirá la inmuno-aglutinación.

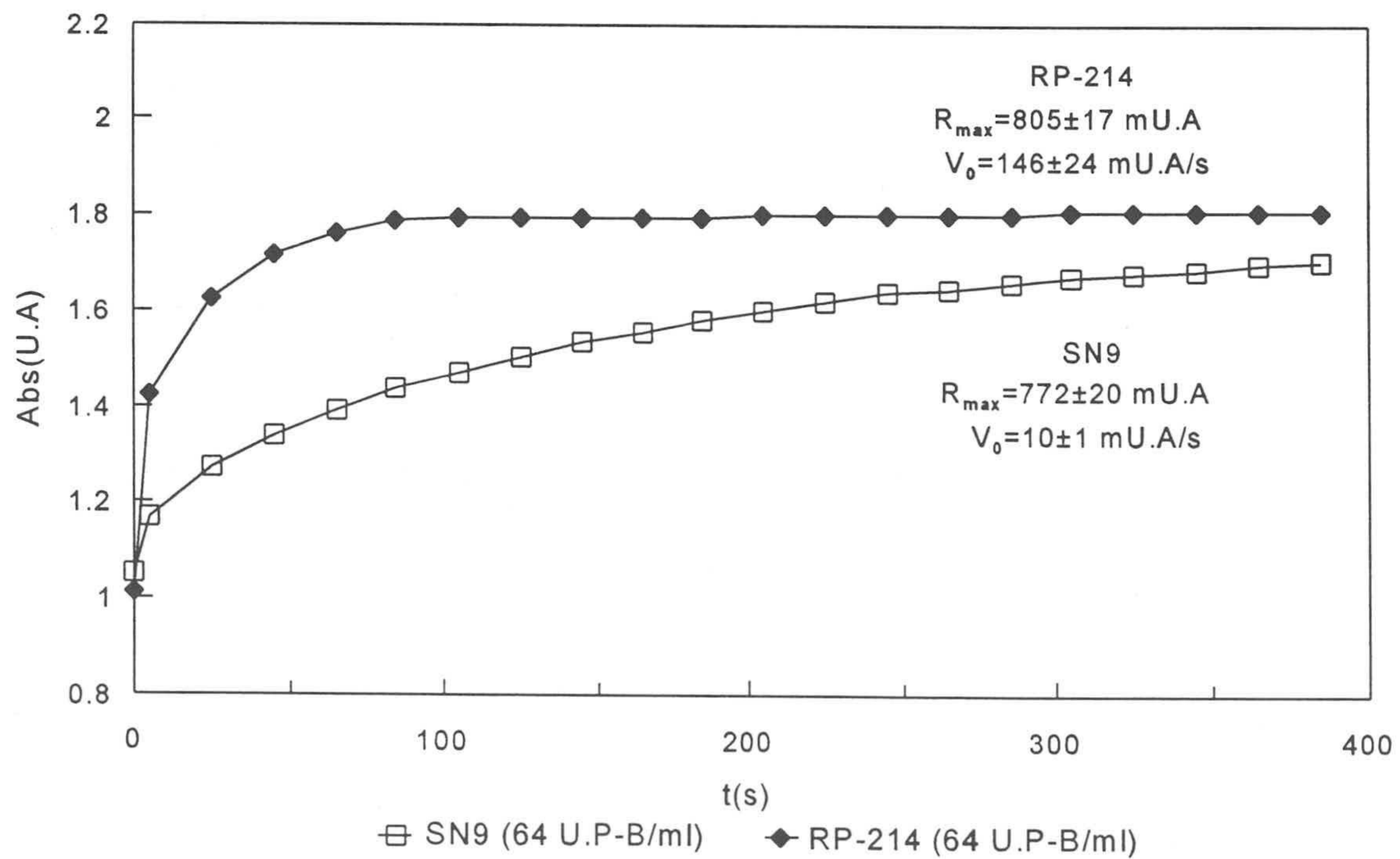
Sin embargo, existe otra interpretación de lo que puede estar sucediendo en este caso, que es la modificación estructural que sufre el Ag P-B por el hecho de encontrarse adsorbido sobre el SN9, como han podido comprobar otros autores con diversos sistemas proteicos (32, 32, 33). Este cambio de estructura puede suponer también una variación en la funcionalidad de la molécula adsorbida (34, 35). Cuando una proteína llega a la superficie de una partícula de poliestireno, una zona de la molécula en contacto con el medio acuoso es reemplazada por el sorbente. Esto implica que las partes apolares (grupos hidrofóbicos) que se encontraban apantalladas en el interior de la proteína, se expongan hacia la superficie del sorbente, lo que supone una modificación de la estructura secundaria de la molécula (36). Este cambio depende de la naturaleza de la proteína, de las condiciones de adsorción y de la hidrofiliidad del sorbente.

La variación de la estructura y funcionalidad del Ag P-B parece ser la causa de las diferencias de respuesta entre el complejo SN9-Ag P-B y el RP-214-Ag P-B , más que el efecto de la carga superficial del SN9 sobre la estabilidad coloidal del sistema.

La manera de reaccionar del SN9 se ha encontrado también al utilizar un suero de origen animal como aglutinante (ver apartado 6.9), donde la proteína específica no es una IgM sino una IgG. En este caso, la presencia de calcio en el medio de reacción parece ser la responsable de los cambios conformacionales del Ag P-B, lo que da lugar a unas curvas absorbancia-tiempo y de reactividad completamente diferentes al del agregante humano.



(a)



(b)

Figura 6.11. Curvas absorbancia-tiempo del SN9($44 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) y del RP-214 ($40 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). (a) Concentración de aglutinante: 16 U.P-B/ml (b) Concentración de aglutinante: 64 U.P-B/ml.

Para finalizar se puede decir que aunque no se vuelva a utilizar la partícula SN9, los resultados obtenidos tienen un gran interés, ya que son una muestra más de la complejidad del sistema proteico antígeno-anticuerpo de Paul-Bunnell.

6.3.4. Variación del grado de recubrimiento. Análisis comparativo de la reactividad de los complejos RP-130-Ag P-B y RP-214-Ag P-B

A continuación se comprobará si los resultados teóricos del capítulo 3, correspondientes al límite de detección, respuesta en punto de equivalencia y máxima concentración de aglutinante de un sistema formado por monómeros y dímeros, se cumplen también para la R_{\max} del experimento de inmuno-aglutinación con distintos grados de recubrimiento y diferentes tamaños de partícula (RP-130 y RP-214). Cuando el sistema llega a su R_{\max} , los agregados son de especies superiores a los dímeros.

Límite de detección.

Con complejos de diferente tamaño, grado de recubrimiento $S(\mu\text{g}/\text{m}^2)$ y absorbancia inicial A_0 (U.A), la velocidad inicial del sistema a baja concentración de aglutinante V_{id} (U.A s^{-1}), es función del producto $F_{\text{op}}\alpha^2SA_0$ ($F_{\text{id}}(\mu\text{g}/\text{m}^2)$). La gráfica 6.12 presenta el cambio teórico de F_{id} en función del grado de recubrimiento para el RP-130 y RP-214 respectivamente, donde los valores de S y A_0 son los experimentales. De esta figura se deduce que el límite de detección aumenta con S y que la partícula RP-130 necesitará de un recubrimiento elevado o una A_0 mayor (≈ 1.5) para tener la misma respuesta a baja concentración de aglutinante que el RP-214. Todo esto se ha podido comprobar a nivel experimental, tal y como se puede ver en la figura 6.13-(a), donde está representada la R_{\max} en función S para 4 U.P-B/ml. Se ha escogido esta concentración ya que es la mínima cantidad que detecta el RP-130 en este experimento (apartado 6.3.1). Este resultado confirma al tamaño inicial de monómero como el parámetro que determina el límite de detección del sistema, a pesar de que en este caso concreto existe bastante diferencia entre el número de dispersores (RP-130: $4.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ y RP-214: $7.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) de ambas partículas.

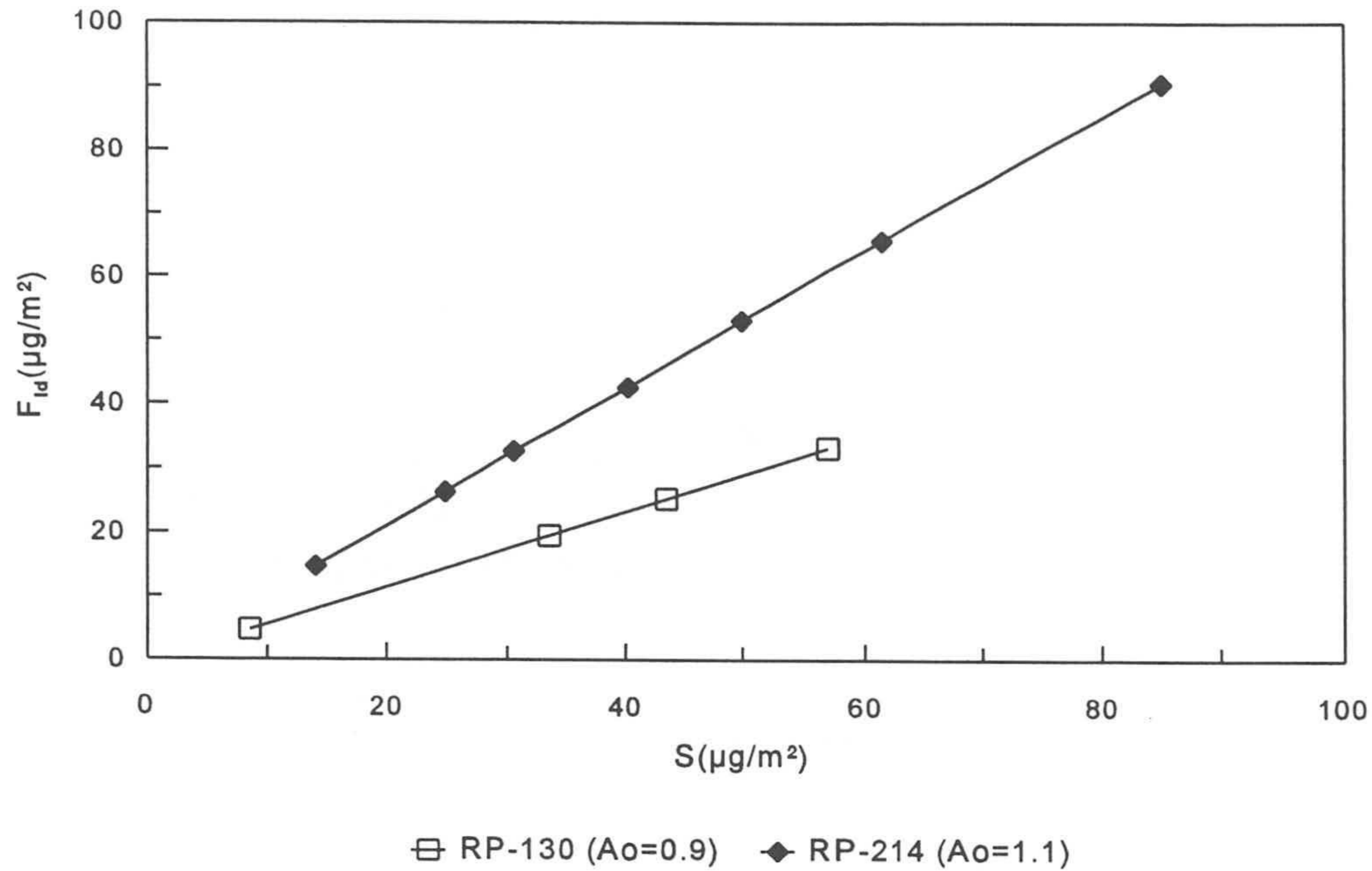


Figura 6.12. Partículas RP-130 y RP-214. F_{id} en función de S y A_0 .

Aunque la función F_{id} determine como varía el límite de detección con el recubrimiento y el tamaño de partícula, no se contempla la posibilidad de que varios fragmentos específicos de una molécula de aglutinante se unan a varios antígenos de una misma partícula, lo que disminuye la velocidad inicial y la reactividad (ver figuras 6.7, 6.9 y 6.13). De todas maneras, existe un rango de S donde se cumplen las previsiones del modelo teórico, tanto para V_0 como para R_{max} .

Punto de equivalencia. Respuesta y máxima concentración de aglutinante.

Para los complejos con distinto tamaño inicial, grado de recubrimiento y absorbancia inicial, la velocidad inicial del sistema en el punto de equivalencia es función de $F_{op}\alpha^2SA_0/C_1$, producto que recibe el nombre de F_{pe} ($\mu\text{g}/\text{cm}^4$). La figura 6.14 representa la variación de F_{pe} con el grado de recubrimiento y la absorbancia inicial (valores experimentales) para las partículas RP-130 y RP-214. Al contrario de lo que sucedía en el límite de detección, la partícula de más diámetro necesita aumentar S o A_0 para llegar a los mismos valores de respuesta que el RP-130. Este fenómeno se confirma también con los valores experimentales de reactividad, como se puede ver en la figura 6.13-(b), donde está representada R_{max} a 64 U.P-B/ml (la máxima concentración de aglutinante disponible) para los dos complejos.

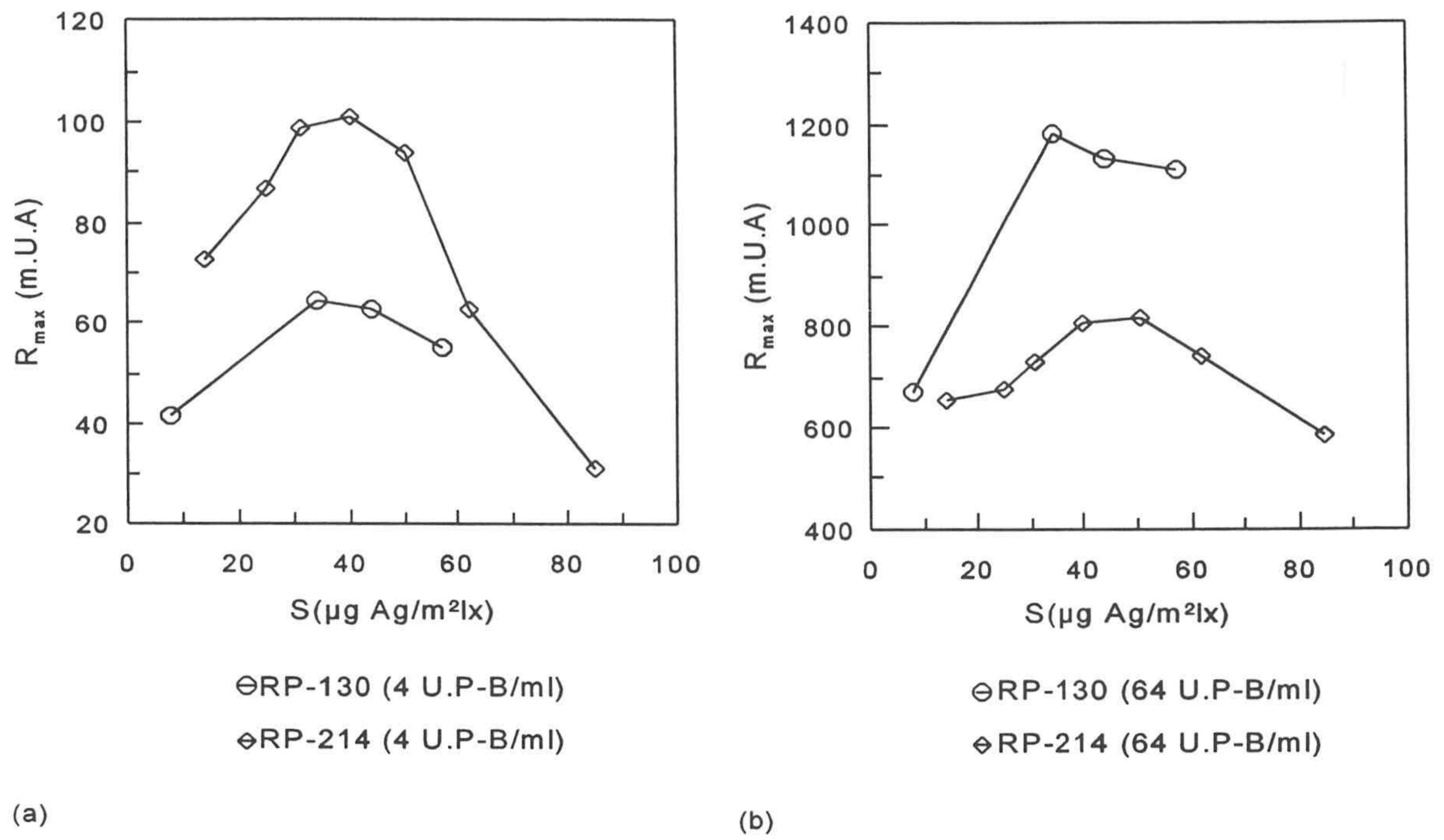


Figura 6.13. Partículas RP-130 y RP-214. Variación de R_{max} con el grado de recubrimiento. Concentración de aglutinante: (a) 4 U.P-B/ml y (b) 64 U.P-B/ml.

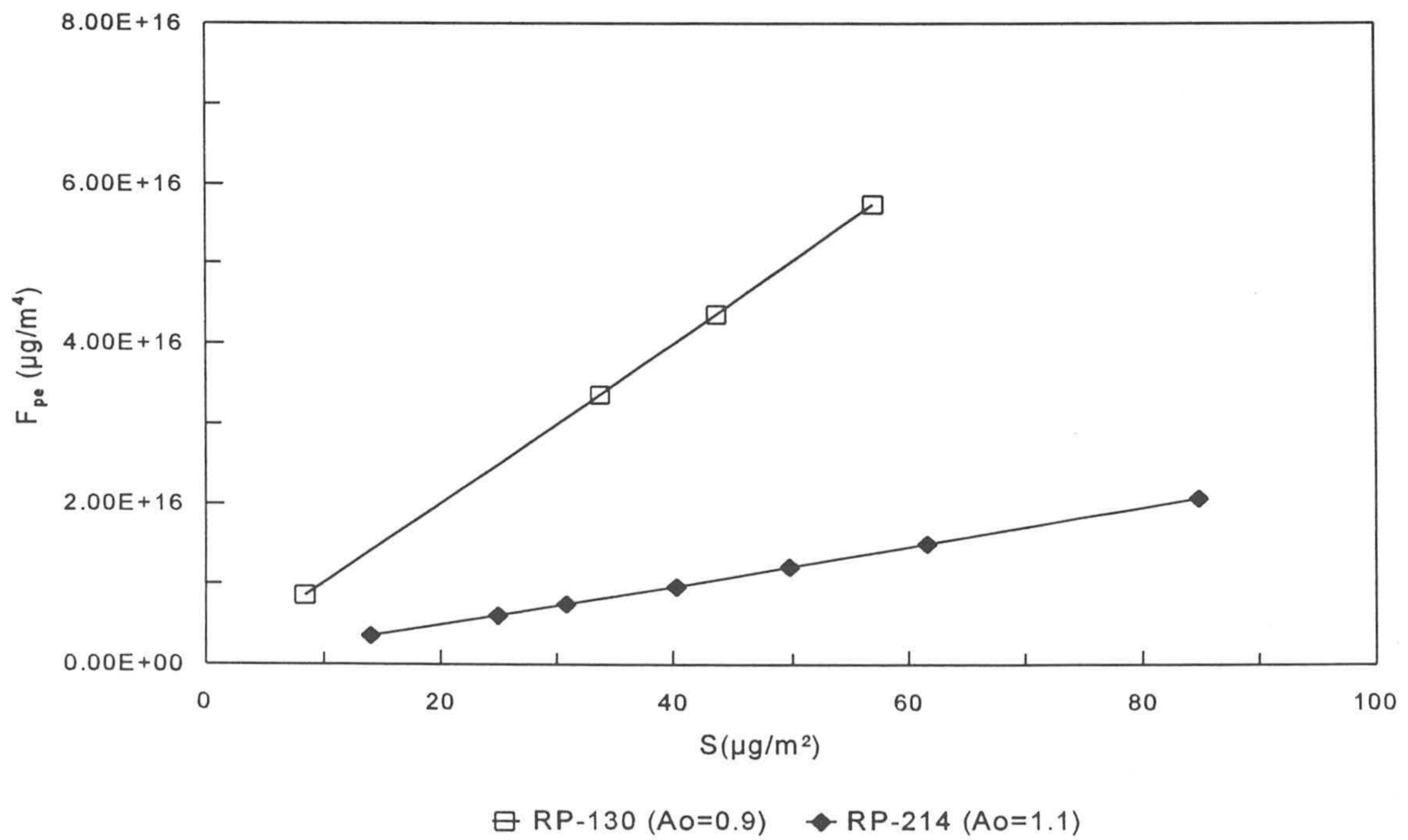


Figura 6.14. Partículas RP-130 y RP-214. F_{pe} en función de S y A_0 .

La función F_{pe} al igual que la F_{id} no prevé el descenso de la velocidad inicial y por extensión de la reactividad a partir de un determinado recubrimiento. De todas maneras la respuesta es creciente con el grado de recubrimiento, tal y como considera el modelo teórico, hasta $34 \mu\text{g Ag}/\text{m}^2 \text{Ix}$ para el RP-130 y $50 \mu\text{g Ag}/\text{m}^2 \text{Ix}$ para el RP-214.

La concentración de aglutinante correspondiente al punto de equivalencia ($A_{c_{pe}}$) varía con el producto $S\alpha^2A_0/C_1$, función que tiene el mismo comportamiento que F_{pe} . La concentración de anticuerpo Paul-Bunnell en el punto de equivalencia será por tanto inversamente proporcional al cuadrado del diámetro inicial del complejo. Todo esto no se ha podido comprobar a nivel experimental, ya que el título del suero no es lo suficiente suficientemente elevado.

6.4 Parámetros propios del reactivo: efecto del número inicial de partículas en la inmuno-reatividad

Una vez escogido el recubrimiento óptimo, se calcula la R_{max} y V_0 a varias concentraciones de partículas, hasta encontrar la que mejor cumpla los requisitos exigidos habitualmente, que son estabilidad coloidal, especificidad, rango de trabajo y límite de detección.

6.4.1 Partícula RP-130

En este experimento los complejos Ix-proteína se han obtenido siguiendo el protocolo de sensibilización y bloqueo, mientras que el método de detección del Ag P-B adsorbido es el específico. Los complejos RP-130-Ag P-B tienen un tamaño aproximado de 142 nm (P.C.S) y un recubrimiento de $34 \mu\text{g Ag}/\text{m}^2 \text{Ix}$. Todos los blancos son coloidalmente estables y no han aparecido reacciones inespecíficas con los sueros analizados .

En la figura 6.15 se presentan las curvas de inmuno-aglutinación correspondientes al RP-130 (Monarch, $\lambda_0=570 \text{ nm}$) con cuatro concentraciones diferentes de partículas (N) $1.0 \cdot 10^{11}$, $1.8 \cdot 10^{11}$, $4.1 \cdot 10^{11}$ y $5.7 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. El tiempo de medida es de 100 segundos, ya que se pretende que el ajuste hiperbólico disponga del mayor número de datos posible. A

continuación se analiza como afecta un aumento de N a los parámetros que definen la curva de reactividad.

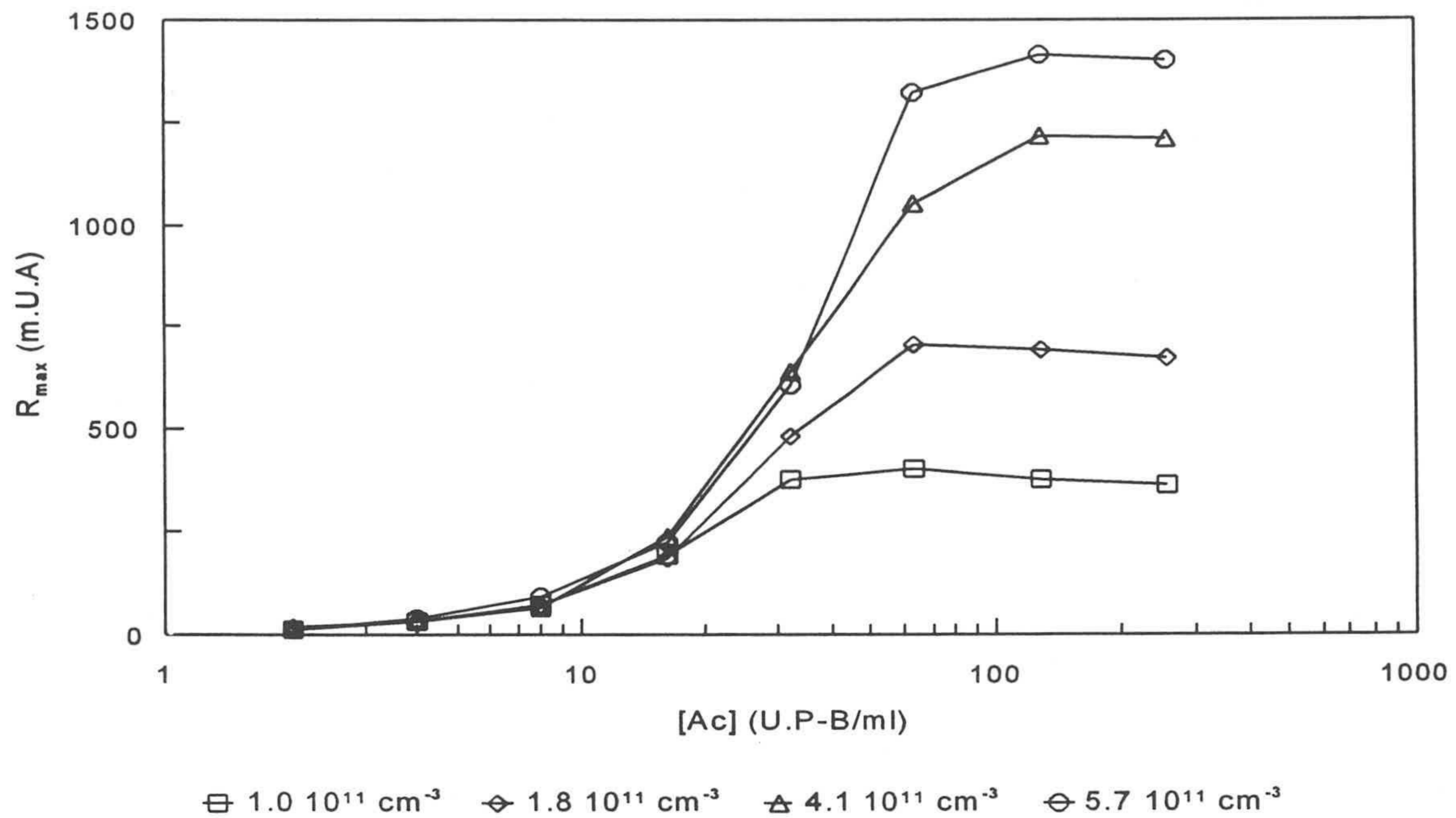


Figura 6.15. RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Experimento de variación del número de partículas. Número medio de datos analizados por curva: 168.

Límite de detección

Se ha encontrado una pérdida del límite de detección cuando el número de partículas supera un determinado valor. En efecto, en un reactivo turbidimétrico de soporte coloidal, un aumento de N supone un incremento del número total de lugares de unión por partícula, lo que implica que para una concentración fija de aglutinante, la razón n_A/n sea cada vez menor. La probabilidad de unión (constante de formación de dímeros, k_f) entre los complejos disminuye, aunque por otro lado un aumento de la cantidad de partículas implica más número de choques eficaces y en consecuencia mayor velocidad inicial, ya que V_0 es directamente proporcional a N (ver tabla 6.8). A nivel experimental, el crecimiento de V_0 a igual concentración de agregante, puede dar lugar a una reacción tan rápida que el aglutinante se agote en los primeros instantes, lo que supone una pérdida de datos en el ajuste hiperbólico. A partir de $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, la reacción con 1 y 2 U.P-B/ml está prácticamente finalizada a los 5 segundos, por lo que no es posible realizar el ajuste matemático. Todo esto se ve con mayor claridad en las tablas finales del capítulo 5 correspondientes a la partícula RP-214.

En la tabla 6.8 están recogidos los valores de R_{max} correspondientes al primer tramo de la curva de inmuno-aglutinación (1-8 U.P-B/ml) para los cuatro valores de N. El límite de detección baja hasta 1 U.P-B/ml para $1.0 \cdot 10^{11}$ y $1.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ mientras que sube hasta 2 U.P-B/ml con $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ y a 4 U.P-B/ml para $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. También se observa que con poca cantidad de aglutinante no existe un incremento significativo de R_{max} con N. Puede que un aumento del número de partículas no compense la pérdida de capacidad de aglutinación de los complejos [Ix-Ag P-B]-Ac P-B. Aunque el número de choques sea mayor, el cociente n_x/n es cada vez más pequeño, al igual que la probabilidad de unión. Por el contrario, cuando la cantidad de aglutinante supera una determinada concentración, las diferencias entre los distintos N son más evidentes, tal y como se puede ver en la figura 6.15. Los resultados de R_{max} son más difíciles de interpretar que los de V_0 , ya que son una interpolación a tiempo infinito donde se habrán producido todos los choques e interacciones posibles entre los agregados. Sin embargo, la velocidad inicial sigue el comportamiento descrito en el modelo teórico, como se puede ver en la tabla 6.8 para 8 U.P-B/ml. A pesar de que los valores son muy bajos, el ajuste lineal tiene un nivel de significación (N.S) inferior al 5%.

| $R_{max}(\text{mU.A})$ | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| [Ac] (U.P-B/ml) | $1.0 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $1.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ |
| 1 | 6±1 | 9.5±0.1 | - | - |
| 2 | 13.8±0.4 | 14.5±0.2 | 12.0±0.2 | - |
| 4 | 29±1 | 31±1 | 40.0±0.3 | 40±1 |
| 8 | 69±2 | 69±1 | 90±1 | 88±1 |
| $V_0(\text{mU.A/s})$ | | | | |
| [Ac] (U.P-B/ml) | $1.0 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $1.8 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ | $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ |
| 8 | 2.5±0.3 | 5±1 | 15±1 | 24±2 |
| Ajuste lineal | Pendiente | Ordenada | r | N.S |
| 8 U.P-B/ml | $4.6 \cdot 10^{-11}$ | -2.8 | 0.996 | <5% |

Tabla 6.8. Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). Valor de R_{max} para 1-8 U.P-B/ml. Velocidad inicial de 8 U.P-B/ml (ajuste lineal). Número de partículas: $1.0 \cdot 10^{11}$, $1.8 \cdot 10^{11}$, $4.1 \cdot 10^{11}$ y $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$.

Rango de trabajo . Zona de equivalencia .

El punto de equivalencia se desplaza hacia mayores concentraciones de agregante al incrementar N. En efecto, al haber presente más cantidad de Ag P-B, es necesario aumentar agregante para alcanzar las condiciones donde el Ac P-B esté en exceso. En la figura 6.15 se puede ver que el punto de equivalencia pasa de estar entre 32 y 64 U.P-B/ml con $1.0 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ a situarse entre 64 y 128 U.P-B/ml para $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. Ahora bien, cuando el número de partículas supera un determinado valor, la reactividad en las concentraciones altas de aglutinante entran en un "plateau", lo que impide definir correctamente el rango de trabajo, tal y como sucede con $4.1 \cdot 10^{11}$ y $5.6 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$.

La aparición del "plateau" de R_{\max} tiene en principio una justificación de carácter óptico aunque también influyen las condiciones de inmuno-aglutinación y más concretamente el título del suero. A partir de la teorías de dispersión de luz, se demuestra que dos distribuciones de partículas pueden tener la misma absorbancia óptica aunque el número de dispersores y su tamaño sean diferentes. En el caso de un inmuno-diagnóstico de soporte coloidal, basta que un descenso en número debido a la agregación esté equilibrado por un aumento del tamaño, o viceversa, lo que explica que complejos de menor diámetro tengan la misma respuesta que otros de tamaño superior. Todo esto se ve con mayor claridad en la figura 6.16, donde está representada la curva de R_{\max} de los complejos RP-130-Ag P-B (Monarch, $\lambda_0 = 570 \text{ nm}$, $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$) junto con la del diámetro medio de agregado (PCS) correspondiente a cada una de las diluciones de aglutinante (tabla 6.9). Se observa que la curva de R_{\max} llega a un "plateau" a 128 U.P-B/ml, mientras que los diámetros tienen un máximo claro en 64 U.P-B/ml. El propio sistema inmunológico favorece este comportamiento, como se deduce de los valores del índice de polidispersidad (i.p) de la tabla 6.9. El i.p de 128 y 256 U.P-B/ml indica que las distribuciones de tamaño son menos polidispersas que a 64 U.P-B/ml. En 128 y 256 U.P-B/ml comienza la inhibición de la reacción, por lo que los agregados son de menor tamaño, aunque al existir más cantidad de aglutinante, el número de dispersores será mayor que con 64 U.P-B/ml. Para poder observar la curva de inmuno-aglutinación completa, sería necesario utilizar un suero de mayor título, lo que en la zona de exceso de aglutinante daría lugar a distribuciones más monodispersas y con un número menor de agregados.

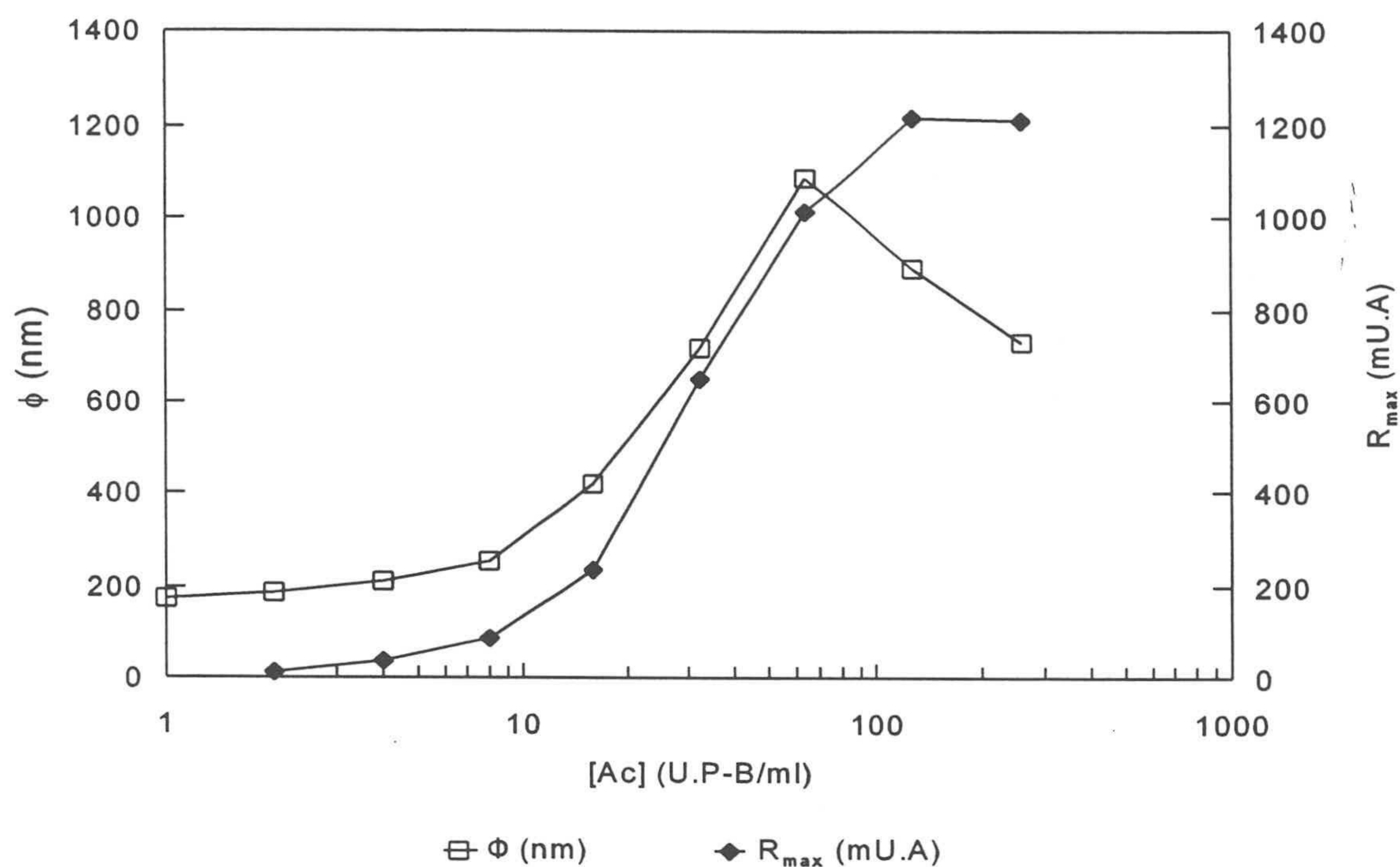


Figura 6.16. Curva de R_{\max} y tamaño de agregado (ϕ). RP-130 ($4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$).

| [Ac](U.P-B/ml) | ϕ (nm) | Polidispersidad (i.p) | R_{\max} (m.U.A) |
|----------------|---------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | 173 \pm 5 | 0.18 \pm 0.04 | - |
| 2 | 184 \pm 16 | 0.23 \pm 0.13 | 12.0 \pm 0.2 |
| 4 | 212 \pm 37 | 0.24 \pm 0.09 | 40.0 \pm 0.3 |
| 8 | 254 \pm 9 | 0.21 \pm 0.03 | 90 \pm 1 |
| 16 | 420 \pm 12 | 0.35 \pm 0.04 | 234 \pm 2 |
| 32 | 717 \pm 19 | 0.45 \pm 0.05 | 650 \pm 8 |
| 64 | 1089 \pm 53 | 0.56 \pm 0.09 | 1047 \pm 9 |
| 128 | 887 \pm 42 | 0.42 \pm 0.04 | 1216 \pm 6 |
| 256 | 729 \pm 53 | 0.40 \pm 0.03 | 1209 \pm 3 |

Tabla 6.9. Tamaños de agregado (ϕ) y R_{\max} del RP-130 ($4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$).

La confirmación de que el “plateau” de reactividad es una cuestión óptica, es el hecho de que varía en función de la longitud de onda de medida, y más concretamente, de la relación entre el diámetro de agregado y λ_0 (parámetro α). En la figura 6.17 (RP-130, $9.16 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$), están representadas varias curvas de R_{max} a distintas λ_0 (Monarch). Se observa que a baja longitud de onda (340 y 405 nm), las reactividades en el tramo 64-256 U.P-B/ml no se diferencian prácticamente entre sí, mientras que al pasar a una λ_0 de 500 nm, la manera de proceder se asemeja a las curvas de inmuno-aglutinación de Heidelberger-Kendall. Al disminuir la longitud de onda α aumenta y por tanto la luz dispersada, de manera que la R_{max} será mayor para todas las concentraciones de aglutinante. Cuando la distribución de tamaños tiene especies de gran diámetro o mucho número de partículas, el incremento de α puede dar lugar a valores de absorbancia similares, tal y como se ha podido comprobar en la figuras 6.16 y 6.17. Si α disminuye debido a un aumento de λ_0 , los sistemas con agregados de mayor tamaño (zona de equivalencia) son los que dispersan más luz, mientras que aquellos que disponen de un gran número de agregados pero de menos diámetro (zona de exceso de aglutinante) tendrán una R_{max} menor. En este caso, “pesa” más la disminución de la sección eficaz de dispersión debido a un aumento de λ_0 , que el hecho de que existan más dispersores que en la zona de equivalencia.

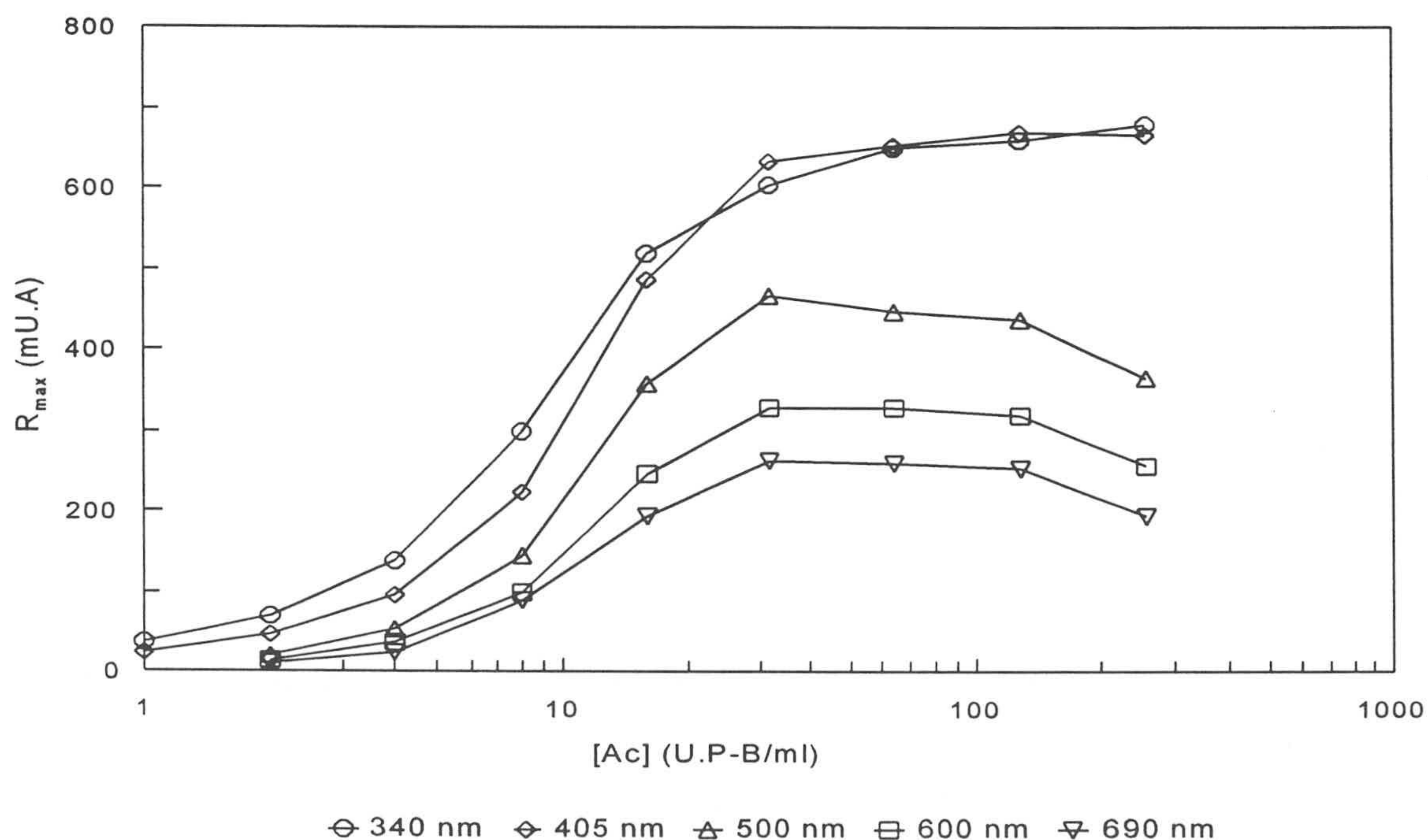


Figura 6.17 . Partícula RP-130 ($9.16 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Curvas de R_{max} obtenidas en el Monarch a distintas λ_0 (340, 405, 500, 600, 690 nm). Número medio de datos analizados por curva: 154.

Aunque el "plateau" de respuesta a alta concentración de aglutinante, se explica a partir de las teorías de dispersión de luz y se corrobora con las medidas de tamaño de agregado y de reactividad a distinta longitud de onda, cabe la posibilidad de que esté debido a la saturación óptica del instrumento. Cuando la absorbancia óptica supera un determinado valor, la respuesta del espectrofotómetro es la misma independientemente del estado de agregación o de N. En el RP-130 se dan unas condiciones "ideales" para que se produzca este fenómeno, sobre todo a alta concentración de aglutinante, donde los complejos Ix-Ag P-B son altamente reactivos. Con el RP-130, el "plateau" de R_{\max} se alcanza con dos valores distintos de absorbancia, 2 U.A para $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ y 2.4 U.A con $5.7 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, y en estas condiciones el instrumento no se encuentra saturado, ya que como se determinará en el siguiente apartado, el valor de saturación del Monarch está alrededor de 4 U.A.

De todos estos resultados se deduce que las técnicas turbidimétricas tienen en ciertos casos problemas a la hora de diferenciar los valores de respuesta a alta concentración de aglutinante, lo que sucede cuando las distribuciones de tamaño tienen un gran número de dispersores o si los agregados superan un determinado diámetro. En estos casos, el parámetro V_0 sirve para distinguir la capacidad de aglutinación de los complejos Ix-proteína (37, 38).

6.4.2. Partícula RP-214

El protocolo de sensibilización y bloqueo, así como el método de determinación de la cantidad de Ag P-B unida, son los mismos que en el caso anterior. Los complejos Ix-Ag P-B tienen un tamaño aproximado de 214 nm (P.C.S), lo que permite trabajar con un número de partículas mu

En la figura 6.18 se presentan los valores de R_{\max} (m.U.A) correspondientes al RP-214 con seis concentraciones diferentes de partículas, $1.4 \cdot 10^{10}$, $5.7 \cdot 10^{10}$, $7.5 \cdot 10^{10}$, $8.6 \cdot 10^{10}$, $1.2 \cdot 10^{11}$, $1.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ (Monarch, $\lambda_0=570 \text{ nm}$). El tiempo final de medida es de 100 segundos. Los datos experimentales así como los ajustes hiperbólicos están recogidos en el apartado 5.4.2.1.

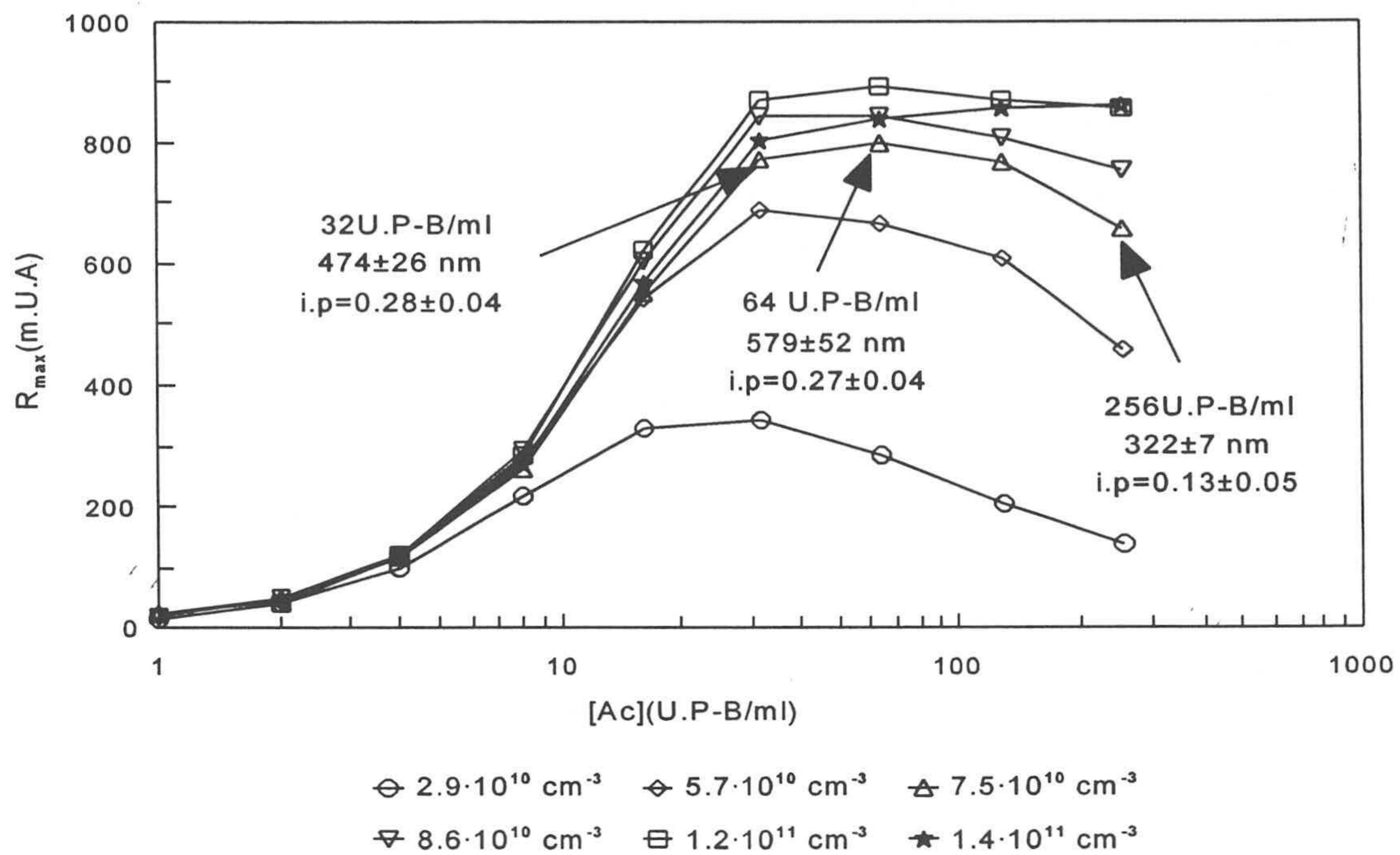


Figura 6.18. Partícula RP-214 (50 µg Ag/m²lx). R_{max} en función del número de partículas N. Número medio de datos analizados: 163.

Límite de detección

Es de 1 U.P-B/ml hasta 8.6·10¹⁰ cm⁻³, a partir de la cual pasa a ser de 2 U.P-B/ml para 1.2·10¹¹ cm⁻³ y de 4 U.P-B/ml con 1.4·10¹¹ cm⁻³. El aumento del número de partículas supone un agotamiento rápido del aglutinante, sobre todo en la zona baja, lo que conlleva una pérdida del número de datos útiles para el ajuste hiperbólico. La velocidad inicial es tan elevada que la reacción puede terminar en los primeros instantes, como sucede con 1.4·10¹¹ cm⁻³ para 1 y 2 U.P-B/ml.

Existe una mejora respecto del experimento de variación del grado de recubrimiento, ya que el tiempo total de medida es mucho menor. En la mayor parte de las concentraciones de partículas, el límite de detección es inferior al del RP-130, debido principalmente a la diferencia entre los diámetros iniciales de monómero, tal y como se verá en el apartado 6.4.3.

Rango de trabajo . Zona de equivalencia.

Para las primeras concentraciones, el punto de equivalencia está situado entre 16 y 32 U.P-B/ml, mientras que al incrementar el número de partículas pasa a estar entre 32 y 64 U.P-B/ml. Como ocurría en el límite de detección, al aumentar N se observa un descenso en el número de puntos del ajuste. El agotamiento del Ac P-B es más rápido cuanto mayor sea la cantidad de Ag P-B presente.

Al igual que sucedía en el RP-130, el instrumento de medida detecta la campana inmuno-aglutinación para baja concentración de partículas (figura 6.18) y no con distribuciones de un gran número de dispersores o de un diámetro de agregado muy elevado. En la gráfica 6.17 están recogidos el tamaño de agregado y el índice de polidispersidad correspondiente a 32 y 64 U.P-B/ml (zona de equivalencia) y a 256 U.P-B/ml (exceso de anticuerpo) para $7.5 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Se confirma que en las concentraciones altas de anticuerpo, los agregados tienen menor tamaño medio y una distribución menos polidispersa, comparados con los de la zona de equivalencia. Para observar toda la curva de inmuno-reactividad, sería necesario utilizar un aglutinante de un título mucho más elevado.

El "plateau" de R_{\max} se alcanza para dos absorbancias finales diferentes, 2.3 y 2.85 U.A con $1.2 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ y $1.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ respectivamente, valores que están todavía lejos del nivel de saturación del instrumento. Para determinar la absorbancia óptica que satura el Monarch 2000 I.L, se han realizado varias medidas con el RP-130 y el RP-214 a distintas concentraciones de partículas (dentro de cubeta) a una longitud de onda de 570 nm. De esta manera se simula el proceso de inmuno-aglutinación de los complejos Ix-Ag P-B por un aumento de la absorbancia. En las figuras 6.19-(a) y (b) se presenta la variación de la absorbancia en función del número de partículas $N(\text{cm}^{-3})$ para el RP-130 y el RP-214 respectivamente. Junto a los datos experimentales está representada la recta de ajuste lineal, al que se le ha exigido un nivel de probabilidad del 5% (ver capítulo 5). El coeficiente de correlación lineal es 0.997 (11 valores desde 0 hasta $3.14 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-3}$) para el RP-130 mientras que en el RP-214 es de 0.993 (9 valores, de 0 hasta $7.4 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). De aquí se deduce que el Monarch 2000 I.L es lineal hasta una absorbancia alrededor a 4 U.A. Este valor de saturación es orientativo, ya que un sistema en aglutinación no tiene porque tener el mismo comportamiento que uno monodisperso (tamaño, polidispersidad, forma del agregado, etc).

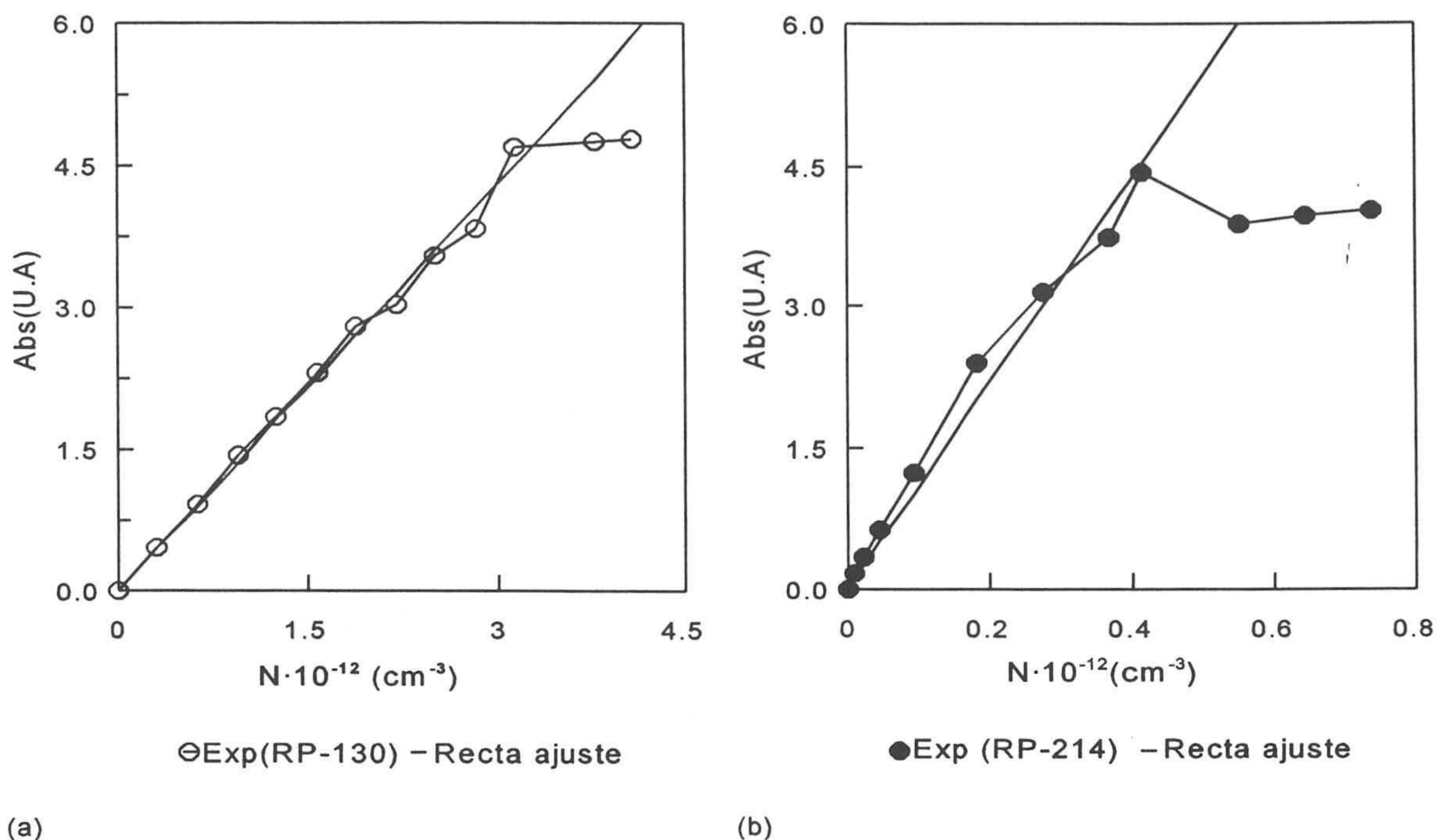


Figura 6.19. Saturación óptica del Monarch 2000 I.L. Variación de la absorbancia óptica con N. Partículas: (a) RP-130 y (b) RP-214 .

Otro resultado interesante es que si el número de partículas es muy elevado y para una concentración fija de aglutinante, R_{max} tiene un valor máximo o incluso disminuye un poco, lo que podría estar relacionado con el agotamiento del aglutinante debido al exceso de proteína de sensibilización. La pérdida de capacidad aglutinadora de los complejos ($n_A/n \downarrow$) está compensado por el número de partículas, pero no es suficiente como para incrementar la reactividad. Todo esto se puede ver figura 6.20-(a), donde está representado el cambio de R_{max} con N para 16, 64 y 256 U.P-B/ml. Sin embargo, al haber más choques eficaces la velocidad inicial es mayor, ya que V_0 es directamente proporcional a N (figura 6.20-(b)). Véase que V_0 es lineal con el número de partículas por debajo de 64 U.P-B/ml, lo que estaría de acuerdo con los resultados del capítulo 3, donde el modelo teórico es válido para concentraciones de aglutinante por debajo del punto de equivalencia (ver tablas 6.18).

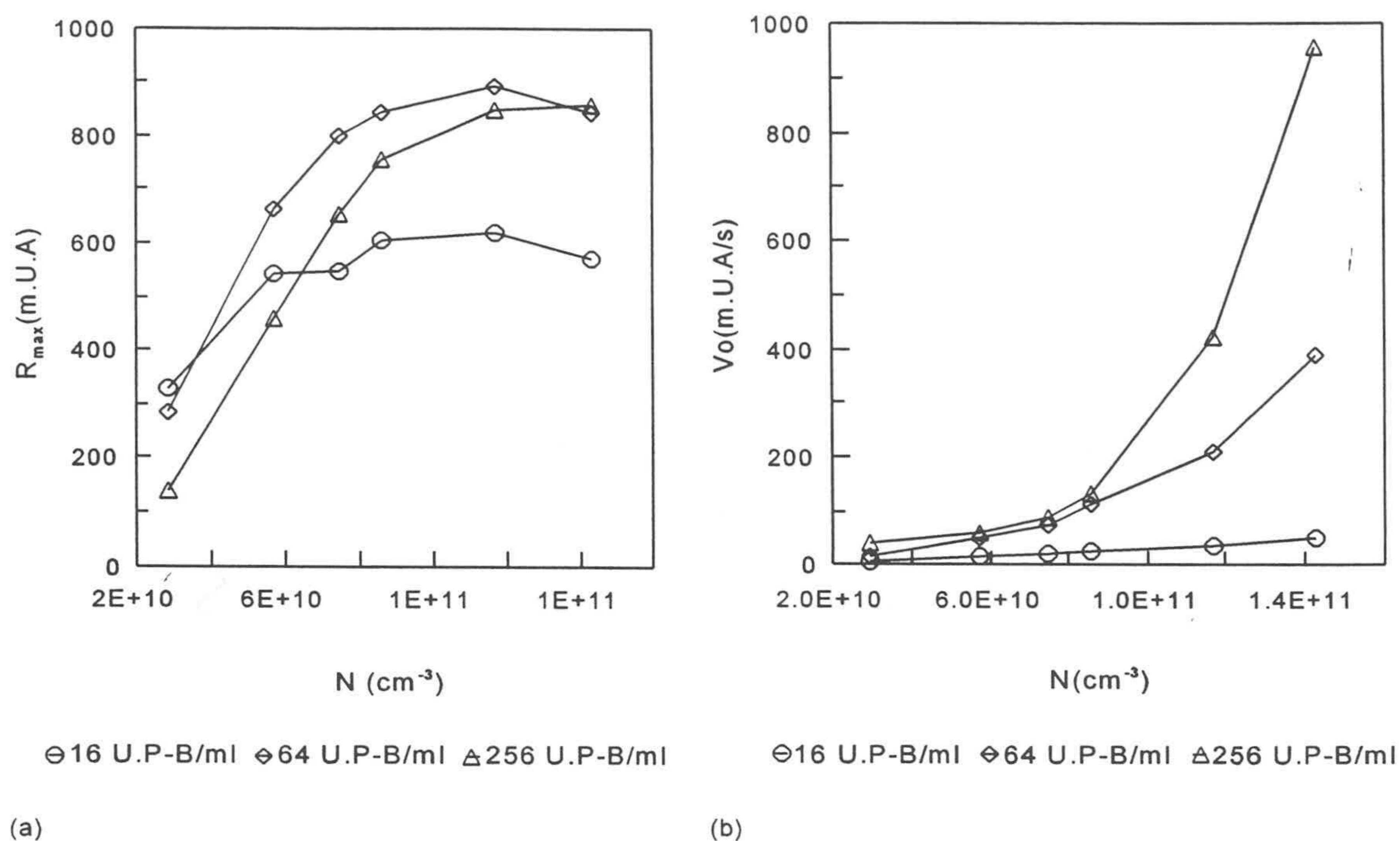


Figura 6.20. Partícula RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). Concentración de aglutinante : 16, 64 y 256 U.P-B/ml. (a) Variación de R_{max} en función del número de partículas N . (b) Cambio de V_0 con N .

6.4.3. Variación del número de partículas. Análisis comparativo de la reactividad de los complejos RP-130-Ag P-B y RP-214-Ag P-B

Como estos dos complejos Ix-Ag P-B tienen un tamaño inicial tan diferente, no se puede comparar su reactividad en función del número de partículas. En estas condiciones el RP-214 sería siempre el más reactivo, por tener mayor diámetro y recubrimiento, como se puede ver en la figura 6.21, donde está representada la variación de R_{max} para el RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, $1.0 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) y el RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, $1.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$). Por este motivo, se utiliza habitualmente la absorbancia inicial como parámetro de comparación (figura 6.22). En esta gráfica se presentan dos curvas de reactividad, una del RP-130 ($5.7 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) y otra del RP-214 ($7.5 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$), ambas con una absorbancia inicial aproximadamente igual a la unidad. En las figuras 6.21 y 6.22 se presentan dos gráficas, que en realidad son la misma; la de la izquierda es la representación logarítmica-lineal de las curvas, mientras que la de la derecha es log-log. Esta última facilita la visualización de las diferencias entre ambas partículas, sobre todo en la zona de baja cantidad de aglutinante. Aunque los monómeros tienen distinto grado de recubrimiento, los resultados de la figura 6.21 se pueden justificar

a partir de los estudios teóricos realizados en el capítulo 3.

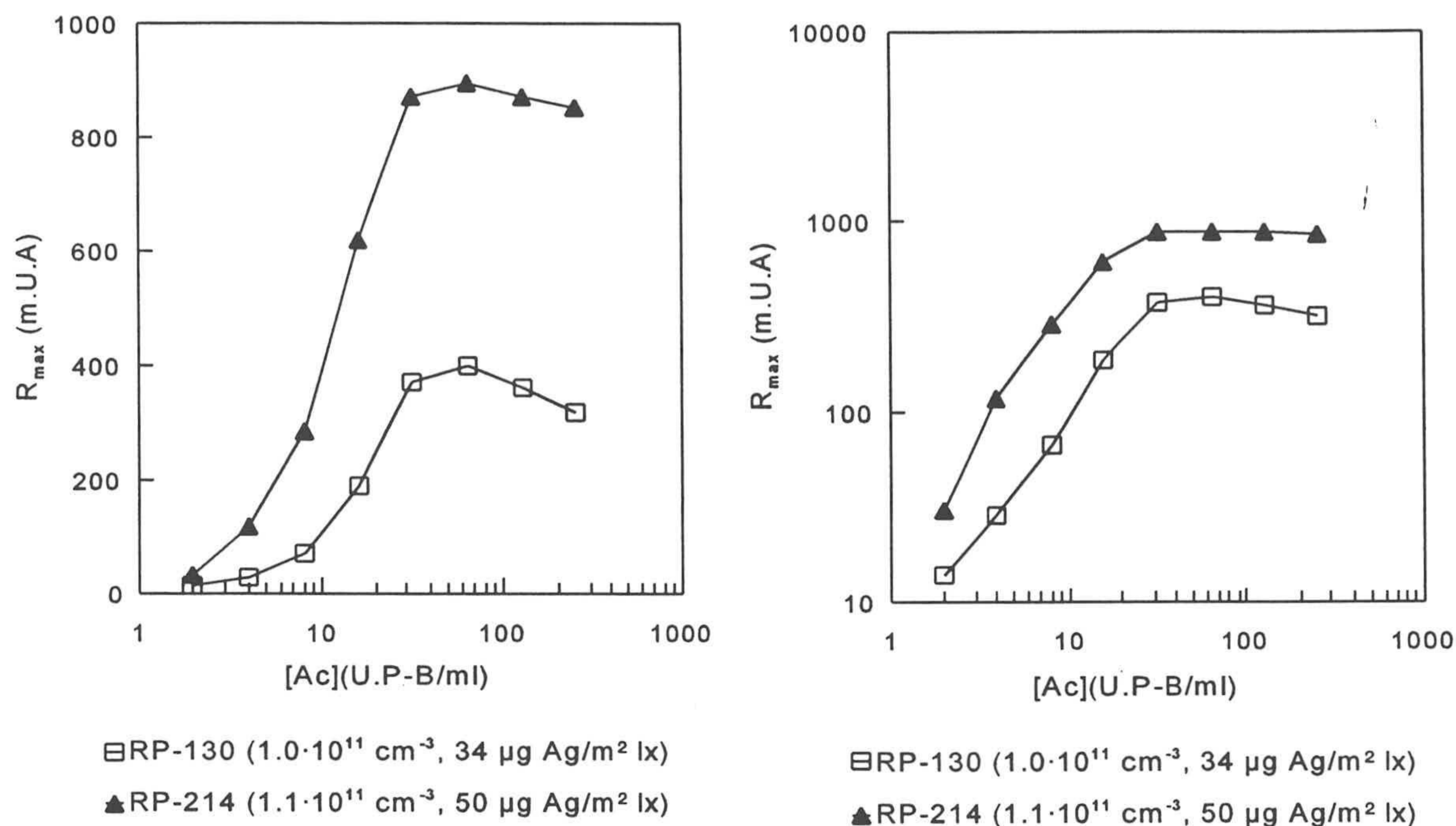


Figura 6.21. RP-130 ($34 \mu\text{g Ag P-B/m}^2 \text{ lx}$) y RP-214 ($50 \mu\text{g Ag P-B/m}^2 \text{ lx}$). Comparación de R_{max} a igual número de partículas ($\approx 1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$).

- ▶ Límite de detección. Para concentraciones bajas de aglutinante, la de mayor diámetro es la que tiene más respuesta.
- ▶ Punto de equivalencia. En esta zona, la partícula de menor tamaño es la más reactiva.
- ▶ Concentración de aglutinante en el punto de equivalencia. La cantidad de Ac correspondiente a esta zona es inversamente proporcional al diámetro inicial de monómero.

La elección de las condiciones finales del ensayo tras los experimentos de grado de recubrimiento y de número de partículas, deberían realizarse en base al límite de detección, rango de trabajo, especificidad y estabilidad coloidal, tal y como se ha comentado a lo largo de este capítulo. Sin embargo, en este caso se ha escogido el monómero RP-130, atendiendo sólo a su rango de trabajo. Aunque no tenga una buena reactividad en la zona de baja concentración de aglutinante, los experimentos de variación de los parámetros del medio de reacción, pH, naturaleza del electrolito y fuerza iónica, tienen por objetivo estudiar el efecto de estas variables sobre la reacción antígeno-anticuerpo e intentar mejorar el límite de detección.

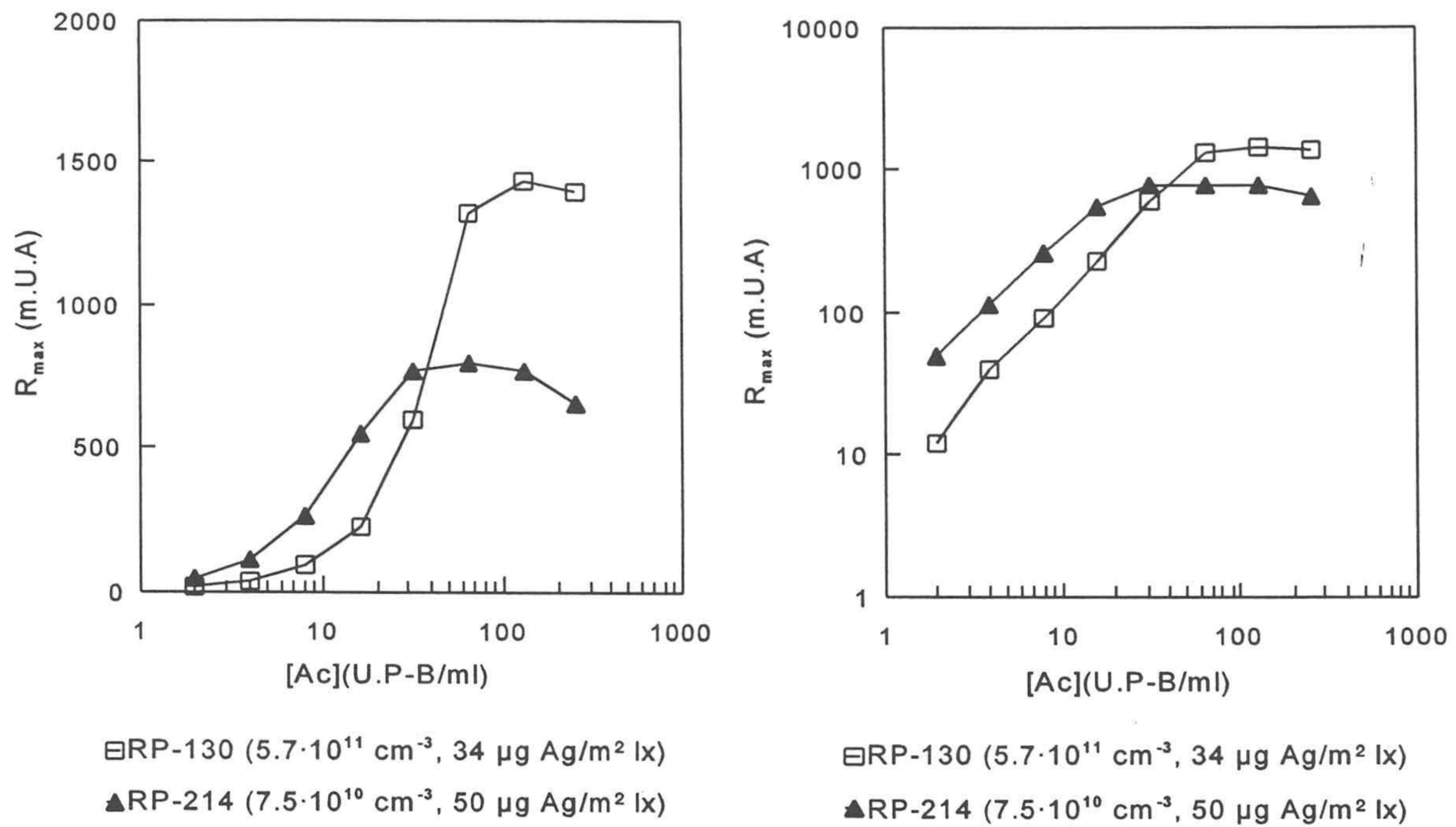


Figura 6.22. RP-130 ($34 \mu\text{g Ag P-B/m}^2 \text{ lx}$) y RP-214 ($50 \mu\text{g Ag P-B/m}^2 \text{ lx}$). Comparación de R_{max} a igual absorbancia inicial ($A_0 \approx 1$).

Finalmente, las condiciones que se han elegido como óptimas son las siguientes:

- ▶ Monómero: RP-130.
- ▶ Grado de recubrimiento: $34 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$.
- ▶ Número medio de partículas en el medio de reacción: $4.1 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. Esta concentración tiene una R_{max} similar a la de N mayores en la zona de baja concentración de aglutinante. Sin embargo, en la zona alta existe un "plateau" de respuesta que impide determinar con claridad el rango de trabajo del reactivo. Para esto habría que utilizar un agregante de mayor título o una longitud de onda más elevada.

6.5 Parámetros ópticos: estudio de la inmuno-aglutinación a distinta longitud de onda

Tras estudiar los parámetros propios del reactivo, se examinará el efecto que tiene la longitud de onda en la inmuno-reactividad del sistema. Como se comentó al principio de este capítulo, además de λ existen otros parámetros ópticos, dentro de los cuales está el tamaño de partícula, el número de dispersores, el índice de refracción, etc. En alguno de ellos ya se ha evaluado su influencia a nivel óptico, como sucede con el diámetro de agregado y el número de partículas (apartado 6.4.1). Otros se verán más adelante, cuando se estudien los parámetros del medio de reacción (índice de refracción).

El objetivo de este experimento es comprobar si existen unas condiciones de tamaño, longitud de onda, etc donde el inmuno-ensayo tenga su máxima respuesta. En el apartado 3.5.1 se comprobó que este máximo aparece para un α alrededor de 5, lo que se confirma calculando la derivada de Q_{sca} (figura 2.3) respecto de α , tal y como se presenta en la figura 6.23. La función Q_{sca} representa la fracción de energía por unidad de superficie que se dispersa en todas las direcciones y puede servir para estudiar como varía la reactividad en función del tamaño del complejo Ix-proteína o de la longitud de onda.

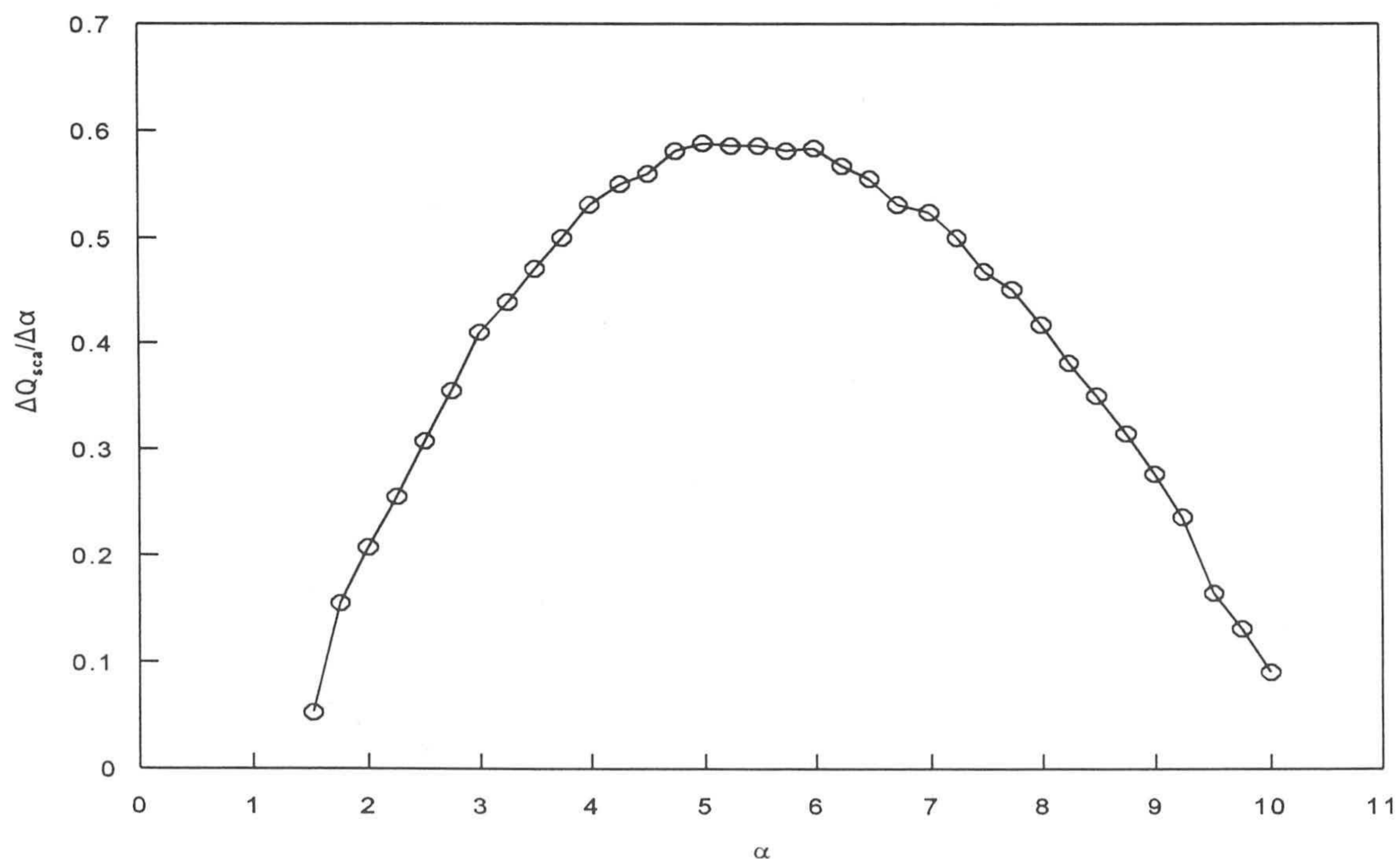


Figura 6.23. Teoría de Mie. Derivada de Q_{sca} respecto de α ($\Delta Q_{sca} / \Delta \alpha$).

Para determinar cuales son las condiciones experimentales que dan lugar a la máxima respuesta, se han probado dos tamaños diferentes de monómero, RP-130 y RP-214, con distinto número de partículas y concentración de aglutinante. El espectrofotómetro que se ha utilizado es el Shimadzu UV 2101 PC, ya que este instrumento permite realizar un seguimiento casi simultaneo de la reacción a distintas longitudes de onda (340-700). La variación provocada en la respuesta por el tiempo de barrido (~10 segundos) es mínima, sobre todo cuando han pasado los primeros instantes de reacción, que es donde se produce el mayor cambio de la absorbancia óptica.

6.5.1 RP-130

En este caso se ha utilizado una única concentración de partículas ($9 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) y de agregante. En este caso se ha utilizado el aglutinante de 256 U.P-B/ml diluido 1/4 (64 U.P-B/ml). Estas condiciones simulan a las de máxima reactividad obtenidas con el RP-130 en el Monarch. Los volúmenes de reacción, reactivo látex, tampón y muestra se han adaptado para que no exista saturación óptica del instrumento y los valores finales de respuesta se deban única y exclusivamente a la reacción inmunológica. Para realizar la línea base del instrumento se ha utilizado el tampón de dilución de los complejos, el tampón de reacción y la muestra. Existe la posibilidad de que la absorbancia afecte al valor final de la reactividad, sobre todo a baja longitud de onda, donde las muestras pueden tener una absorbancia óptica significativa. El tiempo final de medida es de unos 10 minutos aproximadamente. Este intervalo de medida es mayor que el utilizado hasta ahora, ya que es necesario que los tamaños de agregado sean elevados para poder observar el máximo de reactividad. Además hay que minimizar el efecto del tiempo de barrido sobre el resultado final.

La figura 6.24 presenta la variación del incremento de absorbancia ΔA (adaptación final-cero) en función de la longitud de onda para distintos instantes de la reacción (40, 100, 160, 340, 460 y 610 s). Se observa que el máximo de respuesta comienza a los 160 s a una longitud de onda de 350 nm, y a partir de ese momento va desplazándose hacia λ_0 mayores, hasta situarse entre 370 y 380 nm a los 10 minutos de medida.

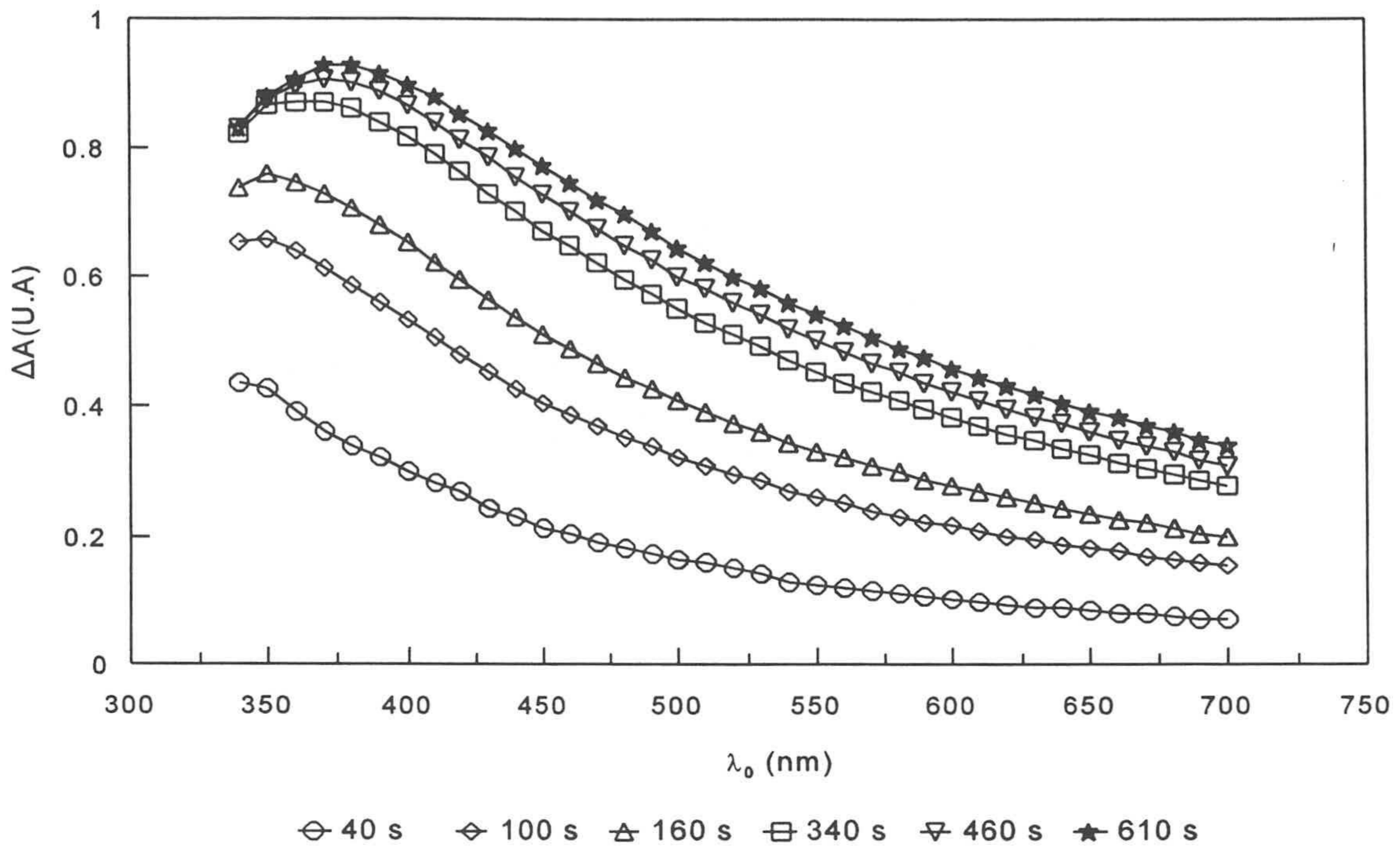


Figura 6.24. Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $9.1 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) Variación de la respuesta (ΔA) en función del tiempo (40, 100, 160, 340, 460, 610 s) y λ_0 (340-700 nm). $[\text{Ac}] = 64 \text{ U.P-B/ml}$.

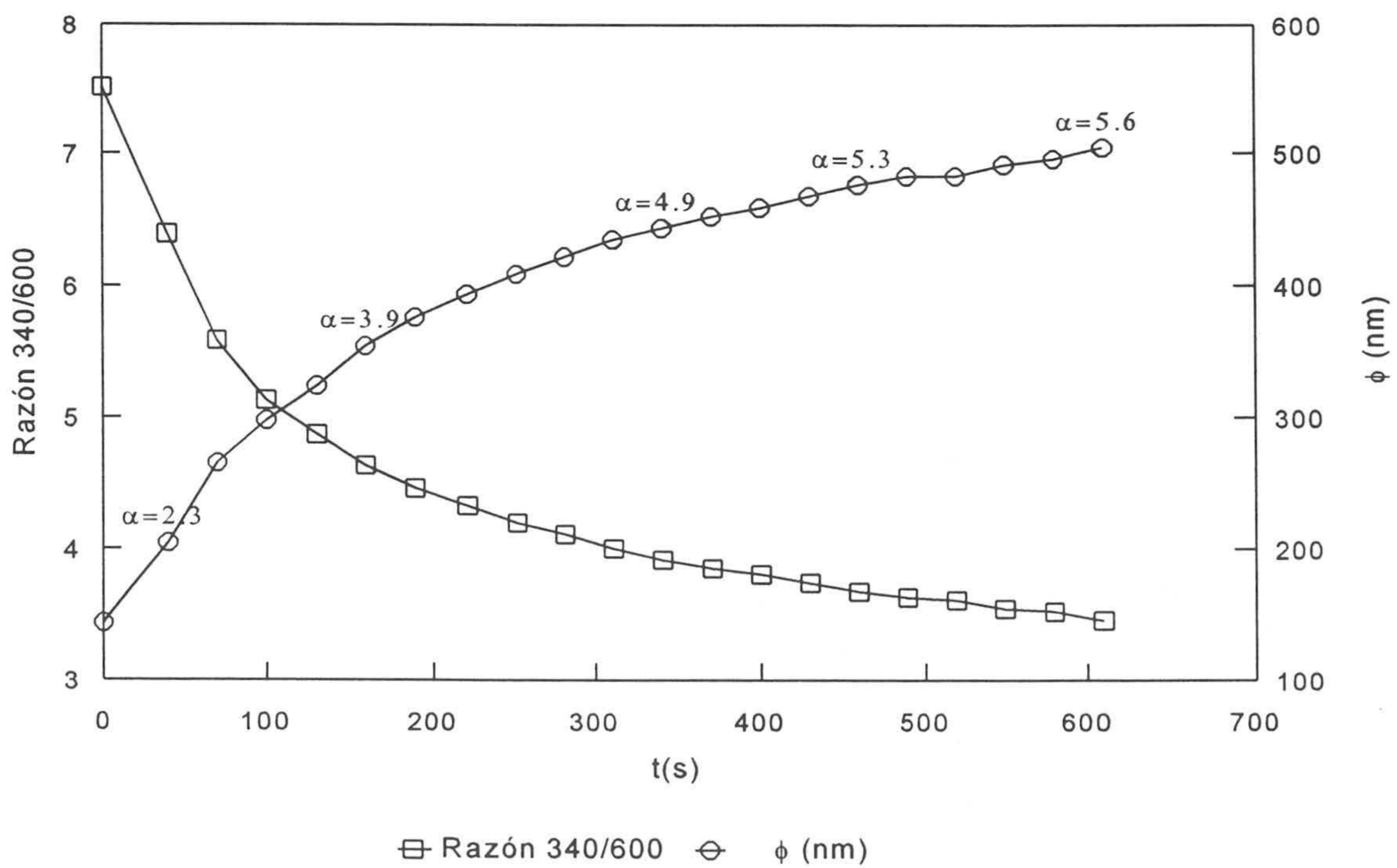


Figura 6.25. RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $9 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$). Evolución de la razón 340/600 y de ϕ (nm). Valores de α ($\lambda_0 = 380 \text{ nm}$) calculados a 40, 100, 160, 340, 460 y 610 s.. $[\text{Ac}] = 64 \text{ U.P-B/ml}$.

La evolución temporal de la razón 340/600 junto con su correspondiente tamaño de agregado están recogidos en la figura 6.25. El valor de α calculado a una longitud de onda de 380 nm (curva de diámetros) está entre 5 y 6 cuando el tiempo de medida supera los 340 s, instante en el que el máximo se sitúa a esa λ_0 (figura 6.24). Todo esto confirma el resultado teórico de Mie que emplaza a la máxima respuesta en una zona de α entre 5 y 6 (figura 6.23). Por otro lado, se comprueba la validez del cociente de absorbancias 340/600 para el seguimiento de la inmuno-aglutinación, hecho que se pudo constatar no solo en este experimento, sino también en el de la determinación de la dimensión fractal (apartado 6.9).

6.5.2 RP-214

En este caso, al ser un monómero mayor que el RP-130 se pueden conseguir agregados de más tamaño con menor número inicial de partículas y concentración de aglutinante, lo que finalmente supone un aumento de la longitud de onda correspondiente al máximo. En efecto, en la figura 6.26 se presentan las curvas $\Delta A-\lambda_0$ frente al tiempo para una concentración de partículas de $2.1 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ y 16 U.P-B/ml (zona de equivalencia), donde se observa que la máxima respuesta a los 10 minutos está en los 400 nm. Tal y como sucedía en el RP-130, el valor de α (400nm) crece con el tiempo hasta situarse entre 5 y 6 para el valor máximo.

El resultado de la figura 6.26 se ha obtenido también con una cantidad de aglutinante de 128 U.P-B/ml, concentración perteneciente a la prozona inhibitoria de la curva de inmuno-aglutinación. En la figura 6.27 se observa que a los 10 minutos el máximo de reactividad se alcanza entre 390 y 400 nm, por lo que el diámetro de agregado es muy similar al de 16 U.P-B/ml en ese mismo instante de tiempo. Esto confirmaría lo que se obtuvo en las medidas de tamaño por P.C.S para el RP-130 (tabla 6.9), donde algunas distribuciones de la zona de equivalencia y de exceso tienen el mismo tamaño medio, pero unos valores de reactividad completamente diferentes. La diferencia radica en el número de dispersores que componen el sistema y en la polidispersidad del mismo.

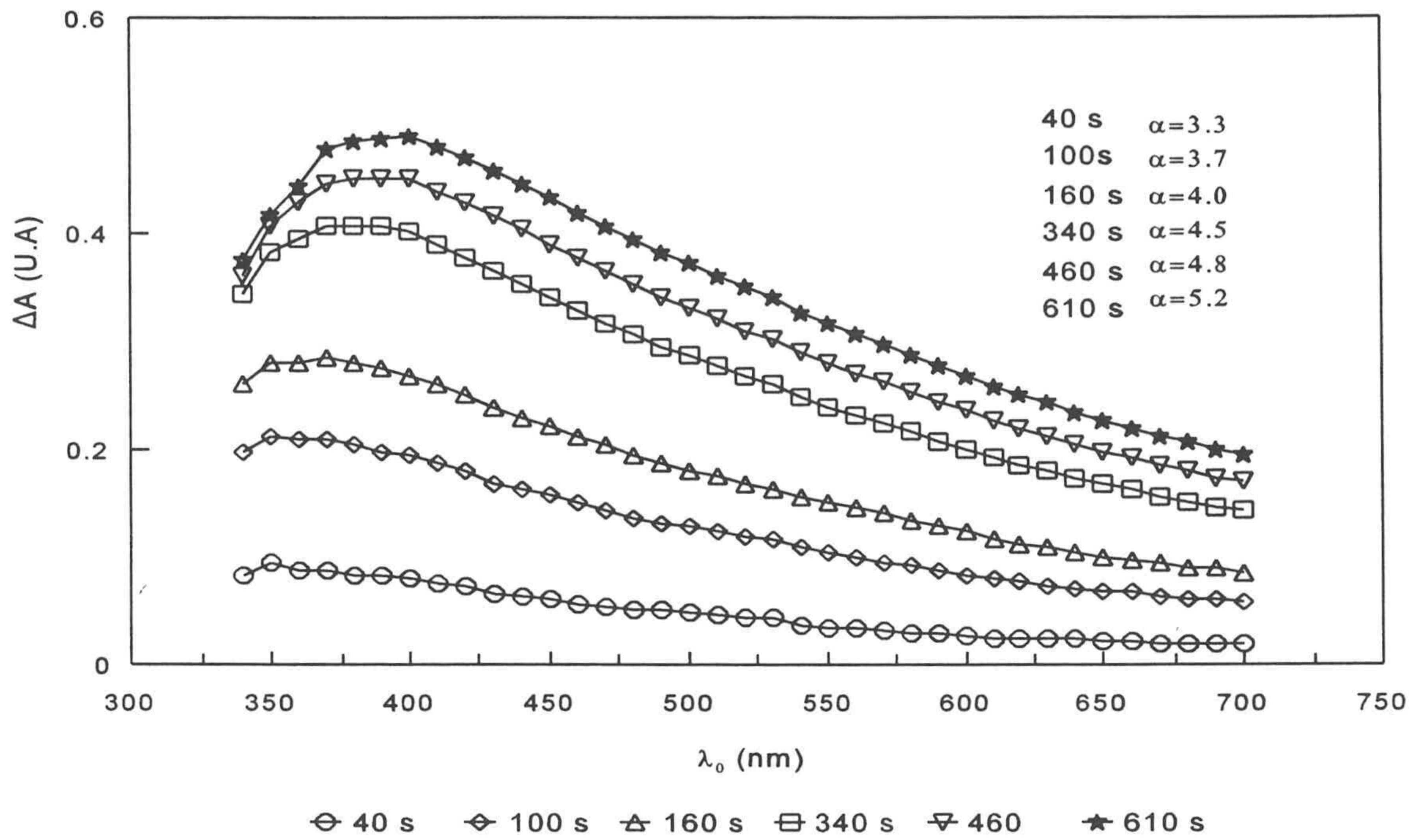


Figura 6.26. Partícula RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $2.1 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ Variación de la respuesta (ΔA) en función del tiempo (40, 100, 160, 340, 460, 610 s) y λ_0 (340-700 nm.). $[\text{Ac}] = 16 \text{ U.P-B/ml}$. Los valores de α de la tabla están calculados a una λ_0 de 400 nm.

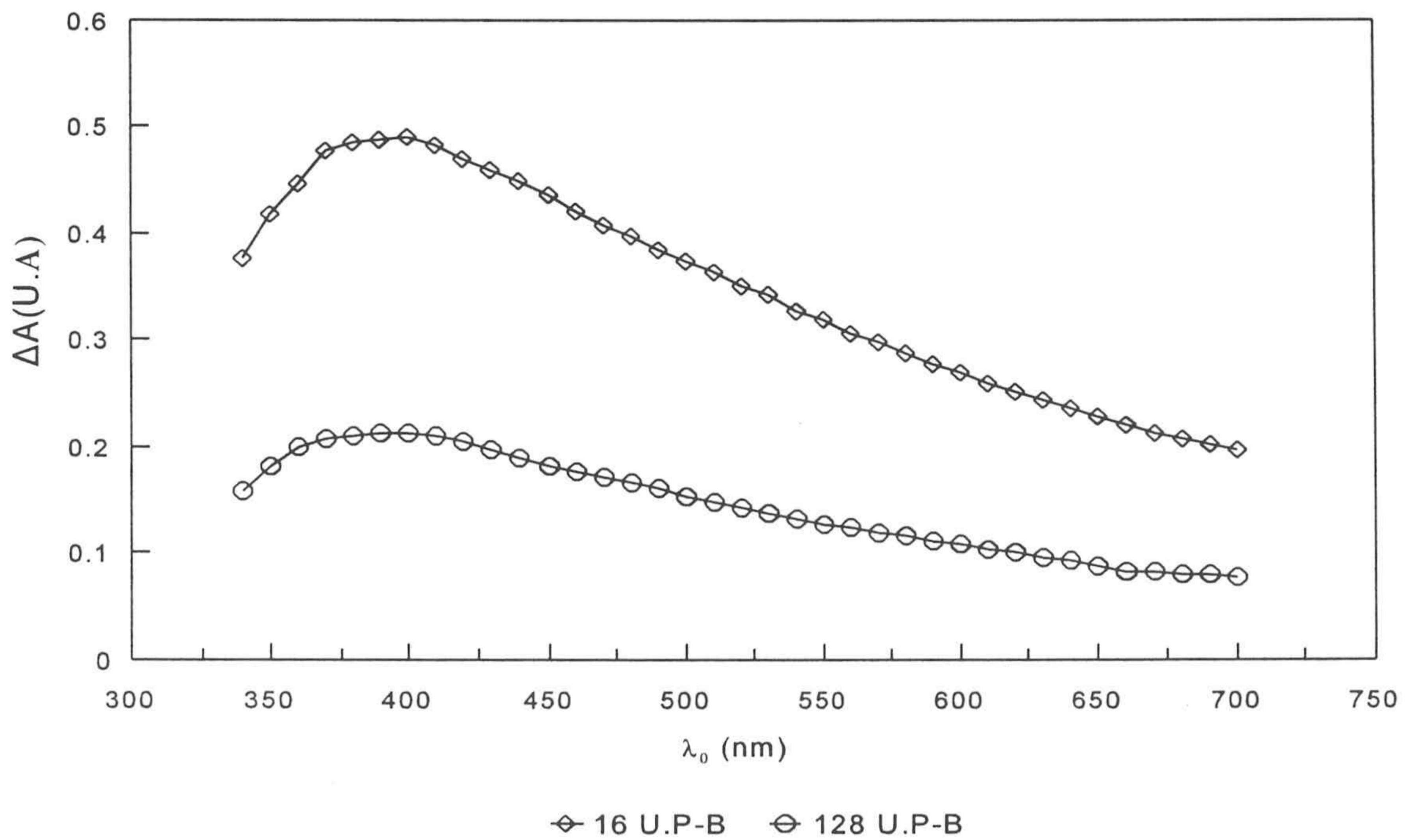


Figura 6.27. Variación de la respuesta (ΔA) a los 610s y λ_0 (340-700 nm) para dos concentraciones de aglutinante, 16 y 128 U.P-B/ml. RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $2.1 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$).

Finalmente, aunque los cambios de absorbancia producidos por la inmunoglutinación se observan mucho mejor a baja longitud de onda (39), hay que tener en cuenta que la adaptación es una final-cero (capítulo 5), por lo que en el valor de la respuesta está incluida la absorbancia de la muestra. Si esta absorbancia es muy elevada, como sucede en un gran número de sueros, el título final de Ac P-B suministrado por la técnica turbidimétrica será erróneo. Por ejemplo, en medidas realizadas a una λ_0 de 340 nm en el Monarch sin añadir reactivo látex, la absorbancia del agregante de 256, 128 y 64 U.P-B/ml es de 60, 40 y 30 m.U.A respectivamente. Este es el motivo por el que no se ha bajado de 570 nm, a pesar de que se podría conseguir más respuesta utilizando mucho menos volumen de reactivo látex o de tampón.

6.6 Parámetros del medio de reacción: interacción primaria y secundaria

6.6.1. Introducción: la reacción Ag-Ac

La reacción entre un antígeno y su anticuerpo correspondiente depende de la unión no covalente entre los fragmentos específicos del Ac y los determinantes antigénicos del Ag. Para que este enlace sea posible es necesario que se cumplan dos (40) condiciones principalmente:

- ▶ El Ag y el Ac han de ser esteroquímicamente complementarios, lo que se representa habitualmente por el símil de la “llave-cerradura”. La estructura del fragmento específico tiene que “encajar” perfectamente en el epítopo para que el inmuno-complejo sea estable.
- ▶ Los parámetros del medio deben favorecer el enlace Ag-Ac y evitar su disociación. Las condiciones de reacción afectan a las distintas fuerzas intermoleculares que intervienen en la unión Ag-Ac. Factores tales como el pH, fuerza iónica o la temperatura, etc pueden llegar incluso a impedir la unión, aunque exista una complementariedad esteroquímica entre las moléculas.

La interacción entre un antígeno y su anticuerpo puede considerarse con cierto grado de simplificación como un proceso dividido en dos partes (41):

- ▶ Interacción primaria. Es una reacción de corta duración que determina la especificidad del

enlace. Las fuerzas intermoleculares que intervienen son de largo alcance, como las coulombianas y van der Waals. En esta parte de la reacción, la estabilidad coloidal del sistema se podría explicar a partir de la teoría DLVO, teoría que describe (ver también apartados 4.2.1.3 y 5.2.5) la energía de interacción total entre dos partículas como la suma de la fuerza atractiva de van der Waals y la repulsiva de carácter electrostático. Sin embargo, como se verá más adelante, en el caso concreto de un inmuno-ensayo de soporte coloidal, existen una serie de factores que impiden la correcta aplicación de la teoría DLVO (42). Por un lado las partículas no son completamente esféricas, ya que al estar recubiertas de proteínas presentan rugosidades en su superficie. Además los sistemas no son diluidos, ya que para “visualizar” la reacción es necesario un número elevado de dispersores. Otra cuestión es que la teoría DLVO no tiene en cuenta la hidrofobicidad de las superficies. Todas estas desviaciones respecto a modelo teórico se han podido comprobar a nivel experimental y han supuesto la inclusión dentro de la teoría DLVO de las denominadas fuerzas estructurales (estéricas e hidratación). Estas últimas son de más corto alcance que las coulombianas y las de van der Waals.

► Interacción secundaria. En esta fase es donde se alcanza la estabilidad conformacional de la unión Ag-Ac. Las interacciones son de más corto alcance, como puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, etc. El tiempo de actuación es muy elevado, pudiendo ser de horas o incluso días.

A continuación y en primer lugar se describirán las fuerzas implicadas en la interacción primaria y secundaria. A continuación se estudiarán los distintos factores del medio de reacción y como afectan a los dos tipos de interacción. Finalmente se presentarán los resultados correspondientes a la variación del pH, naturaleza del electrolito y fuerza iónica del medio de reacción y su efecto sobre el valor de R_{\max} y V_0 . En todos estos experimentos se utilizarán los complejos Ix-Ag P-B obtenidos por el método descrito en el apartado 5.2 y en las condiciones que se consideraron como óptimas tras el estudio de las variables propias del reactivo y de la longitud de onda.

6.6.2 Interacción primaria.

La interacción primaria se caracteriza por actuar durante un corto instante de tiempo (segundos o minutos) y en la mayor parte de los casos es la combinación de las fuerzas de van der Waals y las coulombianas. El mecanismo “llave-cerradura”, propuesto inicialmente por Erhilich, consiste en un “ajuste” de las proteínas mediante la atracción de van der Waals

unido a la máxima yuxtaposición de las cargas eléctricas de los fragmentos específicos del Ac y los determinantes antigénicos del Ag. A pesar de que el enlace primario es el responsable de la especificidad del enlace, su contribución a la energía total de unión es muy baja si se compara con la secundaria (41). La distancia a partir de la cual el Ag y el Ac comienzan a sentirse atraídos, es de aproximadamente de 100Å para las fuerzas de carácter coulombiano y de 1000Å o más para las de van der Waals.

La densidad de carga de las partículas de un coloide proviene de sus grupos superficiales y es función del número total de iones en superficie y del grado de disociación de los mismos. En partículas de poliestireno no sensibilizadas los grupos que determinan la carga pueden ser de diferentes tipos, como sulfato, sulfonato, carboxilo, etc dependiendo del método de síntesis, mientras que en un reactivo inmunológico de base coloidal, los grupos cargados provienen de la proteína (amino, carboxilo, etc). Tanto en un caso como en otro, la densidad de carga varía controlando el equilibrio de disociación de los iones superficiales, lo que en la práctica se consigue modificando el pH del medio.

Si las partículas que forman una disolución tienen carga neta, la electroneutralidad del sistema exige que el medio que las rodea tenga la misma magnitud de carga pero de signo contrario. Entre ambas fases aparece una diferencia de potencial que dependerá de la naturaleza y composición de las mismas (en un inmuno-ensayo de soporte coloidal la interfase es sólido-líquido). La ordenación de las cargas en ambas fases es lo que se conoce por doble capa eléctrica (d.c.e) y su estructura y composición es uno de los factores que determina el comportamiento de las partículas en disolución. Dentro de la d.c.e existen dos zonas claramente definidas, una interior muy compacta formada por los iones adsorbidos debida a la interacción electrostática y otra más alejada de la superficie y menos compacta, donde la interacción coulombiana es comparable a la agitación térmica del líquido. Esta zona se conoce como capa difusa de la d.c.e. A partir de este esquema de la doble capa eléctrica se desarrollaron una serie de modelos, como son el de Gouy-Chapman (43, 44), con las aproximaciones de Debye-Hückel (45) y el de Stern (46).

En los años cuarenta se formuló la teoría clásica de la estabilidad coloidal, que por primera vez reunía en una sola expresión la energía de repulsión electrostática y de atracción de van der Waals entre dos d.c.e. Según esta teoría, la energía libre de interacción (V_T) entre dos esferas en el seno de una disolución viene dada por:

$$V_T = V_A + V_R \quad [6.1]$$

donde V_A corresponde al término atractivo y V_R al electroestático o repulsivo.

Interacción atractiva: fuerzas de van der Waals

Entre los átomos/moléculas que se encuentran suficientemente próximos/as, existe una atracción mutua debida a la interacción entre los dipolos oscilantes. Los átomos/moléculas pueden adquirir una distribución eléctrica asimétrica debido a un movimiento de la nube electrónica, lo que induce otra deformación en los átomos/moléculas vecinos. Esta situación dura muy poco tiempo, ya que un instante después la orientación será distinta, así como la inducción, etc. Las fuerzas interatómicas e intermoleculares originadas de esta manera reciben el nombre de van der Waals o de dispersión.

Esta interacción aumenta con el volumen molecular, ya que en tales condiciones las capas electrónicas se deforman con mayor facilidad. Varían también en función de las condiciones físico-químicas del medio de reacción, al igual que le sucede a las culombianas.

La energía potencial atractiva entre partículas esféricas de radio R se expresa normalmente en términos de la constante de Hamaker A (47, 48), constante que depende de la naturaleza de las partículas y del medio de dispersión. Una buena aproximación en el caso de distancias cortas ($H/R < 1$) y para partículas iguales es

$$V_A = -\frac{AR}{12H} \quad [6.2]$$

donde H es la distancia entre las esferas. Vease que V_A depende de H y es independiente de la concentración de electrolito del medio.

Interacción repulsiva: fuerzas culombianas

A partir del modelo de doble capa del Gouy-Chapman, con un potencial superficial Ψ_0 , V_R se puede aproximar por:

$$V_R = 2\pi\epsilon_c\epsilon_0R \left(\frac{4KT}{ze}\gamma\right)^2 \ln[1 - \exp(\kappa H)] \quad [6.3]$$

donde ϵ_c es la constante dieléctrica del medio, ϵ_0 la permitividad del vacío, κ la inversa de la anchura de la d.c.e (longitud de Debye-Hückel) y z la carga del contraión. γ , κ , z vienen dadas por las expresiones:

$$\gamma = \frac{\exp(\frac{z}{2}) - 1}{\exp(\frac{z}{2}) + 1} \quad [6.4]$$

$$\kappa = \left(\frac{e^2}{\epsilon \epsilon_0 K T} \sum n_i^0 z_i^2 \right)^{1/2} \quad [6.5]$$

$$z = \frac{v e \Psi_0}{K T} \quad [6.6]$$

donde el sumatorio $\sum n_i^0 z_i^2$ es igual a dos veces la fuerza iónica del medio, n_i el número de contraiones de la especie i , z_i la carga y v su valencia. En las expresiones [6.3]-[6.6] se recoge la contribución que tienen algunos factores del medio (pH, fuerza iónica y naturaleza del electrolito) sobre la interacción de origen electrostático y por consiguiente en la estabilidad coloidal del sistema. El pH afecta a la densidad de carga de la partícula y por tanto al potencial superficial Ψ_0 (expresión [6.6]), mientras que la fuerza iónica lo hace sobre la anchura de la doble capa eléctrica. Un incremento en la concentración de electrolito aumenta el valor de κ (apantallamiento de la carga), lo que supone una disminución de la energía coulombiana repulsiva que mantiene estable al sistema. En el caso de las proteínas o de coloides sensibilizados, la influencia de estos parámetros es más difícil de interpretar, tal y como se ha comentado anteriormente, ya que además de estos factores están otros como la naturaleza de las moléculas (hidrofobicidad), la presencia de iones caotrópicos/anticaotrópicos en el medio de reacción, etc. De todas formas, aunque estas ecuaciones no sean válidas en todos los casos, sí que sirven para prever el efecto del medio de reacción sobre el enlace antígeno-anticuerpo. Para completar la teoría DLVO es necesario introducir las denominadas fuerzas estructurales.

Fuerzas estructurales

Este tipo de fuerzas aparecen en sistemas coloidales donde las partículas tienen macromoléculas adsorbidas como es el caso de los inmuno-ensayos turbidimétricos de soporte coloidal. Las interacciones estructurales se pueden dividir en dos grandes grupos, las estéricas y las de hidratación.

► Interacción estérica (V_{est}). Se debe a la contribución de dos efectos, el osmótico y el elástico (49- 52). Cuando dos partículas se acercan, cubiertas ambas con una capa de proteína de espesor δ , si la distancia es inferior a 2δ , la presión osmótica del disolvente en la zona de contacto es menor que en la región externa a la misma. Esta diferencia de presión da lugar a un flujo espontáneo de disolvente hacia la zona de contacto, lo que tiende a separar a las partículas. La contribución de este efecto a la energía total de interacción se cuantifica mediante la expresión:

$$V_{osm} = 4\pi R \frac{\phi_2^2}{v_1} \left(\frac{1}{2} - \chi\right) \left(\delta - \frac{H}{2}\right)^2 \quad [6.7]$$

donde v_1 es el volumen molar del disolvente, ϕ_2 la fracción de volumen efectivo de proteína presente en la superficie y χ el parámetro de solvencia de Flory-Huggins.

Por otro lado, si las partículas están a una distancia inferior a δ , se produce una pérdida de la libertad conformacional de las proteínas debido a la compresión elástica de las cadenas. Esto implica la aparición de un potencial de interacción repulsivo, cuya expresión es la siguiente:

$$V_{el} = \left(2\pi R \frac{\phi_2^2 \delta^2 \rho_2}{M}\right) \left(\frac{H}{\delta} \ln\left[\frac{H}{\delta} \left(\frac{3-H/\delta}{2}\right)^2\right] - 6 \ln\left[\frac{3-H/\delta}{2}\right]^2 + 3(1+H/\delta)\right) \quad [6.8]$$

donde ρ_2 y M es la densidad y el peso molecular de la proteína respectivamente.

► Fuerzas de hidratación. Están originadas por la naturaleza molecular del disolvente (53, 54), que en en todos los experimentos de la presente Memoria se trata del agua. Las moléculas de H_2O se pueden estructurar alrededor de las partículas, interponiéndose entre las mismas y evitando su unión, lo que se ha encontrado no sólo en sistema látex-proteína (42, 55), sino también en el caso de partículas de poliestireno sin sensibilizar (56). En el caso de dos esferas homogéneas, el potencial repulsivo debido a las fuerzas de hidratación V_{hyd} tiene la siguiente expresión (57):

$$V_{hyd} = \pi R e^2 P_0 \exp(-H/e) \quad [6.9]$$

siendo e y P_0 son dos parámetros de ajuste.

Finalmente, la expresión completa para la energía de interacción entre dos partículas V_T queda de la siguiente manera:

$$V_T = V_A + V_R + V_{est} + V_{hyd} \quad [6.10]$$

donde V_{est} es igual a $V_{osm} + V_{el}$.

6.6.3 Interacción secundaria

La fuerza del enlace Ag-Ac se incrementa con el tiempo, debido a la extrusión de las moléculas de agua intersticiales que rodean a las regiones activas del antígeno y del anticuerpo. Al disminuir la distancia entre las moléculas reaccionantes aumentan las interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno e hidrofóbicas. Estos dos fenómenos están ligados, ya que un incremento de las fuerzas de unión implica menos distancia entre los reaccionantes y por consiguiente un mayor número de moléculas de agua extruidas (58). Vease que la interacción secundaria se encuentra directamente relacionada con las fuerzas estructurales, ya que es necesario romper la estructura del agua de hidratación para que las proteínas se puedan unir correctamente.

Fuerzas de van der Waals

Cuando el fragmento específico y el epítipo están suficientemente próximos ($\approx 2 \text{ \AA}$), las fuerzas de van der Waals son las principales responsables de la unión y estabilización del enlace antígeno-anticuerpo (58).

Puentes de hidrógeno

Se deben a la interacción entre los grupos O-H y C=O, N-H y C=O y N-H y O-H. Al estar el átomo de hidrógeno unido a un elemento muy electronegativo como el oxígeno, el par de electrones del enlace estará muy atraído por este último. El protón (núcleo de H) queda casi descubierto de carga negativa, constituyendo un polo positivo muy intenso por lo que puede unirse electrostáticamente con el átomo de oxígeno (polo negativo) de una molécula próxima. Este enlace es en esencia una unión entre dipolos extraordinariamente intensos.

La energía asociada a los puentes de hidrógeno es del mismo orden que la de van

der Waals y las de origen electrostático de la unión primaria. Sin embargo, este tipo de interacción sólo se establece a distancias muy cortas (2 a 3 Å), siempre y cuando el H-donador y el H-receptor de los aminoácidos estén perfectamente alineados. Su contribución final a la energía secundaria es prácticamente despreciable si se compara con la que tiene la de van der Waals.

Interacciones hidrofóbicas

Son el resultado final de la combinación de las fuerzas de van der Waals y de los puentes de hidrógeno (40, 41, 58, 59). Se producen entre los grupos apolares de las proteínas y tienen lugar a medida que desaparecen las moléculas de agua que los rodean (H₂O de hidratación).

6.6.4 Factores que afectan a la unión Ag-Ac

La interacción física entre un antígeno y su anticuerpo específico es en esencia un proceso aleatorio de dos estructuras complementarias. Obviamente, la probabilidad de que ocurra la reacción depende de la concentración de Ag y Ac y del grado de accesibilidad de los determinantes antigénicos y de los fragmentos específicos respectivos. Ahora bien, la estabilidad de la unión Ag-Ac es diferente, ya que se produce como resultado del enlace y ruptura del mismo debido a la diferente naturaleza de las fuerzas que actúan (atractivas o repulsivas). En este caso, ni la complementariedad esteroquímica de las proteínas o un solo tipo de interacción serán suficientes como para dar lugar a una unión termodinámicamente estable. Por consiguiente, las condiciones del medio de reacción deberán ser las apropiadas, no sólo para permitir el enlace sino también para garantizar su estabilidad (60).

Temperatura.

Las bajas temperaturas favorecen la unión Ag-Ac, ya que la mayoría son exotérmicas. En estas condiciones, las fuerzas de origen electrostático son las que tienen mayor incidencia. Las interacciones de van der Waals no dependen en principio de la temperatura, aunque a valores elevados tienden a predominar sobre las coulombianas, compensándolas de su declive. Esto trae consigo que la energía de enlace se mantenga constante en un amplio rango de temperaturas.

Los electrolitos de la serie de Hofmeister no sólo afectan en mayor o menor grado a la estructura del disolvente, sino que algunos también pueden cambiar la conformación y la funcionalidad de las proteínas, como es el caso de algunos iones caotrópicos (61). Un ejemplo de esto se encuentra en el apartado 6.9.3.2, donde el ion calcio parece ser el responsable del cambio en la respuesta del aglutinante de origen animal. El Ca^{2+} es uno de los iones más caotrópicos, como se ve en la serie de Hofmeister de los cationes.

Potenciadores de reacción o copolímeros.

El mecanismo de acción de los agentes deshidratantes o copolímeros es similar al de los iones anticotrópicos. Se explica a partir de la denominada teoría de la exclusión (41), que establece que todas las moléculas en disolución tienen a excluir a otras moléculas del lugar que ocupan. Los copolímeros son sustancias capaces de extruir un gran número de moléculas del medio de reacción (de agua en este caso), lo que provoca un "aumento" de la concentración de proteína y en consecuencia de las probabilidades de unión. Existe una gran variedad de agentes deshidratantes, como son el dextrano, polivinil pirrolidona, sulfato de dextrano, PEG (polietilén glicol), etc.

Tensión superficial.

Ciertas sustancias orgánicas de bajo peso molecular (etilén glicol, propanol, formamida, etc) reducen la tensión superficial del medio de reacción, lo que afecta directamente a las interacciones de van der Waals entre el antígeno y el anticuerpo. Estas fuerzas pueden pasar de ser atractivas a repulsivas si la tensión superficial alcanza un valor intermedio entre la que tiene el determinante antigénico y el epítipo del Ac. Las sales que se utilizan para aumentar la fuerza iónica pueden disminuir también la tensión superficial del medio (65), tal y como sucede con el cloruro de tetraetil amonio o el difosfato de cloroquina.

En la tabla 6.10 están recogidos todos los parámetros examinados y como afectan a las fuerzas implicadas en la interacción primaria y secundaria. No se presentan las fuerzas estructurales, debido a que su análisis no es en principio sencillo, ya que este tipo de interacciones dependen de factores tales como la naturaleza de la proteína o de las especies iónicas presentes en el medio de reacción. En el caso concreto del sistema Ag-Ac P-B no se han evaluado todas las variables de la tabla 6.10, sólo el pH, la naturaleza del electrolito y la fuerza iónica del medio de reacción. Con esta serie de experimentos se tiene un doble objetivo, por un lado estudiar el efecto de estos parámetros sobre la respuesta y por otro ver si es posible incrementar la reactividad a baja concentración de aglutinante (entre 1 y 2 U.P-B/ml). En ningún caso se ha variado la temperatura de reacción (37 °C), ni probado sustancias que modifiquen la tensión superficial del medio o aceleren la aglutinación Ag-Ac.

| | INTERACCIÓN PRIMARIA | | INTERACCIÓN SECUNDARIA | |
|------------------------------------|----------------------|----------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tipo | Culombiana | van der Waals | P. Hidrógeno | Hidrofóbicas |
| Rango | Más de 100 Å | Largas:>1000 Å | De 1.5 a 5 Å | Cortas |
| Aumento de temperatura | ↓ | ↑ | ↓ | Todos los factores que afectan en la unión primaria influirán en la interacción secundaria. |
| Aumento/decremento del pH | ↑ ↓ (1) | - | - | |
| Incremento de la fuerza iónica | ↑ | - | ↑ | |
| Copolímeros | ↑ | ↑ | ↑ | |
| Descenso de la tensión superficial | - | ↑ ↓ (2) | - | |

Notas: (1) Este caso se refiere a un pH muy ácido o muy básico.

(2) Dependiendo del valor de la tensión superficial se favorece/desfavorece a las fuerzas de van der Waals.

Tabla 6.10. Interacciones que intervienen en el enlace antígeno anticuerpo. Influencia de los parámetros del medio de reacción.

6.7 Parámetros del medio de reacción: efecto del pH , naturaleza del electrolito y la fuerza iónica en la inmuno-reactividad

6.7.1 pH de reacción. Naturaleza del electrolito.

En todos estos experimentos, los complejos Ix-Ag P-B (monómero RP-130) se han obtenido utilizando el método definido en el apartado 5.2, aunque para evaluar correctamente el efecto del pH y de la naturaleza del electrolito, ha sido necesario realizar los siguientes cambios:

- ▶ Tras la sensibilización, bloqueo y centrifugación, los complejos quedan diluidos en un tampón con acción tamponadora prácticamente nula, pero con la fuerza iónica y pH habituales. De esta forma toda la capacidad tamponadora pasa al medio de reacción. El tampón de resuspensión es en este caso un fosfatos con una fuerza iónica de 0.155 y pH 7.
- ▶ El medio de reacción tiene en todos los casos la misma fuerza iónica (0.155) pero con una sal y pH diferentes. Es formalmente igual al de resuspensión, pero la fuerza iónica viene dada en su mayor parte por la sal del tampón, no por el NaCl.

La elección de la sal del tampón (66) se ha realizado en base a los siguientes criterios:

- ▶ El pK de la sal debe ser cercano al pH de trabajo, ya que es donde tiene su mayor capacidad tamponadora.
- ▶ El pK de la sal ha de estar comprendido entre 6 y 8, lo que permite tener un intervalo de pH entre 5 y 9. En este rango de pH se desarrolla la mayor parte de las reacciones inmunológicas.
- ▶ La solubilidad en medio acuoso tiene que ser elevada.

Siguiendo este criterio, las sales que se han utilizado en la elaboración de los tampones son los de la tabla 6.11.

La mayor parte de los reactivos que evalúan la aglutinación directa Ag-Ac (67), emplean el tampón fosfatos alrededor de 7 (~7.4), que en la serie de Hofmeister es el más aglutinante (anticoagotrópico). Ahora bien, en el caso de proteínas unidas a un soporte coloidal, la sal, pH y fuerza iónica del tampón tienen un papel diferente, ya que a un mismo tiempo han de favorecer la unión, evitar la desestabilización de los complejos Ix-proteína, así como la aparición de reacciones inespecíficas. Algunos autores recomiendan en este caso la utilización del tampón borato (67, 68).

Todas las medidas se han llevado a cabo en el Monarch 2000 IL a una longitud de onda de 570 nm y a un tiempo de ≈ 6 minutos. En los apartados 6.3 y 6.4 se comprobó que una reducción del intervalo de medida, permite detectar menor cantidad de analito, ya que el método hiperbólico de ajuste dispone de mayor número de datos. Por este motivo se ha vuelto a utilizar un tiempo de medida elevado, ya que de esta manera es posible determinar si existe un efecto real de las condiciones de reacción sobre el límite de detección (aumento

de respuesta). El número de partículas en el medio de reacción es de $3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. Los complejos tienen una razón 340/600 media de 7.1, lo que corresponde a un tamaño aproximado de 167 nm. Tal y como se hizo en los apartados 6.3 y 6.4, a la hora de calcular la sección eficaz de dispersión, se utilizará el diámetro obtenido por la técnica PCS, que es de $145 \pm 5 \text{ nm}$.

| Sales | Fórmula | pK | pH |
|-----------------|-------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| Acetato | CH_3COOH | 4.75 | 5 |
| MES | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ | 6.20 | 6 |
| Fosfato | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 7.20 | 6, 7, 8 |
| Imidazol | $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ | 7.00 | 6, 7 |
| HEPES | $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ | 7.31 | 7 |
| TES | $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$ | 7.40 | 7 |
| MOPS | $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ | 7.20 | 8 |
| Borato | H_3BO_3 | 9.20 | 8, 9 |
| Borax | $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | 9.00 | 8 |

Tabla 6.11. Sales utilizadas en el experimento de variación del pH y de la naturaleza del electrolito.

Un cambio de pH o de la naturaleza de la sal no solo modifica la capacidad agregante del tampón, sino también la viscosidad (η) e índice de refracción (n_m) del medio de reacción. Estos dos parámetros se deben tener en cuenta a la hora de analizar los resultados, ya que pueden en muchos casos modificar la respuesta del sistema. η afecta al movimiento browniano de los complejos y por tanto a su unión, mientras que n_m está relacionado con las propiedades ópticas de los mismos. Todo esto se verá con mayor detalle al analizar los resultados en cada uno de los experimentos.

Antes de comenzar el estudio del efecto del pH y de la naturaleza del electrolito sobre la reactividad, hay que asegurarse que al pasar toda la capacidad tamponadora al medio de reacción, no exista pérdida de respuesta, estabilidad coloidal y especificidad. En la figura 6.28 se presentan la R_{max} de dos complejos Ix-Ag P-B (RP-130, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, $3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) resuspendidos en dos medios diferentes, uno en el tampón habitual y otro en un medio con

la misma fuerza iónica que el anterior pero que proviene en su mayor parte del NaCl (130 mM) y no de la sal fosfatos. Tal y como se puede ver en esta figura, las diferencias a nivel de reactividad son mínimas y se pueden asociar más a un error en la dilución que a otro motivo. Además de este resultado, el sistema sigue siendo coloidalmente estable y específico, lo que valida el uso de los complejos con menor capacidad tamponadora.

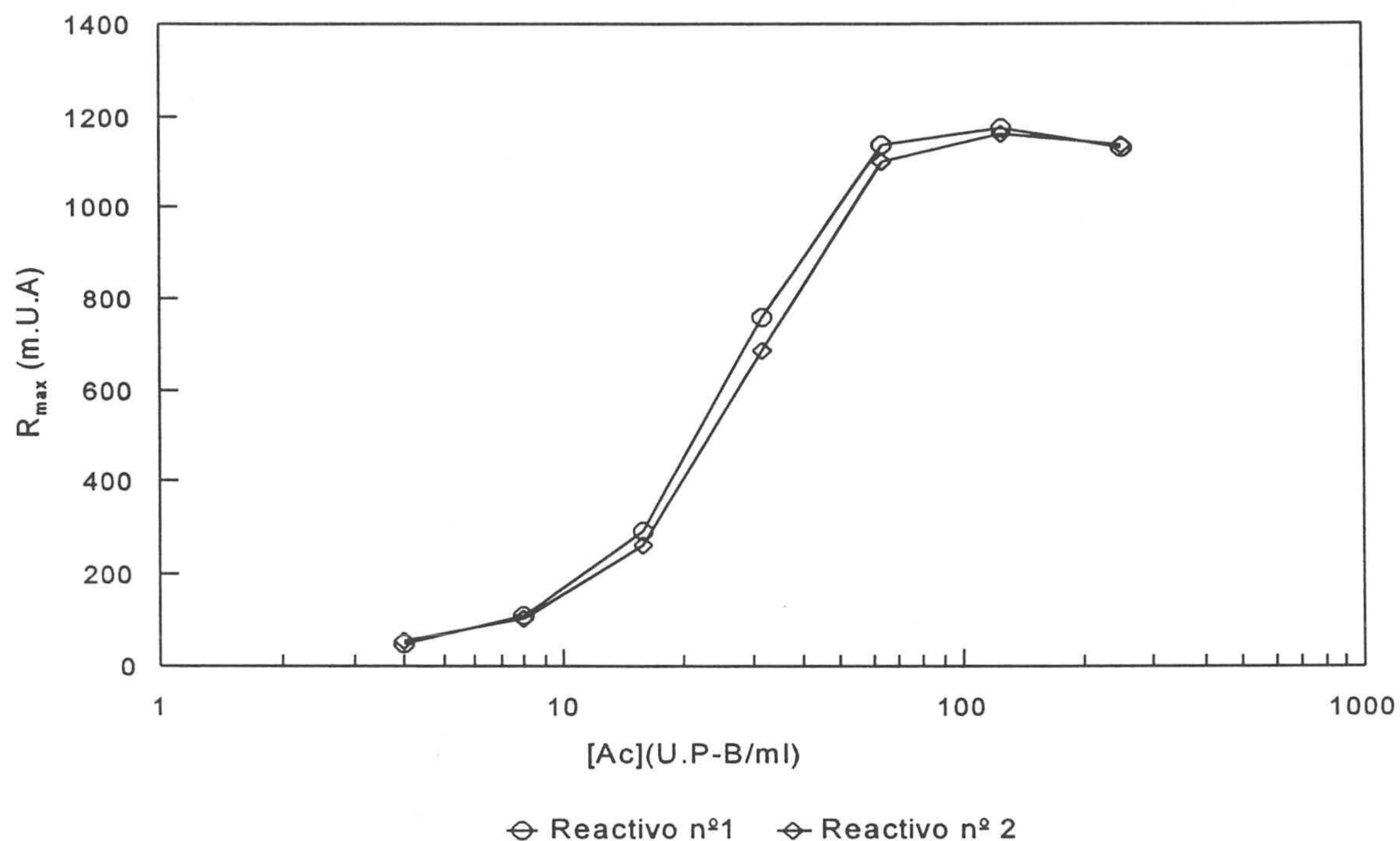


Figura 6.28. Comparación entre los complejos Ix-Ag P-B (RP-130, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$, $3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) obtenidos por el método habitual (apartado 5.2). Reactivo nº 1: el medio de suspensión del látex está tamponado. Reactivo nº 2: el medio de reacción es el que tiene toda la capacidad taponadora.

pH 5. Tampón acetato

En este medio de reacción los complejos son inestables, ya que se autoagregan sin que haya presente Ac P-B. La desestabilización con tampón acetato (pH 5, 0.155 de f.i) se debe principalmente a que el pH es próximo al p.i.e de la BSA. Para demostrar esto se presenta un experimento de sensibilización realizado con el protocolo habitual (apartado 5.2) y la partícula RP-130, donde se ha cambiado el tampón de unión del Ag P-B y de bloqueo por un acetato pH 5 y 0.002 de fuerza iónica.

En la tabla 6.12 se observa que el diámetro de agregado durante la adsorción del Ag P-B es algo mayor que la del RP-130, independientemente de la cantidad de proteína añadida (el Ag P-B/m²lx es el inicial, no el adsorbido). Estos tamaños son antes de bloquear, por lo que no hay BSA ni en el medio, ni en las partículas. El control está hecho en las mismas condiciones que los demás tubos, pero sin añadirle Ag P-B. En cambio, al bloquear con BSA, la agregación es evidente, incluso en el control, donde no hay Ag P-B. El punto isoeléctrico de la BSA es cercano a 5, lo que podría explicar la desestabilización.

Por tanto, de este experimento de sensibilización se deduce que en el medio de reacción acetato pH 5 y 0.155 de f.i, la auto-agregación de los complejos puede estar originada por la BSA. El pH es próximo al p.i.e de la BSA y por tanto las moléculas de proteína tienen carga neta nula, lo que unido a una fuerza iónica próxima a la fisiológica, hace que desaparezcan las fuerzas repulsivas de naturaleza electrostática que mantenían estable el sistema (apartado 6.7.1).

| $\mu\text{gAg P-B/m}^2\text{lx}$ | Durante la sensibilización | | Durante el bloqueo | |
|----------------------------------|----------------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | 340/600 | ϕ (nm) | 340/600 | ϕ (nm) |
| 9 | 7.30 | 156 | 2.26 | 707 |
| 18 | 7.10 | 167 | 1.75 | 809 |
| 29 | 7.21 | 161 | 2.38 | 683 |
| 45 | 7.21 | 161 | 2.38 | 683 |
| 56 | 7.28 | 157 | 2.1 | 739 |
| Control | 7.14 | 165 | 1.73 | 809 |

Tabla 6.12. Partícula RP-130. Experimento de adsorción del Ag P-B y la BSA con el método habitual (apartado 5.2). Medida del tamaño (ϕ) de agregado. Medio de sensibilización y bloqueo: acetato pH 5 y 0.002 de fuerza iónica.

pH 6. Tampón fosfato, MES e imidazol

En este experimento se ha podido comprobar que sólo con la curva de reactividad no hay información suficiente como para determinar cual de los electrolitos es el más aglutinante. En la figura 6.29-(a) están representadas las curvas de inmuno-aglutinación de los tres tampones, donde se observa que no existe prácticamente diferencia en los valores de R_{max} . Una explicación es que R_{max} es asintótico, lo que teóricamente corresponde a un tiempo infinito donde se han producido todas las posibles reacciones. Aunque un medio sea más anticaotrópico que otro, con un tiempo elevado de medida se pueden llegar a los mismos valores de respuesta. Por tanto, es necesario buscar otro parámetro que refleje las diferencias entre los electrolitos de los tampones, como es la velocidad inicial V_0 de la curva absorbancia-tiempo.

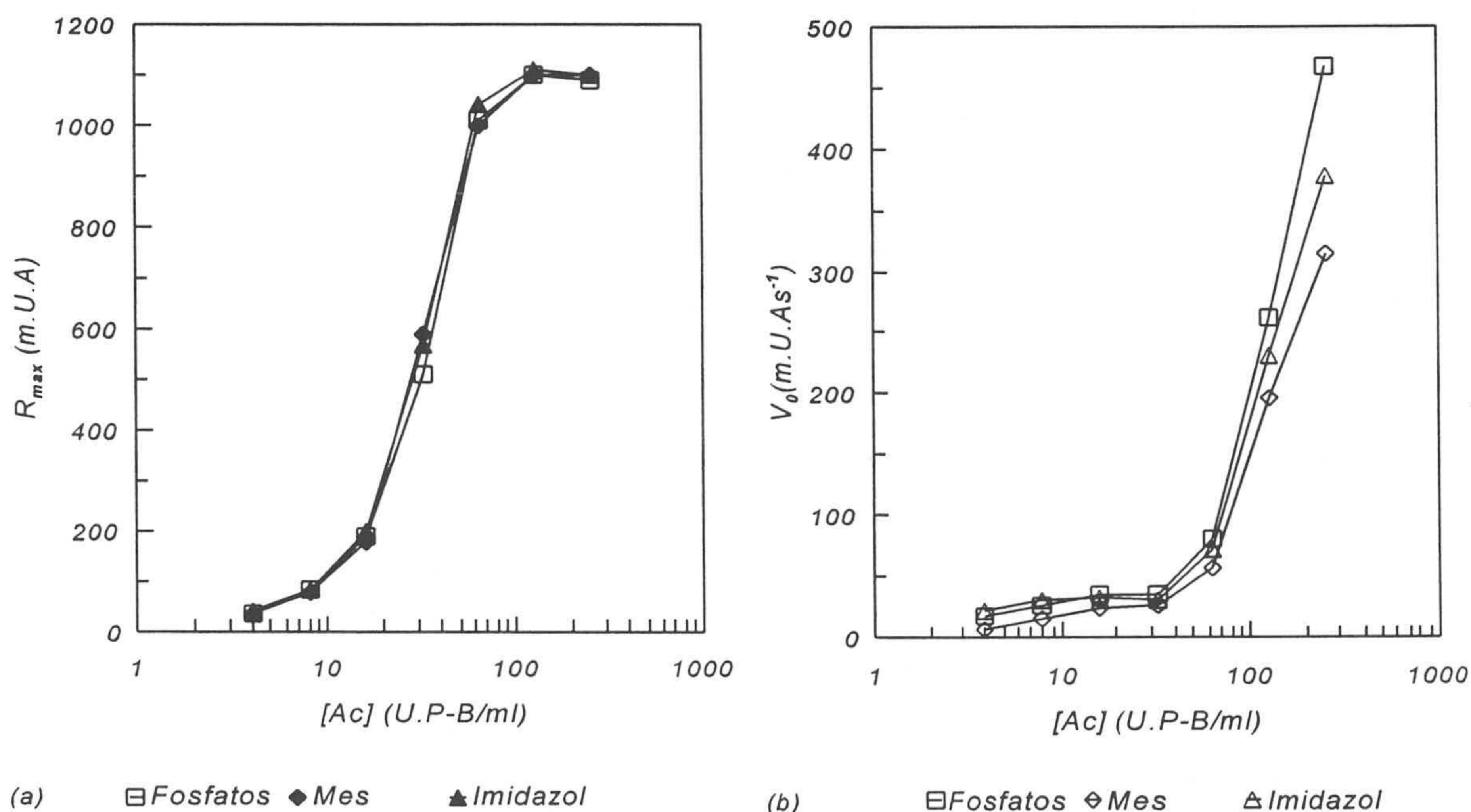


Figura 6.29. Curvas de R_{max} (a) y V_0 (b) a pH 6. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). Número medio de datos analizados por curva: 87.

A la hora de examinar el cambio de V_0 con la naturaleza del electrolito, hay que tener en cuenta que depende de varios factores (capítulo 3), dentro de los cuales están los propios del reactivo (tamaño de partícula y número de dispersores), del medio (viscosidad, temperatura e índice de refracción) y biológicos (recubrimiento y cantidad de aglutinante). En este experimento y para los tres tampones, el número de partículas, diámetro y grado de recubrimiento son los mismos, por lo que para una concentración determinada de aglutinante,

V_0 es un parámetro que define la capacidad aglutinadora de los complejos. En estas condiciones V_0 sólo depende del medio de reacción y es proporcional a k_f , constante relacionada con la probabilidad que tienen dos partículas para formar un dímero (69). En el siguiente apartado (experimento a pH 7), se presentará un método teórico que permite evaluar la contribución que tienen la viscosidad e índice de refracción del medio en el valor final de V_0 .

En la figura 6.29-(b) están representadas las curvas de velocidad inicial para cada uno de los tampones. En esta gráfica se observa que la sal fosfatos es el más agregante, lo que está de acuerdo con la posición que ocupa en la serie de Hofmeister (61, 69). La velocidad inicial en el tampón imidazol se diferencia un 12% en media respecto a la del fosfatos, mientras que en MES es del 30%, lo que en ambos casos se debe al mayor carácter anticaotrópico del fosfatos, ya que la viscosidad ($\eta \sim 1$ cp) y el índice de refracción ($n_m \sim 1.335$) son aproximadamente los mismos en los tres casos. Las diferencias entre los electrolitos son más evidentes a medida que aumenta la cantidad de Ac P-B. En las concentraciones altas de aglutinante, el efecto de la sal del tampón se une a las condiciones propias del complejos (relación entre n_A y n).

Todos los complejos son coloidalmente estables y no se han encontrado reacciones inespecíficas con ninguno de los sueros analizados.

pH 7. Tampón fosfato, imidazol, HEPES, TES

La mayor parte de las reacciones Ag-Ac son tan rápidas que se pueden considerar controladas por difusión, lo que se cumple también en el sistema [Ix- Ag P-B]-Ac P-B (ver apartados 6.8 y 6.9). Por esta razón y tal como se comentó con anterioridad, hay que determinar el efecto de los parámetros físico-químicos del medio, viscosidad η , temperatura, etc, sobre el movimiento browniano de los complejos. Por otro lado, un cambio de la viscosidad modifica el índice de refracción n_m del medio, lo que conlleva una variación de la luz que dispersan los complejos y por tanto de su reactividad.

En la tabla 6.13 se presenta para cada tampón los valores de R_{max} junto con su viscosidad e índice de refracción. Al no disponer de un viscosímetro termostático los datos de viscosidad son los relativos al agua, η/η_0 , donde el subíndice 0 indica que las medidas han sido realizadas a una temperatura ambiente entre 20° y 25°C. El valor de η/η_0 no varía prácticamente nada en el intervalo de 20° a 37°C, por lo que sirve para establecer que medio es más viscoso. Hay que decir también que las sales con las que se ha trabajado en este

experimento tienen un pK cercano a 7 (tabla 6.11), por lo que todas están en unas condiciones similares, ya que disponen de su máxima capacidad tamponadora. Ahora bien, dependiendo del peso molecular, el equilibrio de disociación y el pH de trabajo, la cantidad que se añade de cada sal es diferente, lo que influye sobre el valor de η y n_m . Se ha comprobado que los tampones sin ajustar el pH tienen siempre mayor viscosidad que los ajustados, lo que pone de manifiesto la influencia de la fuerza iónica (70). Sólo quedaría evaluar el efecto que tiene la forma de los iones, ya que el resto de las variables (temperatura, instrumento, homogeneidad de la muestra, etc) son las mismas para todos los tampones.

| Tampones | Fosfato pH 7 | Imidazol pH 7 | TES pH 7 | HEPES pH 7 |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| η/η_0 (22°C) | 1.000 | 1.000 | 1.025 | 1.213 |
| n_m (25°C) | 1.335 | 1.337 | 1.342 | 1.348 |
| Abs (U.A) | 0.7000 | 0.7010 | 0.6721 | 0.6510 |
| $(C_2/2-C_1) \cdot 10^{12}$ | 3.479 | 3.423 | 3.285 | 3.125 |
| Abs.Teo (U.A) | 0.7043 | 0.6946 | 0.6706 | 0.6421 |
| [Ac] U.P-B/ml | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) |
| 4 | 37±1 | 31±1 | 24±1 | 25±1 |
| 8 | 88±1 | 76±1 | 72±1 | 66±1 |
| 16 | 234±3 | 192±2 | 205±2 | 181±2 |
| 32 | 655±13 | 573±9 | 589±11 | 518±10 |
| 64 | 1060±10 | 1070±10 | 1010±12 | 973±12 |
| 128 | 1110±6 | 1110±5 | 1030±11 | 1010±9 |
| 256 | 1080±4 | 1100±3 | 1020±8 | 1010±7 |

Tabla 6.13. Tampones a pH 7. Características del medio (n_m , η/η_0) y valores de reactividad R_{max} . RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). La sección eficaz de dispersión de monómeros C_1 y dímeros C_2 están calculadas mediante la teoría RGD. Abs (U.A) es la absorbancia experimental del blanco y Abs.Teo la teórica.

A partir de los resultados de la tabla 6.13 parece que el tampón fosfatos es el más aglutinante, aunque tal y como sucedía a pH 6, las diferencias entre los electrolitos no son muy elevadas y todavía menores a alta concentración de aglutinante (64-256 U.P-B/ml). Sólo entre el fosfatos y el imidazol podrían deberse únicamente al carácter anticaotrópico del ion, mientras que en los demás casos habría que tener en cuenta la influencia de la viscosidad o del índice de refracción. Sin embargo es muy difícil interpretar el efecto de estos parámetros sobre R_{max} , al tratarse de un valor asintótico donde sistema ha tenido tiempo suficiente como para que se produzcan todas las uniones entre los complejos.

La velocidad inicial de la curva absorbancia-tiempo permite distinguir con mayor claridad la respuesta de los tampones (71), y la contribución que tienen los distintos parámetros del medio. A partir de la expresión [2.15], se deduce que n_m modifica el factor $C_2/2-C_1$, mientras que la viscosidad está incluida en la constante k' . Esta constante es inversamente a η (expresión [3.24]), por lo que V_0 también lo es.

En la figura 6.30 están representados los valores de V_0 correspondientes al tampón fosfatos y al HEPES, que son los que más se diferencian a nivel de respuesta. En la velocidad inicial está alrededor del 45%, lo que no se refleja prácticamente en R_{max} .

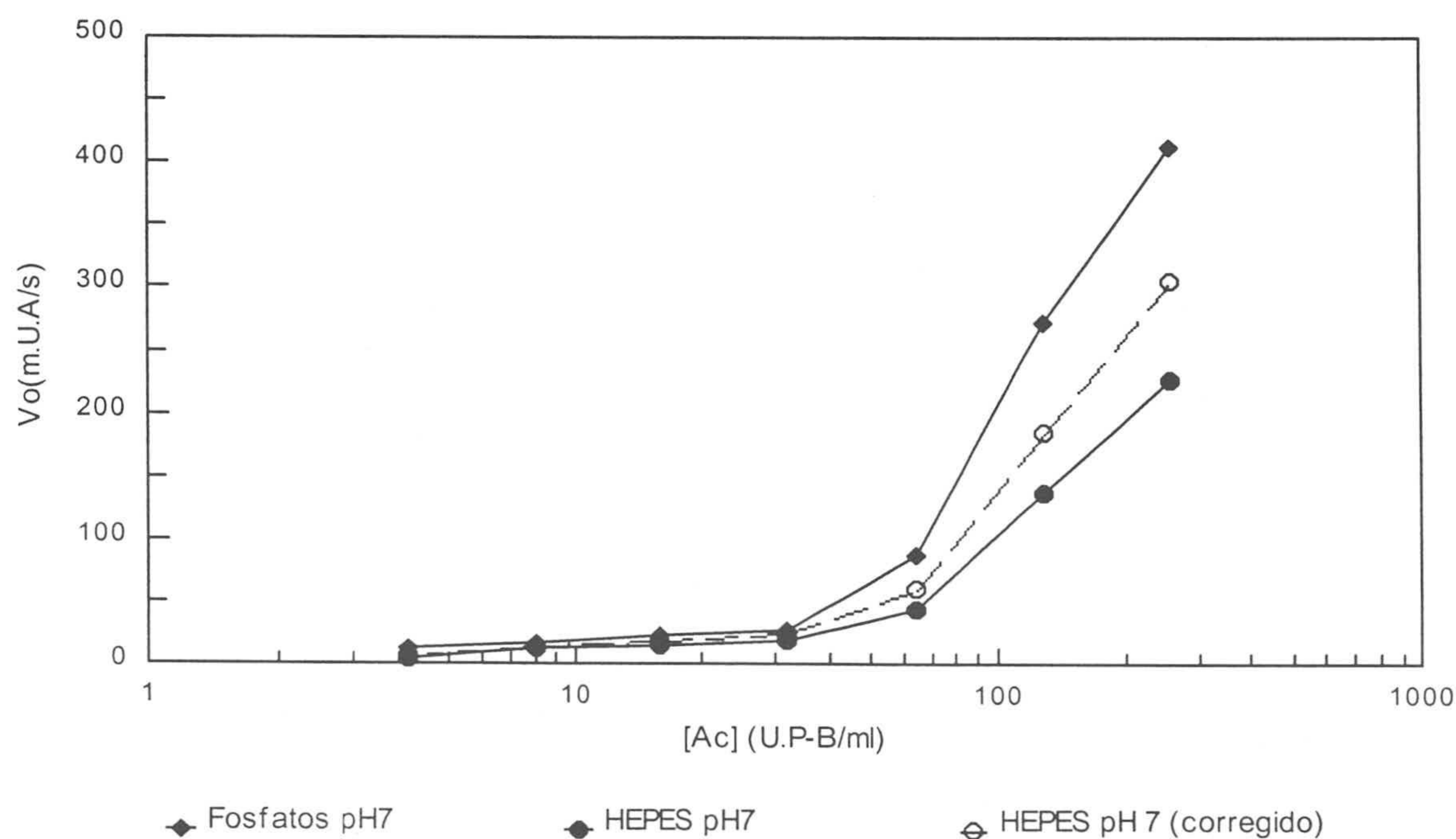


Figura 6.30. Curvas de V_0 del tampón fosfatos y HEPES (experimental y corregida) a pH 7. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Número medio de datos analizados por curva: 95.

En la figura 6.30 también está incluida la V_0 del HEPES corregida respecto a la del fosfatos, rectificación que se obtiene multiplicando la velocidad inicial del tampón HEPES por el siguiente factor:

$$f_c(\text{HEPES}) = \frac{\left(\frac{C_2}{2} - C_1\right)_{\text{fosfatos}} \eta_{\text{HEPES}}}{\left(\frac{C_2}{2} - C_1\right)_{\text{HEPES}} \eta_{\text{fosfatos}}} \quad [6.11]$$

cuyo valor es de 1.35. Los parámetros de la expresión [6.7] están recogidos en la tabla 6.13. La rectificación que introduce $f_c(\text{HEPES})$ es del 35% en media, lo que dejaría un 10% debido a la caotropicidad del ion. La diferencia entre la velocidad inicial del tampón imidazol y del fosfatos es de un 10% aproximadamente (se repite el resultado a pH 6), lo que se debe al mayor carácter anticaotrópico de la sal fosfatos, ya que ambos medios disponen de una viscosidad e índice de refracción similares. Aplicando la expresión [6.7] al caso del TES ($f_c(\text{TES})=1.14$), la velocidad inicial se iguala a la del fosfatos. De todo esto se concluye que sólo en el caso del imidazol y parcialmente en el HEPES, se puede hablar de unas diferencias de caotropicidad entre estos electrolitos y el fosfatos, mientras que en el TES todo está originado por las diferencias de η/η_0 y n_m .

A pesar de que el método de comparación de V_0 no sea una técnica exacta, tiene como mayor ventaja sobre el valor de R_{max} , el hecho de disponer de una expresión teórica que permite estimar como y en que grado afectan los parámetros del medio. Ahora bien, el modelo desarrollado en el capítulo 3 sólo se puede utilizar para una cantidad de aglutinante inferior al punto de equivalencia, aunque es en la “parte biológica” $n_A(n-n_A)$ donde se establecen las diferencias entre las distintas zonas de la curva de inmuno-aglutinación. Sin embargo la velocidad inicial es siempre directamente proporcional a $C_2/2-C_1$ e inversamente proporcional a η (72), aunque exista aglutinante libre (zona de equivalencia). Por tanto, el factor de corrección es aplicable para cualquier concentración de agregante.

En el tabla 6.13 se observa que la absorbancia inicial del blanco (Abs (U.A)) es menor a medida que aumenta η/η_0 , fenómeno que en general está directamente relacionado con la variación del índice de refracción del medio. La luz dispersada por un sistema monodisperso (capítulo 2) es directamente proporcional a la sección eficaz de dispersión de las partículas. Este parámetro tiene una dependencia inversa con el índice de refracción n_m , de forma que un aumento de n_m implica menos absorbancia, lo que se cumplirá durante toda la reacción y en cualquier concentración de aglutinante. Como se ha comentado con anterioridad, la única manera de la que se dispone para evaluar el efecto de n_m es mediante la V_0 , aunque

tal y como se observa en la tabla 6.13, excepto en el caso del fosfatos, R_{\max} tiende a aumentar a medida que disminuye el índice de refracción del medio.

Finalmente, cabe destacar la gran coincidencia entre el valor experimental de la absorbancia del blanco (Abs) y el obtenido mediante la teoría de RGD(Abs.Teo) (expresión [2.24]), lo que también se repite con los tampones a pH 8 y 9. Las diferencias encontradas pueden deberse a un error en la medida de n_m o del diámetro de partícula.

No se han encontrado reacciones inespecíficas con las muestras analizadas y los complejos son coloidalmente estables en todos los tampones que se han probado.

pH 8. Tampón fosfato, borax, MOPS y borato.

En la tabla 6.14 se presenta para cada tampón, los valores R_{\max} junto con su correspondiente η/η_0 y n_m , así como también el factor $C_2/2-C_1$ calculado por la teoría RGD. Se observa que la diferencia entre el fosfatos, borax y MOPS es similar a la que se obtuvo a pH 7 con otras sales, mientras que en el caso del borato es superior al 50% con algunas cantidades de aglutinante (4 y 8 U.P-B/ml). En este caso hay que analizar el efecto de la viscosidad y del índice de refracción a partir de la velocidad inicial de la curva absorbancia-tiempo.

En la figura 6.31 están representados los valores de V_0 para los cuatro tampones, donde se observa que el fosfatos tiene una respuesta significativamente superior a todos los demás. En el borax y el MOPS es de un 40% en media, mientras que en el borato supera el 80% para la mayor parte de las concentraciones de agregante. Con el borax y el MOPS las diferencias con el fosfatos se deben exclusivamente al mayor carácter anticaotrópico de esta sal, ya que η/η_0 y n_m son similares en los tres tampones (ver tabla 6.14). Sólo en el borato se puede hablar de un efecto por parte de la viscosidad y del índice de refracción, aunque en este caso el factor de corrección ($f_c(\text{borato})=1.14$) no es suficiente como para igualar las velocidades, tal y como sucedía en el TES (pH 7). De todo esto destaca el hecho de que el borato, electrolito recomendado por otros autores en algunos inmuno-ensayos, sea justamente el menos aglutinante. Este resultado se vuelve a repetir a pH 9, tal y como se verá a continuación.

| Tampones | Fosfato pH 8 | Borax pH 8 | MOPS pH 8 | Borato pH 8 |
|------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| η/η_0 (22°C) | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.060 |
| n_m (25°C) | 1.334 | 1.335 | 1.335 | 1.343 |
| Abs (U.A) | 0.7086 | 0.7186 | 0.7112 | 0.6739 |
| $(C_2/2-C_1) \cdot 10^{12}$ (cm ²) | 3.506 | 3.479 | 3.479 | 3.259 |
| Abs.Teo (U.A) | 0.7092 | 0.7043 | 0.7043 | 0.6658 |
| [Ac] U.P-B/ml | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) | R_{max} (mU.A) |
| 4 | 40±1 | 25±1 | 27±1 | 12.0±0.3 |
| 8 | 83±1 | 58±1 | 67±1 | 35±1 |
| 16 | 201±3 | 163±2 | 176±2 | 107±1 |
| 32 | 578±12 | 484±11 | 513±4 | 352±7 |
| 64 | 1050±13 | 1000±14 | 1030±11 | 995±15 |
| 128 | 1080±9 | 1060±18 | 1080±8 | 1140±13 |
| 256 | 1060±5 | 1040±11 | 1060±7 | 1100±16 |

Tabla 6.14. Tampones a pH 8. Características del medio (n_m , η/η_0) y valores de reactividad R_{max} . RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11}$ cm⁻³, 34 µg Ag/m²lx). C_1 y C_2 están calculadas mediante la teoría RGD. Abs (U.A) es la absorbancia experimental del blanco y Abs.Teo la teórica.

En todos los tampones los complejos son coloidalmente estables y no se han encontrado ningún tipo de reacción inespecífica con las muestras analizadas.

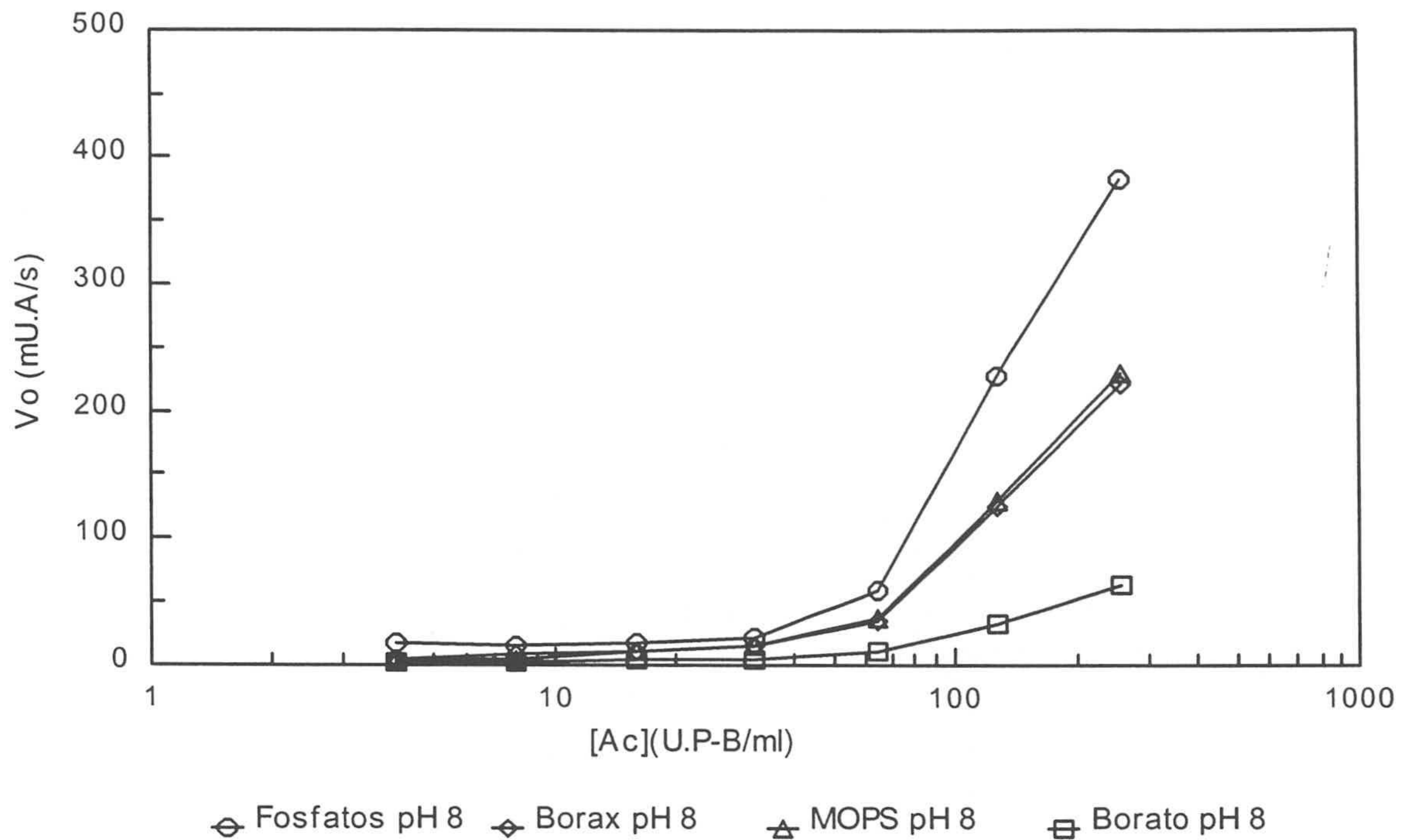


Figura 6.31. Curvas de V_0 de los tampones fosfatos, borax, MOPS y borato a pH 8. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$). Número medio de datos analizados por curva: 105.

pH 9. Tampón borato.

La tabla 6.15 presenta para el tampón borato a pH 8 y 9, el valor de R_{max} y V_0 , el factor $C_2/2-C_1$ calculados por la teoría RGD, así como también η/η_0 y n_m para cada uno de ellos. De estos resultados cabe destacar que la reactividad a pH 9 es superior a la que tiene esta misma sal a pH 8, lo que en parte está justificado por su menor índice de refracción y viscosidad. Sin embargo el factor de corrección ($f_c(\text{borato pH 8})=1.14$) no es suficiente como para compensar las diferencias entre las velocidades iniciales de ambos tampones. A pH 9 el borato es más aglutinante que a pH 8, sin llegar a los valores de V_0 de otros electrolitos. Se confirma que el borato no es el tampón más apropiado para la reacción Ag-Ac P-B, aunque en realidad el valor de R_{max} a pH 9 es similar al de otros medios. Los complejos han resultado ser coloidalmente estables y no se ha detectado ningún tipo de reacción inespecífica con las muestras analizadas.

| Tampones | Borato pH 8 | | Borato pH 9 | |
|-------------------------------------------------|-------------|---------|-------------|---------|
| η/η_0 (22°C) | 1.06 | | 1.00 | |
| n_m (25°C) | 1.343 | | 1.334 | |
| Abs. Blanco | 0.6739 | | 0.7000 | |
| $(C_2/2-C_1) \cdot 10^{12}$ (cm ⁻¹) | 3.259 | | 3.507 | |
| Abs.Teo (U.A) | 0.6658 | | 0.7092 | |
| U.P-B/ml | R_{max} | V_0 | R_{max} | V_0 |
| 4 | 12.0±0.3 | ~0 | 26.8±0.3 | 3.1±0.2 |
| 8 | 35±1 | 2.0±0.1 | 56.7±0.3 | 6.7±0.2 |
| 16 | 107±1 | 4.0±0.3 | 147±1 | 9.3±0.4 |
| 32 | 352±7 | 5.0±0.4 | 411±4 | 13±1 |
| 64 | 995±15 | 11±1 | 930±9 | 25±1 |
| 128 | 1140±13 | 32±1 | 1037±7 | 63±2 |
| 256 | 1100±16 | 63±4 | 1046±6 | 98±3 |

Tabla 6.15. Tampón borato pH 8 y 9. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11}$ cm⁻³, 34 µg Ag/m²lx). Características del medio (n_m , η/η_0) y valores de R_{max} , V_0 , $C_2/2-C_1$ (teoría RGD). Abs (U.A) es la absorbancia experimental del blanco y Abs.Teo la teórica.

6.7.1.1 Comparación entre los distintos pH

En un gran número de sistemas inmunológicos (40, 58-60, 73) se ha comprobado que las condiciones ideales de reacción son un pH neutro y una fuerza iónica próxima a la fisiológica, aunque esto no tiene por qué cumplirse en todos los casos. Teóricamente (apartado 6.6) el pH óptimo de reacción debe tener un valor intermedio entre el p.i.e del antígeno y del anticuerpo (40, 58), lo que no siempre es fácil de determinar. Por ejemplo el anticuerpo de Paul-Bunnell (IgM) tiene al igual que la IgG un rango de p.i.e muy ancho (6~8),

mientras que el Ag P-B dispone de un p.i.e entre 4.5 y 5. Sin embargo, en los experimentos de variación del pH se demuestra que a pH 7 es donde se produce la máxima aglutinación. Dejando a un lado las diferencias (n_m , η/η_0 , caotropicidad, etc) entre los distintos tampones, la reactividad tiende a ser ligeramente mayor a pH 7 que en los otros pH. Basta comparar los resultados con la sal fosfatos a pH 6, 7 y 8, como se observa en la figura 6.32, donde se presentan los valores de R_{max} de la zona media de la curva de inmuno-aglutinación, 8, 16 y 32 U.P-B/ml. A pH 7, 8 y 9, el tampón fosfatos tiene la misma viscosidad e índice de refracción.

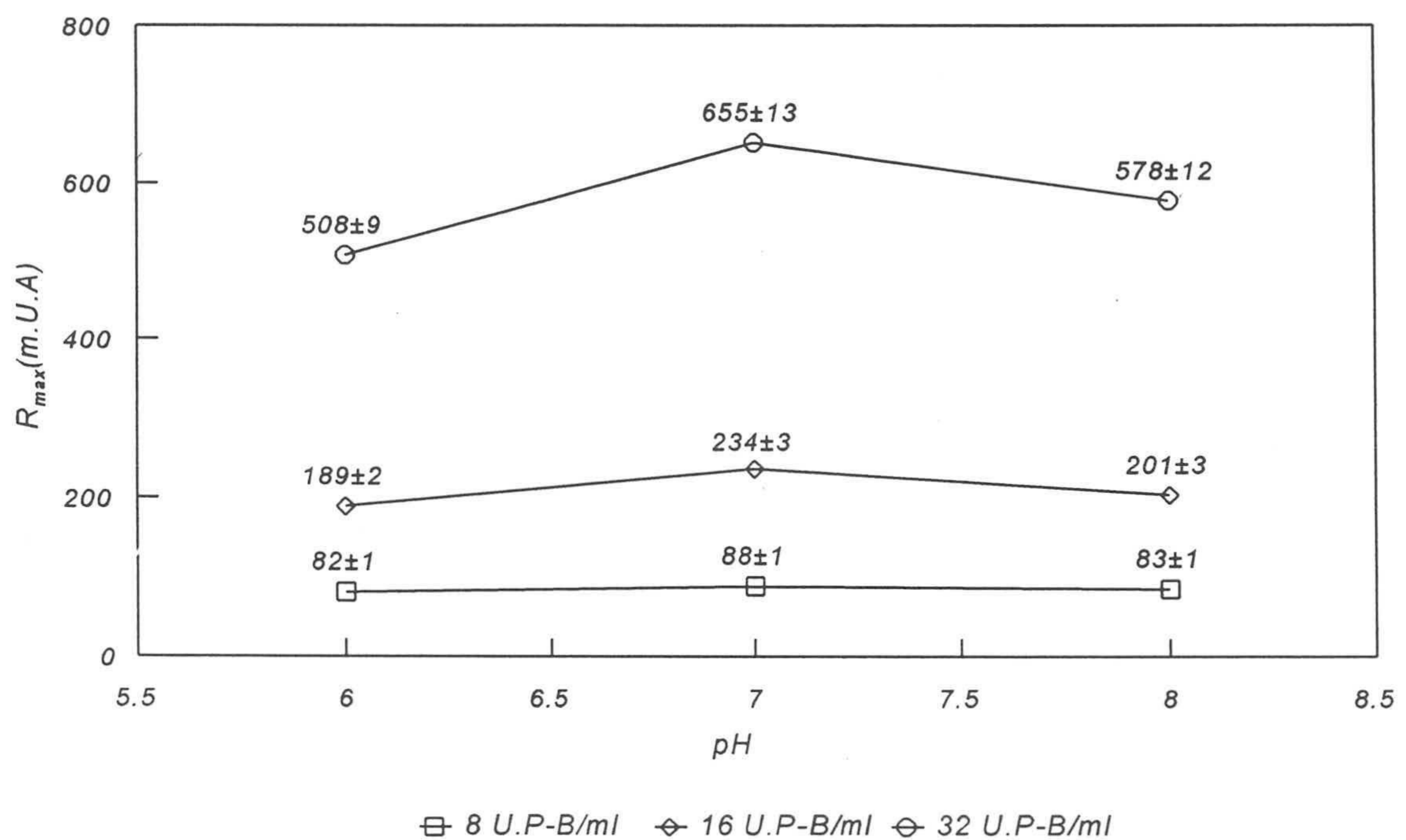


Figura 6.32. Tampón fosfatos. Variación de R_{max} con el pH de reacción. Concentración de aglutinante: 8, 16 y 32 U.P-B/ml. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$).

A pesar de que las condiciones óptimas de reacción son las mismas que en otros sistemas, las diferencias entre los diferentes tampones y pH serían mayores si la f.i no fuese tan elevada, aunque tal y como verá en el apartado siguiente, es necesario que sea mayor de 0.1 para poder eliminar las uniones inespecíficas entre proteínas. A baja fuerza iónica aumenta la respuesta ya que la carga está menos apantallada (apartado 6.7.1) lo que permite la aparición de fuerzas atractivas de origen culombiano, que en la mayor parte de los casos son no específicas.

6.7.2 Variación de la fuerza iónica del medio

Tal y como se comentado al principio del capítulo, la fuerza iónica del medio de reacción afecta a las fuerzas de tipo culombiano, que junto con las de van der Waals son las que definen la especificidad del enlace Ag-Ac. La mayoría de las reacciones inespecíficas aparecen a baja fuerza iónica y desaparecen al incrementar la concentración de electrolito (apantallamiento de carga). Ahora bien, hay casos en que las interacciones electrostáticas Ag-Ac pueden establecerse no sólo entre las partes negativas de un determinante y las positivas del fragmento específico, sino también entre dos determinantes de igual signo. Por ejemplo, hay proteínas (74, 75) que aglutinan en presencia de iones Ca^{2+} , por lo que un aumento de la fuerza iónica no evita la unión. En estos casos hay que añadir una sustancia como el EDTA capaz de “secuestrar” a los iones Ca^{2+} (ver apartado 6.9.3.2) y favorecer las interacciones específicas (58). La inespecificidad en la reacción Ag-Ac es un tema muy complicado que depende de un gran número de factores y que varía dependiendo del sistema proteico.

Los complejos Ix-Ag P-B (partícula RP-130) de este experimento se han obtenido con el método habitual (apartado 5.2), aunque para poder determinar correctamente el efecto de la fuerza iónica sobre la reactividad, ha sido necesario realizar las siguientes modificaciones:

- ▶ Tras la sensibilización, bloqueo y centrifugación, los complejos quedan diluidos en un tampón fosfatos igual al utilizado en el estudio del pH (apartado 6.7.1).
- ▶ El medio de reacción es el mismo que el de resuspensión, pero con una fuerza iónica variable, lo que se consigue añadiendo cantidades crecientes de NaCl, que en este caso están entre 30 y 1500 mM (dentro de cubeta).

Las medidas se han llevado a cabo en el Monarch 2000 IL a una longitud de onda de 570 nm y un tiempo de medida de ≈ 6 minutos. El número de partículas en el medio de reacción es de $3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. Los complejos tienen un tamaño similar al del experimento del pH, lo que corresponde a una razón 340/600 de 7.2 (~ 160 nm). Para calcular la sección eficaz de dispersión, se empleará el diámetro obtenido por la técnica PCS, que es de 145 ± 5 nm.

En la figura 6.33 están representados las curvas de R_{max} para cada concentración de electrolito, donde se observa que el límite de detección baja a hasta 1 U.P-B/ml con 30 mM y 2 U.P-B/ml con 60 mM (ver detalle). Este incremento de la respuesta se debe a una reacción inespecífica con proteínas del suero, ya que a 30 y 60 mM los complejos Ix-Ag P-B

aglutinan con muestras negativas de mononucleosis infecciosa. La respuesta inespecífica no sólo implica un descenso de la cantidad mínima detectada, sino también un aumento de R_{max} en toda la curva, lo que desaparece para una concentración de electrolito cercana a la que tienen las condiciones habituales (apartado 5.2).

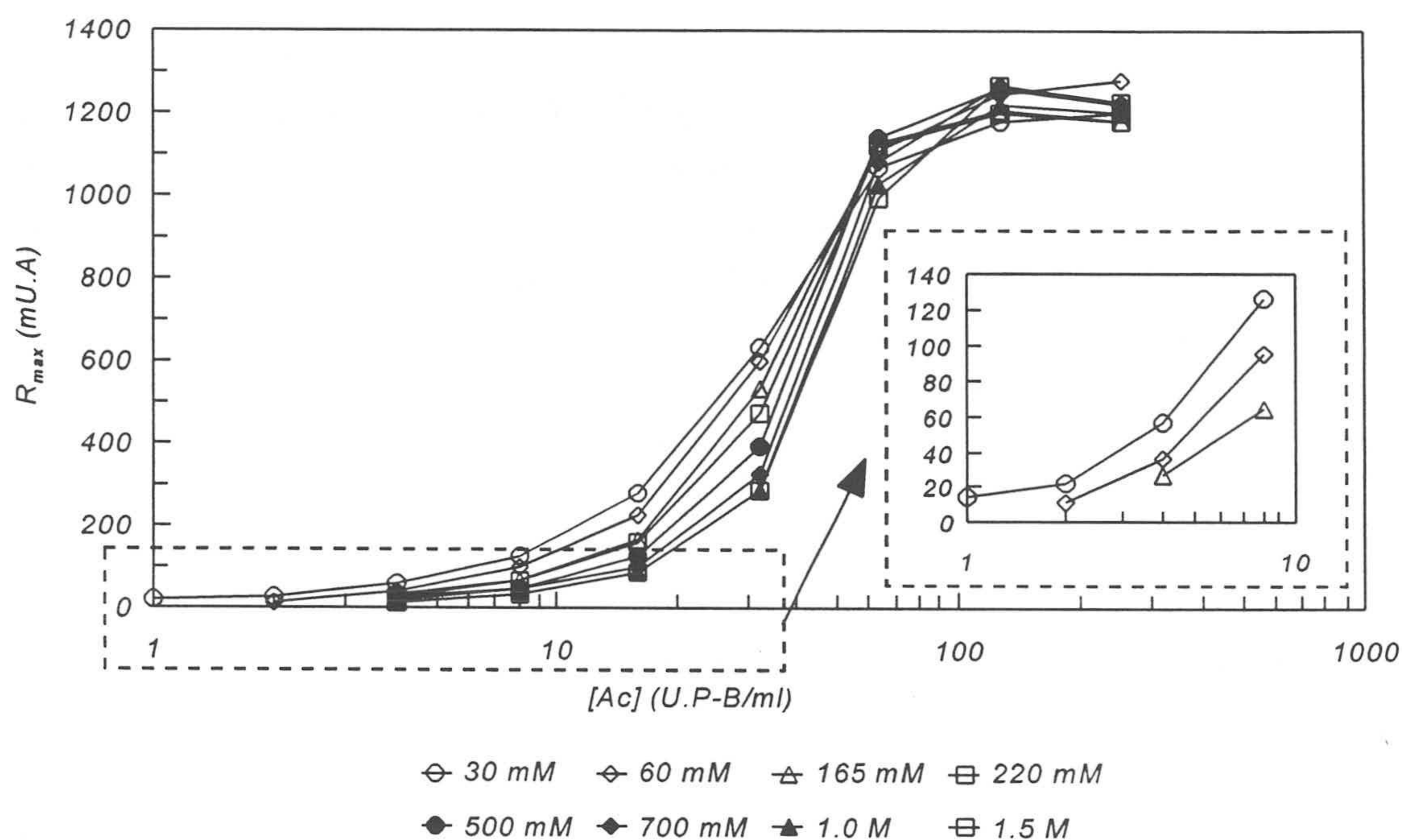


Figura 6.33. Variación de R_{max} con la fuerza iónica. Partícula RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). Número medio de datos por curva.

En la figura 6.33 se observa también que la reactividad disminuye a medida que aumenta la cantidad de electrolito, aunque como ha sucedido anteriormente, las diferencias son mucho menores a alta concentración de aglutinante (64 -256 U.P-B/ml). En el primer tramo (30-165 mM) se debe principalmente a la desaparición de las uniones inespecíficas, pero a partir de 165 mM hasta 1.5 M, habrá que tener en cuenta los mismos parámetros que en el experimento del pH, es decir, viscosidad, índice de refracción y caotropicidad. El carácter caotrópico del NaCl está descrito para un gran número de sistemas proteicos (40, 41, 58-60, 67, 39), aunque el efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los inmuno-complejos hay que analizarlo particularmente en cada caso (76). Incluso está descrito (40, 58) que el NaCl puede reducir el carácter anticaotrópico de la sal fosfatos.

Para saber en que grado afectan n_m , η y la caotropicidad del NaCl a la respuesta, se empleará la velocidad inicial de la curva absorbancia-tiempo, tal y como se hizo en el estudio

del pH. En la figura 6.34 están representadas las curvas de V_0 frente a la concentración de electrolito, correspondientes a 64, 128 y 256 U.P-B/ml. Se han escogido estas cantidades de aglutinante, ya que es donde mejor se observan las diferencias entre las distintas condiciones de reacción. En primer lugar se advierte que la V_0 a 30 y 60 mM es muy elevada comparada con las demás, lo que coincide con los resultados de R_{max} . Al llegar a 165 mM desaparece la componente inespecífica y V_0 tiene un valor similar a la del tampón fosfatos a pH 7 (figura 6.30). A partir de 220 mM el descenso en la respuesta esta originado por la acción conjunta de la viscosidad, índice de refracción y caotropicidad de NaCl. Todo esto se ve con mayor claridad en la tabla 6.16, donde se presentan los valores de la figura 6.34 junto con la absorbancia experimental y teórica (RGD) del blanco, n_m , η/η_0 , $C_2/2-C_1$ (RGD) y el factor de corrección f_c de V_0 respecto de la velocidad inicial a 165 mM. Se ha escogido 165 mM, ya que es la que primera concentración de electrolito que tiene una respuesta semejante a las condiciones habituales de reacción (apartado 5.2.2).

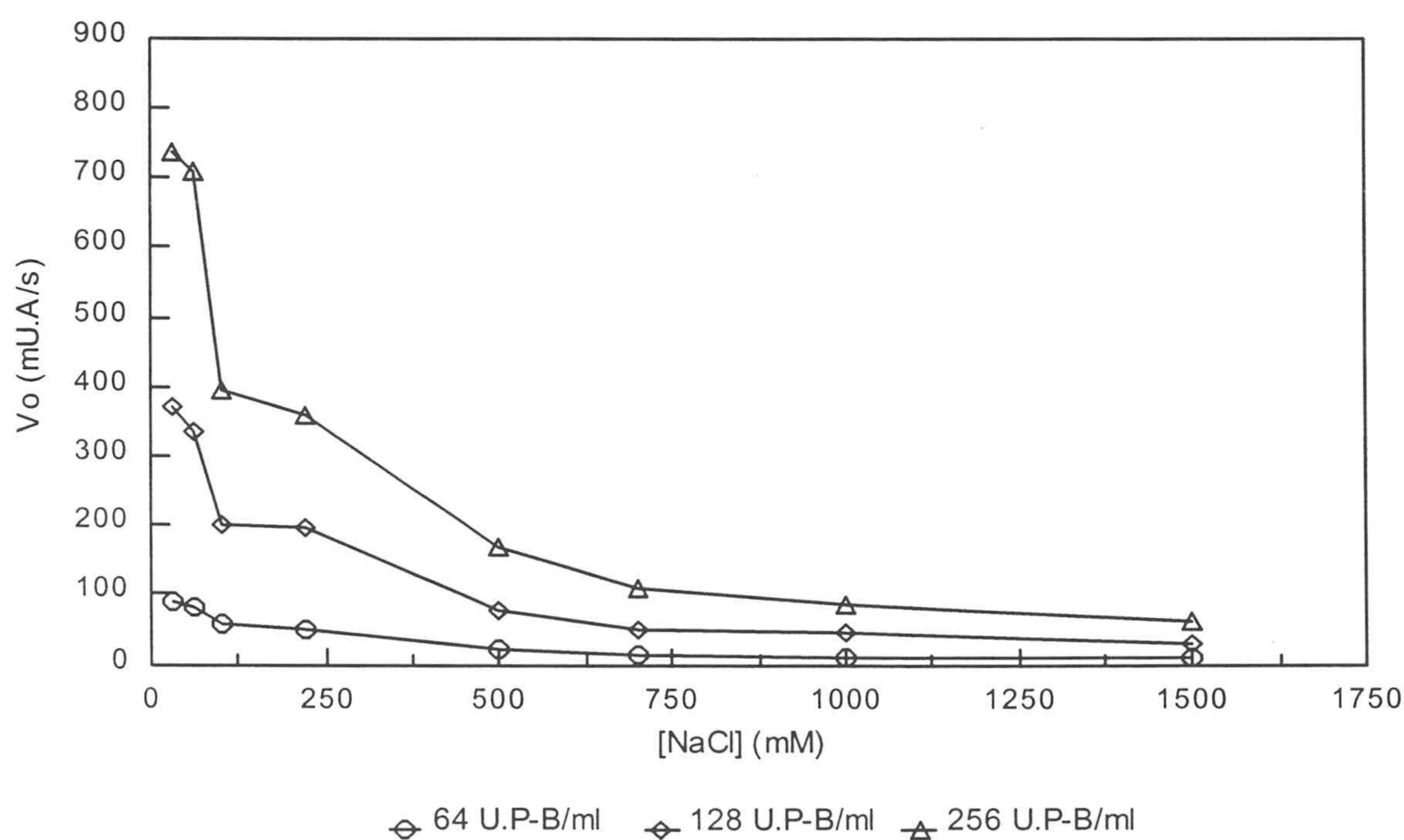


Figura 6.34. Variación de V_0 en función de la concentración de electrolito para 64, 128 y 256 U.P-B/ml. Partícula RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag / m}^2\text{lx}$)

De la tabla 6.16 se deduce que por debajo de 165 mM y por encima de 220 mM, el factor f_c no es suficiente como para igualar las velocidades. En el primer caso (<165 mM) se debe a la inespecificidad y en el segundo (> 220 mM) al efecto caotrópico que ejerce el NaCl sobre la reacción Ag-Ac P-B.

| [NaCl] (mM) | 30 | 60 | 165 | 220 | 500 | 700 | 1000 | 1500 |
|-------------------------------------------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| η/η_0 (20°C) | 1.004 | 1.007 | 1.010 | 1.023 | 1.048 | 1.066 | 1.098 | 1.147 |
| n_m (25°C) | 1.333 | 1.333 | 1.334 | 1.335 | 1.338 | 1.340 | 1.343 | 1.347 |
| Abs (U.A) | 0.7083 | 0.7190 | 0.7084 | 0.7134 | 0.6926 | 0.6819 | 0.6705 | 0.6486 |
| $(C_2/2-C_1) \cdot 10^{12}$ (cm ⁻¹) | 3.534 | 3.534 | 3.507 | 3.478 | 3.395 | 3.400 | 3.259 | 4.133 |
| Abs. Teo (U.A) | 0.7141 | 0.7141 | 0.7092 | 0.7043 | 0.6898 | 0.6802 | 0.6658 | 0.6435 |
| f_c | 0.99 | 0.99 | 1.00 | 1.02 | 1.07 | 1.11 | 1.17 | 1.27 |
| [Ac] (U. P-B/ml) | V_0 (mU.A/s) | | | | | | | |
| 64 | 91±11 | 81±10 | 57±4 | 49±3 | 24±1 | 15±1 | 12±1 | 10±1 |
| 128 | 371±2 | 335±2 | 202±8 | 195±7 | 78±5 | 52±3 | 45±2 | 30±1 |
| 256 | 735±2 | 709±2 | 395±1 | 359±7 | 169±4 | 109±1 | 88±3 | 62±3 |

Tabla 6.16. Experimento de variación de la fuerza iónica. RP-130 ($3.71 \cdot 10^{11}$ cm⁻³, 34 µg Ag/m²lx). Características del medio (n_m , η/η_0) y valores de R_{max} , V_0 , $C_2/2-C_1$ (teoría RGD) y f_c respecto a la V_0 a 165 mM. Abs (U.A) es la absorbancia experimental del blanco y Abs.Teo la teórica.

Existe otra manera de explicar la pérdida de reactividad a medida que aumenta la concentración de electrolito, que son las fuerzas estructurales y más concretamente las de hidratación. Cuando las proteínas se encuentran por encima de su punto isoeléctrico y por tanto cargadas negativamente, por cuestiones de electroneutralidad (ver apartado 6.6.2) unirán a los cationes del medio. Esta es la situación en la que se encuentra el Ag P-B, que en las condiciones de reacción (pH>7) está por encima de su punto isoeléctrico (pH~5). Tal y como han demostrado otros autores (55) en distintos sistemas, a medida que aumenta la fuerza iónica mayor será el número de cationes Na⁺ hidratados unidos a las proteínas, lo que supondrá un aumento del agua de hidratación y por consiguiente de las fuerzas repulsivas entre el Ag P-B y el Ac P-B.

Las fuerzas estructurales de origen estérico podrían justificar la estabilidad de los blancos con la fuerza iónica, pero no cuando hay presente Ac P-B, ya que la inmunoglutinación implica un acercamiento entre las proteínas y por tanto entre sus cadenas.

Como conclusión final se puede decir que los estudios de variación del pH, del tipo de sal y de la fuerza iónica, no han servido para obtener unas condiciones de reacción que incrementen la respuesta a baja concentración de aglutinante (1 y 2 U.P-B/ml), uno de los objetivos de estos experimentos. Sin embargo se ha puesto de manifiesto el carácter anticaotrópico de la sal fosfatos y caotrópico del NaCl, así como la importancia que tienen la viscosidad o el índice de refracción, a la hora de interpretar los resultados de reactividad en un inmuno-ensayo turbidimétrico de soporte coloidal.

6.8 Cinética de reacción: obtención de la constante de formación de dímeros

En el capítulo 3 se describieron algunos procesos controlados por difusión donde está implicada la reacción Ag-Ac y más concretamente el correspondiente a los inmuno-ensayos de soporte coloidal. Se obtuvo la expresión [3.34], ecuación que permite relacionar los factores biológicos, como el grado de recubrimiento o número de aglutinantes por partícula con los propios del reactivo (tamaño de complejo, número de dispersores, etc) o con las condiciones del medio (viscosidad, temperatura, etc). A la hora de utilizar esta ecuación hay que tener en cuenta que:

- ▶ Su origen es la ecuación cinética de Smoluchowski y sólo se puede utilizar en sistemas diluidos.
- ▶ Describe el proceso de agregación en los primeros instantes de reacción. Se considera que las dos únicas especies presentes son monómeros y dímeros.
- ▶ Es aplicable a sistemas donde las reacciones están controladas por difusión (DLCA).
- ▶ Supone que todo el agregante añadido reacciona con la proteína de sensibilización. No existe un equilibrio químico entre el aglutinante libre en disolución y el unido a la partícula. Por esta razón la ecuación [3.34] sólo es aplicable para concentraciones de aglutinante por debajo de la zona de equivalencia.

Partiendo de estas premisas, se realizará un estudio de la agregación de los complejos Ix-Ag P-B, con el látex RP-214 como soporte. A partir de aquí se obtendrá la constante de aglutinación k_f y la relación que tiene con el número inicial de dispersores, la

concentración de aglutinante y las condiciones del medio de reacción (viscosidad). La elección del RP-214 se debe a que los complejos son muy monodispersos y con un tamaño similar al inicial (medidas por P.C.S), lo que influye directamente en el cálculo de la sección eficaz de dispersión, el factor óptico y el número de partículas. Por otro lado, al ser de mayor tamaño, permite trabajar con sistemas más diluidos, ya que necesita de menos cantidad de partículas para llegar a los mismos valores de respuesta que el RP-130, sobre todo en la zona de baja concentración de aglutinante.

A continuación se describirá el método de obtención de la constante de aglutinación k_f , proceso que de manera esquemática se encuentra recogido en el diagrama 6.1.

6.8.1 Condiciones experimentales

Las condiciones experimentales son las siguientes:

► Reactivo látex.

- Monómero: RP-214.
- Tamaño medio del complejo: 211 ± 3 nm (P.C.S).
- Recubrimiento: ≈ 50 μg Ag P-B/ m^2lx .
- Número de partículas: $2.9 \cdot 10^{10}$, $5.7 \cdot 10^{10}$, $8.6 \cdot 10^{10}$, $1.17 \cdot 10^{11}$ y $1.4 \cdot 10^{11}$ cm^{-3} .

► Medio de reacción.

- Concentración de sacarosa dentro de la cubeta de reacción: 0-75 g/l. La adición de sacarosa permite modificar la viscosidad del medio, tal y como se puede ver en la tabla 6.17.
- Temperatura de reacción: 37° C.
- Concentración de aglutinante: 8-256 U.P-B/ml.

Las cantidades de agregante elegidas están entre 8 y 256 U.P-B/ml, ya que por debajo de 8 U.P-B/ml la velocidad inicial con 0 g/l de sacarosa es muy baja y todavía menor a medida que aumenta la viscosidad del medio. Sólo en un caso ha sido necesario utilizar los valores de V_0 a 4 U.P-B/ml, sin que hubiera pérdidas en el ajuste lineal con N^2 (apartado 6.8.3). El tiempo de medida es de 100 segundos.

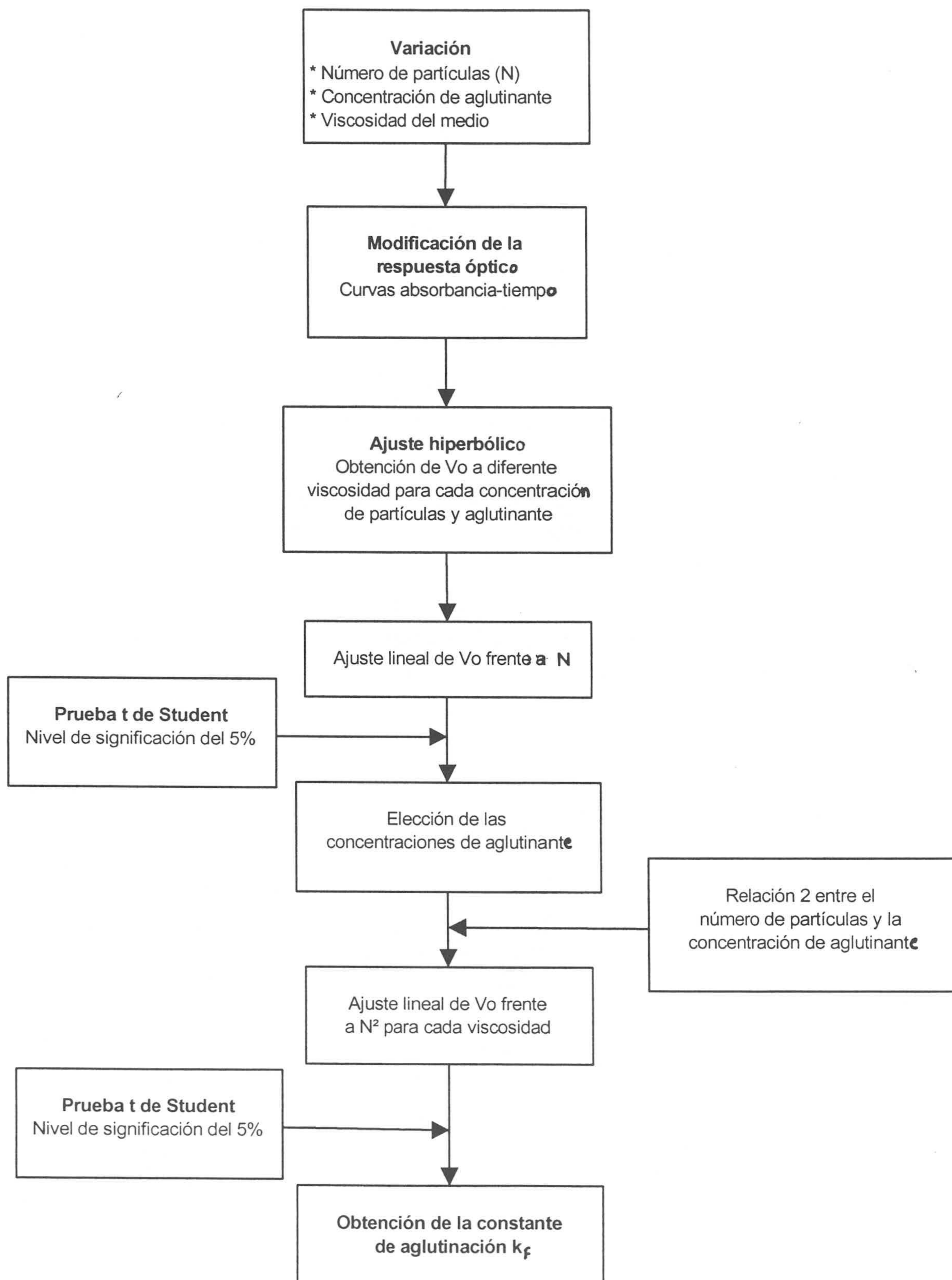
Como no se dispone de un viscosímetro termostatzado (capítulo 4), en vez de la viscosidad absoluta η se ha utilizado la relativa al agua a 20° (η/η_0), ya que este cociente permanece constante en un amplio rango de temperaturas (77). η/η_0 no interviene directamente en el cálculo de la constante de aglutinación, tan sólo se emplea para estudiar el cambio de k_f con la viscosidad del medio.

El aumento de la concentración de sacarosa modifica no sólo la η del medio sino también el índice de refracción. El valor de n_m se ha medido con un refractómetro de la casa ATAGO Abbe (capítulo 4), a una longitud de onda de 590 nm y una temperatura de 20°C. El índice de refracción, a diferencia de la viscosidad, sí que afecta a k_f , ya que la luz dispersada por una colectividad de partículas varía en función de n_m (capítulo 2). De todas formas, en el rango 20-37° C, el cambio del índice de refracción con la concentración de sacarosa está alrededor del 0.15% (77), lo que supone un aumento del 2.5% en el valor de k_f . Esta variación se encuentra dentro del error de la propia técnica, por lo que no se tendrá en cuenta.

En la tabla 6.17 se presentan el cambio del índice de refracción del medio (n_m) y de $C_2/2-C_1$ con η/η_0 a una longitud de onda de 570 nm. C_1 y C_2 se han determinado mediante la teoría RGD.

| Sacarosa | η/η_0 | n_m (20°C) | $(C_2/2-C_1) \cdot 10^{10}$ (cm ²) |
|----------|---------------|--------------|------------------------------------------------|
| 0 g/l | 1.000 | 1.333 | 0.179 |
| 25 g/l | 1.067 | 1.337 | 0.173 |
| 50 g/l | 1.144 | 1.340 | 0.168 |
| 75 g/l | 1.232 | 1.344 | 0.163 |

Tabla 6.17. Variación de n de $C_2/2 - C_1$ con la viscosidad (η/η_0). $\lambda_0=570$ nm.

Diagrama 6.1. Obtención de la constante de aglutinación k_f .

6.8.2 Fundamento teórico

A partir de las ecuaciones [3.34] y [3.35]

$$V_o = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' n_A (n - n_A) N_1^2 \quad [3.34]$$

$$V_{ld} = \frac{l}{2.3} \left(\frac{C_2}{2} - C_1 \right) k' Ac_0 (nN_0 - Ac_0) \quad [3.35]$$

se deduce que

► V_o es lineal con el número de partículas (78, 79) a baja concentración de aglutinante (expresión [3.35]). Al ser el muy bajo el tiempo de medida, se puede identificar N_1 (número de monómeros) con N_0 (concentración inicial de partículas). Para determinar el grado de correlación entre V_o y N_0 , se utiliza el coeficiente r del ajuste lineal y la prueba de la t de Student, ya que de esta manera se puede saber en que % de los casos las dos variables, V_o y N , son aleatorias. El coeficiente de correlación puede variar entre -1 (concordancia perfectamente inversa) y 1 (concordancia perfecta), mientras que si $r=0$ los datos son aleatorios uno con respecto al otro. Como el número de puntos del ajuste es relativamente bajo, se exigirá un nivel de significación (N.S) del 5%, lo que implica que sólo en el 5% de los casos los datos son aleatorios (80). Este criterio determina hasta que concentración de aglutinante es válido el modelo.

► La velocidad V_o es directamente proporcional al cuadrado del número inicial de partículas (expresión [3.34]), por lo que la constante de aglutinación k_f se calcula a partir de la pendiente de la recta de V_o en función de N^2 (79). Ahora bien, para que el producto $k'n_A(n-n_A)$ permanezca constante es necesario que el incremento en número de partículas sea el mismo que el del de la cantidad de aglutinante. Como el agregante aumenta siempre en un factor 2, el número de dispersores tiene que hacerlo en la misma proporción para que n_A se mantenga constante y por tanto $n_A(n-n_A)$. n es siempre el mismo ya que en este experimento se ha trabajado con un único recubrimiento ($50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$).

► Si el proceso de agregación está controlado por difusión, la relación entre k_f y la viscosidad debe ser inversamente proporcional. La aglutinación de proteínas puede ser por difusión o por reacción (81, 82), dependiendo del sistema proteico o de las condiciones del medio. Analizando la variación de k_f con la viscosidad, se puede saber cual es la cinética de agregación, al menos en los primeros estadios de la agregación.

6.8.4 Variación de V_0 con el número de partículas (N)

En un principio se comenzó a trabajar con las cinco concentraciones descritas en el apartado 6.8.2, pero a la hora de analizar los valores de V_0 , se observó que la inclusión de la última ($1.43 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$) empeoraba el ajuste. Con este número de partículas, el sistema evoluciona rápidamente, por lo que el modelo hiperbólico dispone de muy pocos datos para calcular la velocidad inicial. Basta ver la última tabla del capítulo 5, donde el error en el cálculo puede superar el 25%, sobre todo en las concentraciones elevadas de anticuerpo. Lógicamente este error disminuye al aumentar la cantidad de sacarosa en el medio (desciende la velocidad) o al bajar la cantidad de aglutinante.

En las figuras 6.35-(a) y 6.35-(b) se presentan las curvas de $V_0(\text{mU.A/s})$ frente a N para las distintas [Ac] y 0 g/l de sacarosa en el medio de reacción. En la primera se analiza el caso de las tres concentraciones más elevadas, 256, 128 y 64 U.P-B/ml, y en la segunda las tres restantes, 32, 16 y 8 U.P-B/ml. La 6.35-(a) determina que las curvas tienen un comportamiento no-lineal, sobre todo con 256 y 128 U.P-B/ml. También se observa que a $1.43 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ el error de V_0 es muy elevado, tal y como se había comentado. Por otro lado, la figura 6.35-(b) muestra una mayor linealidad con estas cantidades de aglutinante, aunque a 32 U.P-B/ml continúa manifestándose el efecto de la última concentración de partículas sobre la correlación de las variables. En esta gráfica las líneas simples indican los ajustes para cada cantidad de agregante, mientras que la de puntos corresponde a 32 U.-P-B/ml pero utilizando sólo los cuatro primeros valores, de $2.9 \cdot 10^{10}$ a $1.17 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$, lo que ha supuesto una mejora significativa del ajuste. El coeficiente r ha pasado de valer 0.990 a 0.994, que aunque sea un pequeño incremento supone pasar de un nivel de significación (N.S) del 1% a quedarse cercano al 0.1%. El coeficiente r se suele acompañar de su N.S, ya que de esta manera se puede determinar en que % de los casos es igual a cero (no hay correlación). Cuanto menor sea el nivel de significación mejor es el ajuste. A partir de estos resultados, se ha decidido eliminar el último valor ($1.43 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$), con lo que se consigue mejorar la linealidad con 32 y 64 U.P-B/ml, y tener un N.S inferior al 5%. Con 8 y 16 U.P-

B/ml, pasar a 4 a cinco puntos no supone un gran cambio, como se puede comprobar viendo la figura 6.35-(b).

La tabla 6.18 muestra los valores del coeficiente de correlación lineal (r) y del nivel de significación del ajuste, correspondientes al experimento de variación del número de partículas ($2.9 \cdot 10^{10}$ a $1.17 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$), a distinta concentración de sacarosa en el medio de reacción y cantidad de aglutinante (8-256 U.P-B/ml). A partir de estas tablas se establece que el nivel de significación es menor del 5% (el exigido habitualmente) desde 8 U.P-B/ml hasta una cantidad de aglutinante entre 32 y 64 U.P-B/ml. Este resultado determina que la velocidad inicial es lineal con N (primera condición del modelo) hasta 64 U.P-B/ml como máximo, lo que está de acuerdo con las curvas de reactividad de la figura 6.19, donde se observa que 64 U.P-B/ml está dentro de la zona de equivalencia, en la mayor parte de las concentraciones de partículas.

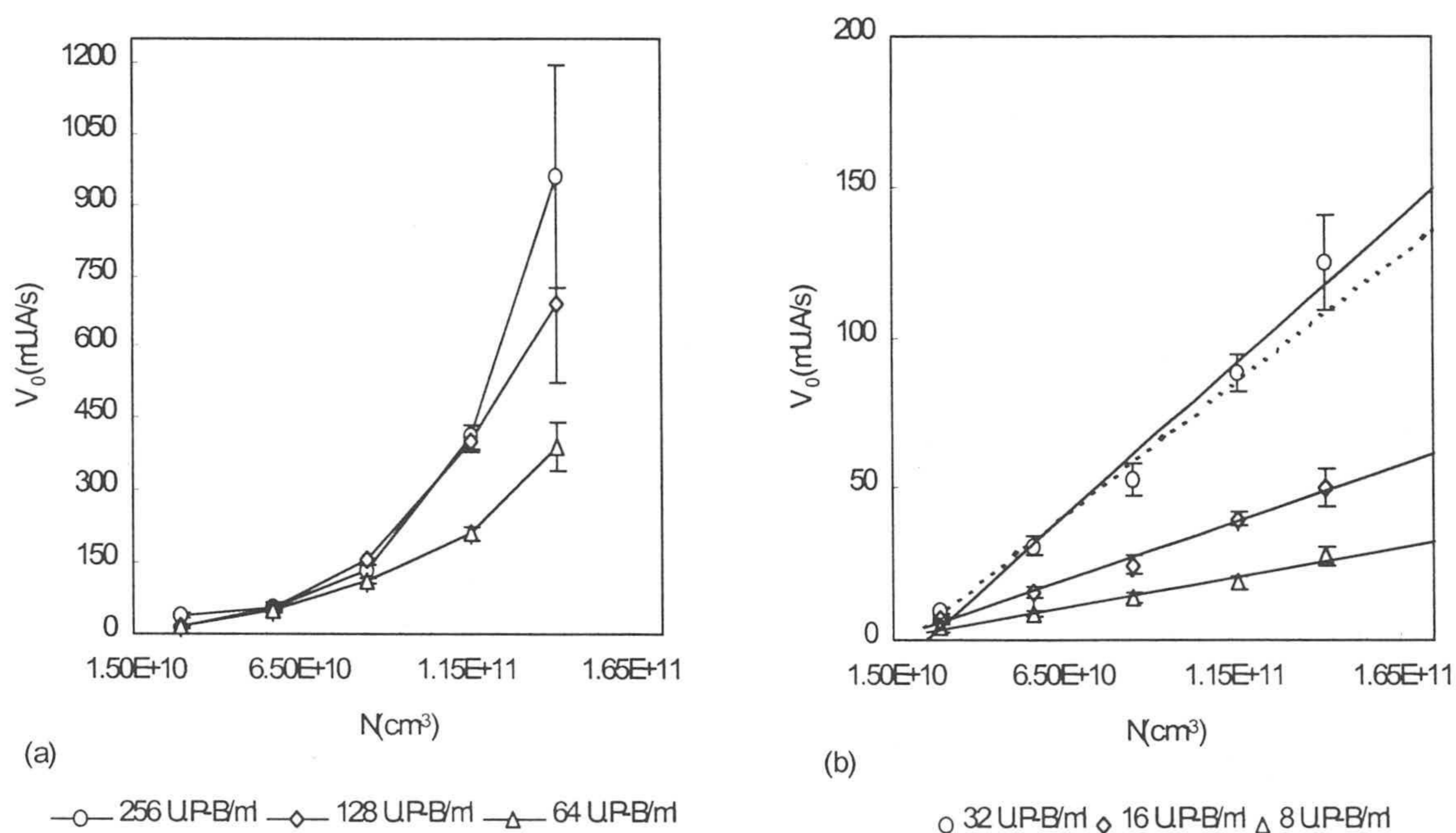


Figura 6.35. Variación de V_0 (mU.A/s) en función de $N(\text{cm}^{-3})$, para seis concentraciones de aglutinante. Gráfica (a): 256, 128 y 64 U-P-B/ml. Gráfica (b): 32, 16 y 8 U.P-B/ml. Partícula RP-214. Recubrimiento: $50 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$.

Este experimento ha puesto también de manifiesto la dificultad que existe a la hora de escoger el rango de variación de N . Por un lado se quiere una buena respuesta (velocidad inicial) con todas las concentraciones de anticuerpo y que además sea

significativamente distinta de cero para las distintas viscosidades. Además, no se puede superar un determinado N , debido a que el sistema puede evolucionar demasiado rápido y el ajuste matemático suministraría unos valores de V_0 con un error muy elevado. Tampoco es posible utilizar una concentración muy baja, ya que la velocidad terminaría siendo prácticamente nula. Por consiguiente, el rango de N que se ha elegido para este experimento, aunque corto, es prácticamente el único que cumple las condiciones exigidas.

| Concentración de sacarosa: 0 g/l | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| N(cm ⁻³) | 256 U.P-B/ml | 128 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml | 8 U.P-B/ml |
| r | 0.903 | 0.942 | 0.981 | 0.994 | 1.000 | 1.000 |
| N.S | >5% | >5% | <5% | <1% | <1% | 0.1% |
| Concentración de sacarosa: 25 g/l | | | | | | |
| N(cm ⁻³) | 256 U.P-B/ml | 128 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml | 8 U.P-B/ml |
| r | 0.894 | 0.933 | 0.972 | 0.990 | 0.993 | 0.992 |
| N.S | >5% | >5% | <5% | <1% | <1% | <1% |
| Concentración de sacarosa: 50 g/l | | | | | | |
| N(cm ⁻³) | 256 U.P-B/ml | 128 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml | 8 U.P-B/ml |
| r | 0.898 | 0.945 | 0.978 | 0.996 | 0.996 | 0.991 |
| N.S | >5% | >5% | <5% | <1% | <1% | <1% |
| Concentración de sacarosa: 75 g/l | | | | | | |
| N(cm ⁻³) | 256 U.P-B/ml | 128 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml | 8 U.P-B/ml |
| r | 0.913 | 0.956 | 0.983 | 0.998 | 1.000 | 0.995 |
| N.S | >5% | <5% | <5% | <1% | 0.1% | <1% |

Tabla 6.18. Partícula RP-214 (50 μg Ag P-B/m²lx). Coeficiente de correlación lineal r y nivel de significación (N.S) para el ajuste lineal de V_0 (mU.A s⁻¹) con N ($2.9 \cdot 10^{10}$, $5.7 \cdot 10^{10}$, $8.6 \cdot 10^{10}$ y $1.17 \cdot 10^{11}$ cm⁻³) y la cantidad de aglutinante. Concentración de sacarosa: 0 g/l -75 g/l.

6.8.4 Variación de V_0 con N^2

Representando V_0 en función de N^2 (ecuación [3.34]) se puede obtener el valor de la constante de aglutinación k_f . En líneas generales los pasos a realizar (diagrama 6.1) son los siguientes :

- Elegir las concentraciones de aglutinante donde la velocidad inicial sea lineal con N (apartado anterior). El factor de proporcionalidad entre el número de partículas por un lado y la cantidad de agregante por otro ha de siempre el mismo. En este caso es igual a dos, tal y como se puede ver en las filas de la tabla 6.19. Como n es igual en todas las concentraciones de partículas, hay que buscar los valores de $[Ac]$ y N que hacen $n_A (n-n_A)$ constante, condición que ha de cumplirse para que V_0 y N^2 tengan una relación lineal.

| | N(cm ⁻³) | | |
|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Ajuste lineal/U.P-B/ml | 2.9·10 ¹⁰ | 5.7·10 ¹⁰ | 1.17·10 ¹¹ |
| 1º Ajuste | 16 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml | 64 U.P-B/ml |
| 2º Ajuste | 8 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml | 32 U.P-B/ml |
| 3º Ajuste | 4 U.P-B/ml | 8 U.P-B/ml | 16 U.P-B/ml |

Tabla 6.19. Ajuste lineal para la obtención de k_f . Partícula RP-214 (50 µg Ag P-B/m²lx).

- Calcular mediante la teoría de Rayleigh-Gans-Debye la sección eficaz de dispersión de los monómeros y dímeros (tabla 6.17) para cada una de las concentraciones de sacarosa. Dentro de C_1 y C_2 están incluidas las modificaciones originadas por el cambio del índice de refracción del medio.
- Realizar el ajuste lineal de V_0 frente a N^2 . En este caso el número de puntos del ajuste es tres (2.9·10¹⁰, 5.7·10¹⁰ y 1.17·10¹¹ cm⁻³) por lo que se exige que el coeficiente de correlación sea superior a 0.997 (N.S=5%).
- Dividir la pendiente del ajuste por el factor $2.3 \cdot (C_2/2 - C_1)^{-1} / 0.744$, donde 0.744 es la longitud

en cm del paso de luz de la célula de medida (Monarch). Este factor es diferente dependiendo de n_m .

► Determinar la constante de aglutinación k_f . Las unidades en las que se expresa esta constante son $\text{cm}^{-3} \text{s}^{-1}$. En la tabla 6.20 están recogidos los parámetros de cada uno de los ajustes de la tabla 6.19 junto con el valor de k_f , para todas las concentraciones de sacarosa.

| | Sacarosa: 0 g/l | | | Sacarosa: 25 g/l | | |
|--------|------------------|------|------------------------------------|------------------|------|------------------------------------|
| Ajuste | r | N.S | $k_f(\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1})$ | r | N.S | $k_f(\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1})$ |
| 1º | 0.998 | <5% | $(2.82 \pm 0.18) \cdot 10^{-12}$ | 0.997 | <5% | $(2.45 \pm 0.18) \cdot 10^{-12}$ |
| 2º | 0.999 | <5% | $(1.15 \pm 0.50) \cdot 10^{-12}$ | 0.999 | <5% | $(1.04 \pm 0.39) \cdot 10^{-12}$ |
| 3º | 1.000 | 0.1% | $(4.55 \pm 0.05) \cdot 10^{-13}$ | 1.000 | 0.1% | $(4.45 \pm 0.03) \cdot 10^{-13}$ |
| | Sacarosa: 50 g/l | | | Sacarosa: 75 g/l | | |
| Ajuste | r | N.S | $k_f(\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1})$ | r | N.S | $k_f(\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1})$ |
| 1º | 0.997 | <5% | $(1.80 \pm 0.11) \cdot 10^{-12}$ | 0.999 | <5% | $(1.31 \pm 0.05) \cdot 10^{-13}$ |
| 2º | 0.999 | <5% | $(7.66 \pm 0.29) \cdot 10^{-13}$ | 0.999 | <5% | $(6.58 \pm 0.02) \cdot 10^{-13}$ |
| 3º | 1.000 | 0.1% | $(3.45 \pm 0.02) \cdot 10^{-13}$ | 0.999 | <5% | $(2.72 \pm 0.01) \cdot 10^{-13}$ |

Tabla 6.20. Ajustes lineales (r, N.S). Valor de la constante de aglutinación k_f a distinta viscosidad. Partícula RP-214 ($50 \mu\text{g Ag P-B/m}^2\text{lx}$).

Las k_f de la tabla 6.20 tienen unos valores similares a los de otros experimentos, donde las constantes se han obtenido por distintos métodos ópticos, como turbidimetría (79, 83, 84), nefelometría (85, 42), PCS (86) o incluso ultramicroscopía (78), para sistemas coloidales donde la agregación se debe a la presencia de una proteína o al aumento de la fuerza iónica del medio. Independientemente de las características del sistema, como recubrimiento, cantidad de partículas, tipo de polímero, etc, la principal diferencia entre las k_f de los complejos [Ix-Ag P-B]-Ac P-B y las de los demás estudios, radica en que las primeras están calculadas a 37°C y a diferentes viscosidades, mientras que en los otros casos es a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y una η próxima a la del agua. Todo esto dificulta la comparación, ya que la constante de velocidad es directamente proporcional a la temperatura (87) e inversamente proporcional a la viscosidad, de manera que no es posible

determinar a que se deben las diferencias. Además la viscosidad tiene una relación inversa con la temperatura. Lo que si se ha podido constatar es que la k_f con 0 g/l de sacarosa (esta es la condición más próxima a la de los otros trabajos) y 37°C es inferior a la de Smoluchowski ($\sim 15 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$), lo que refleja la influencia de los parámetros biológicos n_A y n en la reacción, sobre todo n_A , ya que es el único variable en este caso.

A partir de la tabla 6.20 se deducen una serie de resultados, muchos de los cuales ya se han utilizado y comprobado a lo largo de este capítulo. En primer lugar se observa que al incrementar la cantidad de aglutinante, manteniendo constante la concentración de partículas y el recubrimiento (columnas de la tablas 6.19 y 6.20), la constante de aglutinación, así como la velocidad inicial, aumentan. En estas condiciones el producto $n_A (n - n_A)$ se hace cada vez mayor, lo que incrementa las probabilidades de unión de los complejos [Ix-Ag P-B]-Ac P-B. Sin embargo, en igualdad de agregante y recubrimiento (ecuación [3.28]), un incremento del número inicial de partículas hace a n_A menor, por lo que k_f disminuye, aunque V_0 aumenta, ya que un incremento de N da lugar a mayor número de choques. Por otro lado, si la cantidad de aglutinante y el número de partículas son constantes, mayor viscosidad implica menor probabilidad de encuentro entre los monómeros. En efecto, el movimiento Browniano alrededor de la posición de equilibrio decrece a medida que aumenta η/η_0 .

6.8.5 Variación de k_f con la viscosidad

En los apartados anteriores se ha comprobado que V_0 es lineal con el número de partículas y N^2 , por lo que sólo falta saber si la constante de aglutinación, en igualdad de recubrimiento, cantidad de agregante y N , es inversamente proporcional a la viscosidad del medio. Esta condición es la que establece si el mecanismo de aglutinación es por difusión o por reacción (84, 88-91).

La dependencia de k_f con la viscosidad está incluida en la constante k' de la ecuación [3.28]. Representando k_f en función de η/η_0 no sólo se determina su relación lineal con la viscosidad, sino también el valor teórico de la constante cuando η tiende a cero (máxima difusión). En la aglutinación por sal, si $\eta \rightarrow 0$, al no existir ningún impedimento para la reacción todas las uniones son efectivas y por tanto la constante de aglutinación debe ser igual a la de Smoluchowski. Por el contrario, en la inmuno-aglutinación con soporte coloidal, aunque la viscosidad tienda a cero las partículas no son uniformemente reactivas, ya que la probabilidad de unión depende de la relación entre n y n_A . Esta es una de las mayores diferencias entre estos dos tipos de aglutinación. Otra es el hecho de que n_A , y por tanto la constante cinética de formación de dímeros, sean función del número de partículas.

En la tabla 6.21 están recogidos los parámetros de ajuste para todas las concentraciones de aglutinante, de partículas y de sacarosa. En todos los casos el nivel de significación es igual o mayor que el 5%, por lo que se puede decir que κ_f es inversamente proporcional a η/η_0 . Por tanto, se puede concluir que el mecanismo que controla la aglutinación de los complejos Ix-Ag P-B es la difusión, al menos a tiempo corto. Ahora bien, los coeficientes de correlación no son tan buenos como los de los dos ajustes anteriores (V_0 frente a N y V_0 frente a N^2), aunque los valores de κ_f siguen un comportamiento lineal frente a la viscosidad, tal y como pone de manifiesto la figura 6.35 y el detalle de la misma.

| | 32 U.P-B/ml | | 16 U.P-B/ml | | |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| N | $5.7 \cdot 10^{10}$ | $1.17 \cdot 10^{11}$ | $2.9 \cdot 10^{10}$ | $5.7 \cdot 10^{10}$ | $1.17 \cdot 10^{11}$ |
| Or | $(9.53 \pm 0.07) \cdot 10^{-12}$ | $(3.39 \pm 0.05) \cdot 10^{-12}$ | $(9.53 \pm 0.07) \cdot 10^{-12}$ | $(3.39 \pm 0.05) \cdot 10^{-12}$ | $(1.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-12}$ |
| r | 0.996 | 0.982 | 0.996 | 0.982 | 0.973 |
| N.S | >1% | >5% | >1% | >5% | >5% |
| | 8 U.P-B/ml | | 4 U.P-B/ml | | |
| N | $2.9 \cdot 10^{10}$ | $5.7 \cdot 10^{10}$ | $2.9 \cdot 10^{10}$ | | |
| Or | $(3.39 \pm 0.05) \cdot 10^{-12}$ | $(1.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-12}$ | $(1.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-12}$ | | |
| r | 0.982 | 0.973 | 0.973 | | |
| N.S | >5% | >5% | >5% | | |

Tabla 6.21. Ajuste lineal $\kappa_f - \eta/\eta_0$. Valor de la ordenada en el origen (Or).

Sólo la ordenada en el origen (Or) de 32 U.P-B/ml ($5.7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) y 16 U.P-B/ml ($2.9 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) está próxima a la del límite de Smoluchowski ($\sim 15 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$), mientras que los demás tienen el mismo orden de magnitud pero con un valor mucho menor. Se desconoce si podría obtenerse una constante de aglutinación más cercana a la de Smoluchowski. Por un lado ha sido necesario realizar tres ajustes para calcular Or, uno hiperbólico y dos lineales, por lo que un pequeño error de medida o en los cálculos puede afectar significativamente al resultado final. Por otro se desconoce si las condiciones de trabajo cumplen los requisitos de máximo, que se produce cuando $n_A/n=0.5$. Este factor expresa el grado de ocupación para cada partícula y por tanto su capacidad de reacción. En la expresión [3.27], si $0 < n_A/n \leq 0.5$ un aumento de la cantidad de aglutinante implica mayor

probabilidad de unión, mientras que sucede todo lo contrario si $0,5 < n_A/n \leq 1$.

En la figura 6.36 se presentan las rectas de ajuste $k_f - \eta/\eta_0$ para 16 U.P-B/ml y tres concentraciones diferentes de partículas, $2.9 \cdot 10^{10}$, $5.7 \cdot 10^{10}$ y $1.17 \cdot 10^{11}$ Vease como la constante de aglutinación disminuye a medida que aumenta el número de partículas, ya que la relación n_A/n es cada vez más pequeña. Fijando el número de partículas ($5.7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) y variando la cantidad de aglutinante (32, 16 y 8 U.P-B/ml) se obtiene de nuevo la figura 6.35. Este último resultado es más "intuitivo", ya que un aumento de la concentración de anticuerpo supone mayor k_f .

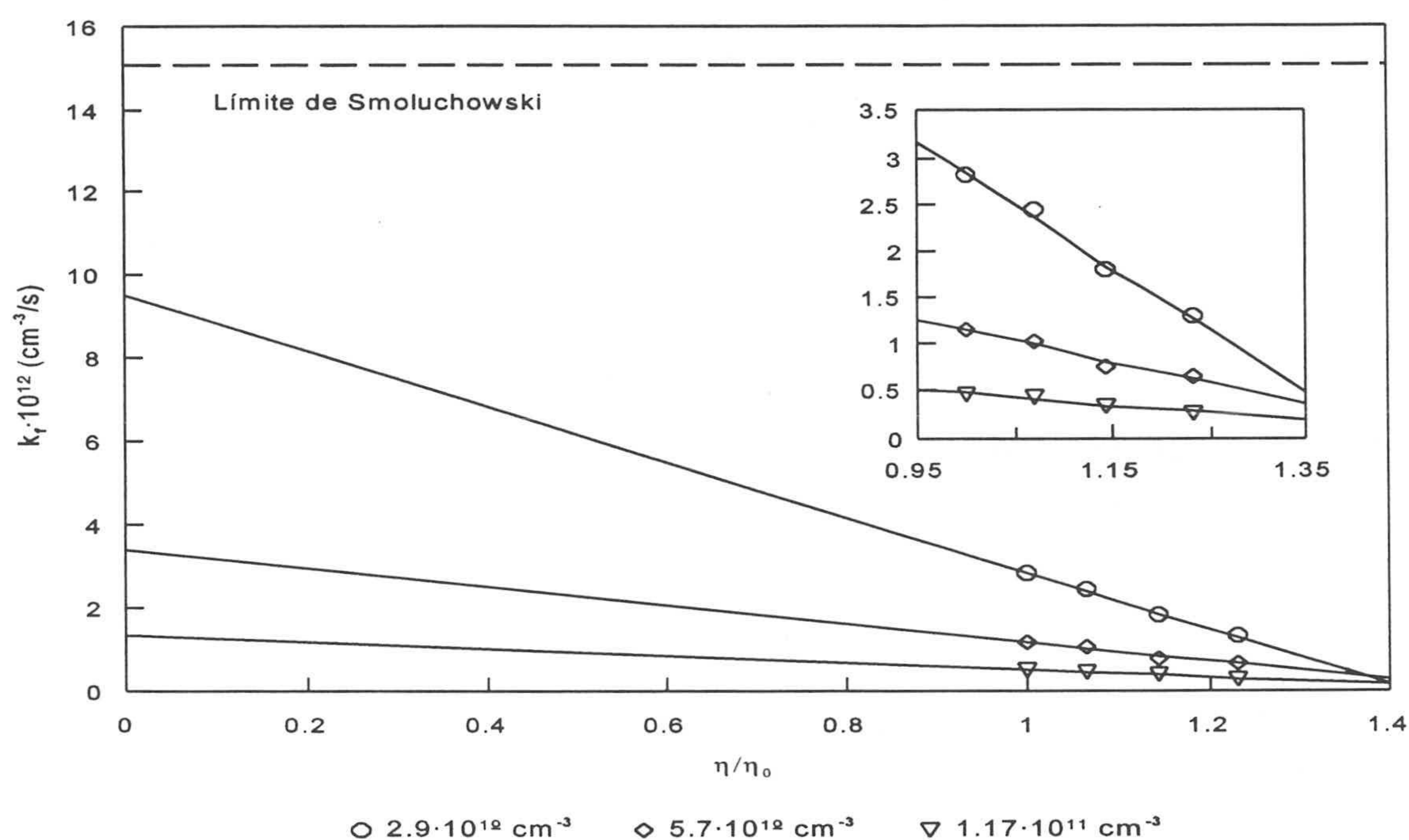


Figura 6.36. Ajuste lineal $k_f - \eta/\eta_0$. Concentración de anticuerpo 16 U.P-B/ml. Número de partículas $2.9 \cdot 10^{10}$, $5.7 \cdot 10^{10}$ y $1.17 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$.

Se puede concluir este apartado diciendo que al menos en los primeros instantes de la reacción, el mecanismo de agregación de los complejos Ix-Ag P-B es DLCA. Sin embargo se desconoce si a tiempos elevados, la aglutinación se produce por difusión o por reacción. Para esto hay que calcular la denominada dimensión fractal d_f , ya que el valor de este parámetro indica el tipo de mecanismo que controla la reacción. Por ejemplo, en el caso de ser DLCA agregado es de 1.8, mientras que en la RLCA vale 2.1 aproximadamente. El cálculo de la dimensión fractal se aplica en un gran número de campos, entre los cuales se encuentra el estudio de la reacción antígeno-anticuerpo (82, 92).

6.9 Morfología de los agregados: obtención de la dimensión fractal

6.9.1 Introducción

El método turbidimétrico que se ha utilizado para determinar la dimensión fractal (93, 94), se basa en que el coeficiente β tiende a d_f cuando los agregados adquieren un comportamiento fractal. β se define como $d \ln Q / d \ln \lambda_0$ (ver apartado 3.7), siendo Q el factor de forma de la turbidez y λ_0 la longitud de onda en el vacío. El parámetro β se determina experimentalmente midiendo la turbidez o la absorbancia óptica a distinta longitud de onda durante la reacción y aplicando la expresión teórica [3.53]:

$$\beta = \frac{d \ln Q}{d \ln \lambda_0} = 4 - \gamma + \frac{d \ln \tau}{d \ln \lambda_0} \quad [3.53]$$

donde γ es un coeficiente que recoge el cambio de n_m y n_e con λ_0 . El proceso acaba cuando β alcanza su valor asintótico.

A continuación y en primer lugar, se presentan las condiciones experimentales que se han utilizado para determinar la dimensión fractal. Seguidamente se calcula d_f para dos agregantes diferentes de 256 U.P-B/ml, uno humano (el habitual) y otro de origen animal. Además de la procedencia, ambos aglutinantes se diferencian también por el tipo de proteína que reacciona con el Ag P-B, en el humano es una IgM y en el animal una IgG.

6.9.2 Condiciones de medida

La aplicación de este método turbidimétrico tiene una serie de limitaciones técnicas relacionadas con la saturación óptica del instrumento, el tamaño final de agregado (parámetro α), el número de partículas y el tiempo de medida.

Saturación óptica.

Para poder calcular d_f por turbidimetría, hay que asegurarse que la absorbancia durante la reacción no supere el valor de saturación óptica del instrumento. Sobrepasar este

límite supone obtener una información errónea, ya que la dimensión fractal se determina cuando el sistema alcanza su mayor estado de agregación. Para simular el aumento de respuesta en el Shimadzu U.V 2101 PC debido a la inmutuaglutinación de los complejos, se ha utilizado un monómero de 800 nm de diámetro. La variación de la absorbancia a distinta longitud de onda (340, 400, 570 y 700 nm) en función de la concentración de partículas está representada en la figura 6.37. Se observa que el límite de absorbancia donde la respuesta del instrumento deja de ser lineal con N está alrededor de 2.5 U.A, independientemente de la longitud de onda. La representación log-log facilita la visualización de la gráfica y sobre todo de los ajustes lineales a 340 y 700 nm.

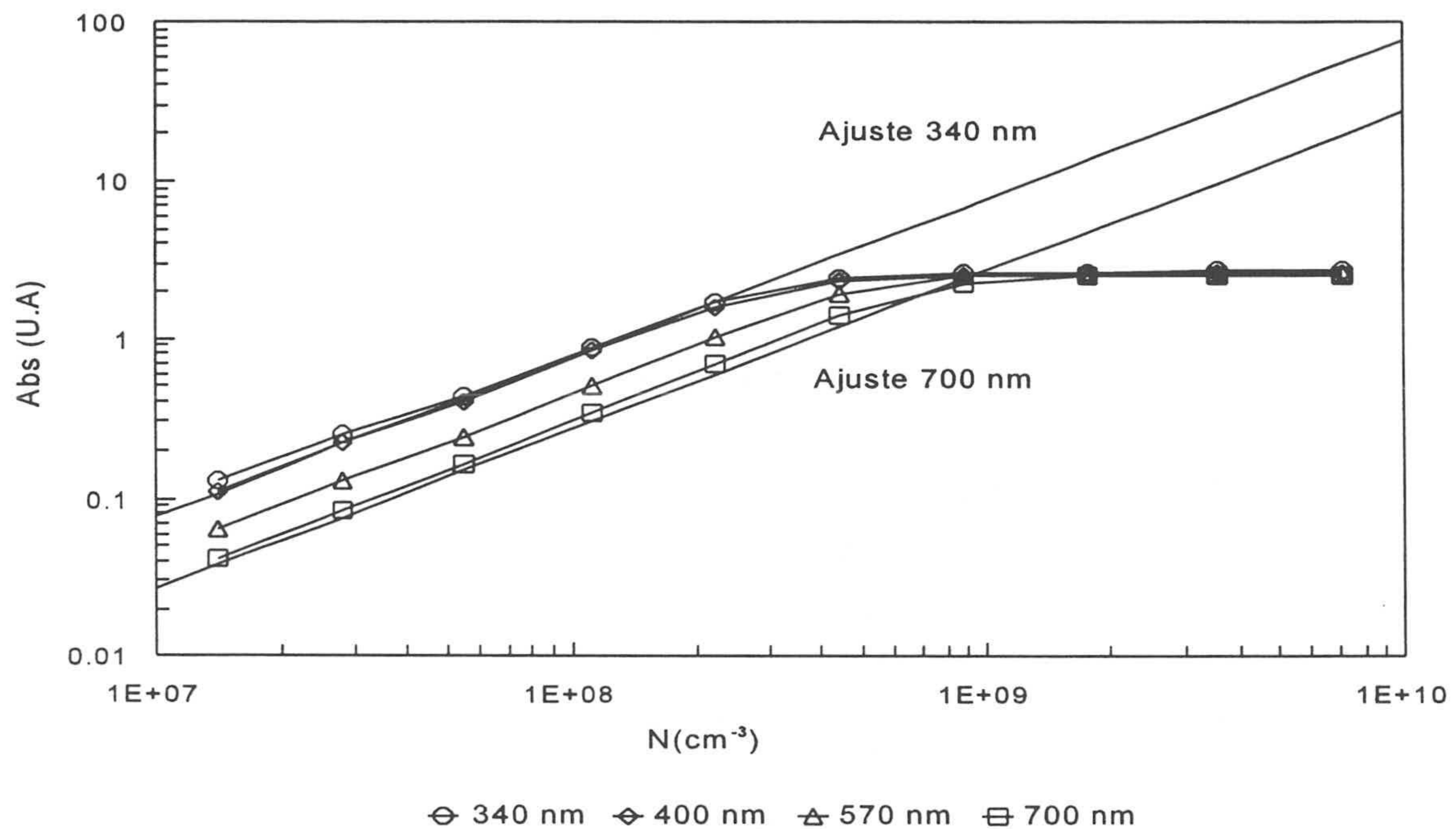


Figura 6.37. Shimadzu U.V 2101 P.C. Partícula de 800 nm. Variación de la absorbancia en función del número de partículas a 340, 400, 570 y 700 nm de longitud de onda.

En las medidas realizadas para la determinación de la dimensión fractal, la absorbancia no han superado en ningún caso 2.5 U.A, por lo que se puede considerar que d_f corresponde al mayor tamaño de agregado.

Parámetro α . Diámetro de agregado y longitud de onda.

En las expresiones teóricas del apartado 3.7 se utiliza la teoría R.G.D, lo que supone una limitación en el valor experimental del parámetro α . La teoría de Rayleigh-Gans-Debye

equivale a la de Mie (capítulo 2) hasta un α aproximadamente igual a 5.5 (ver figura 2.5). Hay que trabajar por tanto con una longitud de onda, que con el tamaño de agregado y el índice de refracción correspondientes, no generen un α muy por encima de 5.5.

El diámetro máximo de agregado alcanzando está alrededor de los 620 nm (aglutinante de origen animal). Tomando este diámetro como valor superior y para cumplir los requisitos teóricos, la dimensión fractal se ha calculado a partir de las absorbancias correspondientes al rango 450-800 nm de longitud de onda, donde α ($\lambda_0=450$ nm) tiene un valor máximo cercano a 5.5 para un tamaño de ~ 600 nm.

El tamaño de agregado durante la reacción se han controlado mediante la razón de absorbancias 340/600. La medida a 340 nm es la única absorbancia que se utiliza por debajo de 450 nm.

Número de partículas.

Hay que elegir una concentración de partículas con una buena reactividad, pero que no sature el instrumento y que además permita distinguir entre las distintas cantidades de analito, sobre todo a tiempos elevados. En el apartado 6.4 (figuras 6.15 y 6.18) se comprobó experimentalmente que con ciertas distribuciones de tamaño, longitud de onda, etc no era posible distinguir la reactividad de dos concentraciones diferentes de aglutinante. Esto también ocurre en el Shimadzu UV 2101 PC, como se puede ver en la figura 6.38, donde se presenta una curva de inmuno-aglutinación obtenida para el RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$, $7.6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) a una λ_0 de 340 nm. Esta concentración de partículas y longitud de onda son muy favorables para que aparezca el "plateau" de R_{max} , que en este caso se sitúa entre 32 y 256 U.P-B/ml. Por esta razón, en el experimento para la determinación de la dimensión fractal, se ha escogido una cantidad inicial de partículas de $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, con la que se ha podido confirmar que no existe el "plateau" de R_{max} en el intervalo de longitud de onda utilizado (450-800 nm). Entre 340 y 450 nm tampoco aparece.

Otro de los factores a tener en cuenta es la relación de volúmenes entre los diferentes componentes del medio de reacción, látex, tampón y muestra. En este caso se ha elegido la misma que utiliza el Monarch 2000 I.L, teniendo en cuenta que en este último la cubeta de medida tiene un paso de luz de 0.744 cm mientras que en el Shimadzu es de 1 cm. La absorbancia óptica es directamente proporcional al paso de luz (expresión [2.26]).

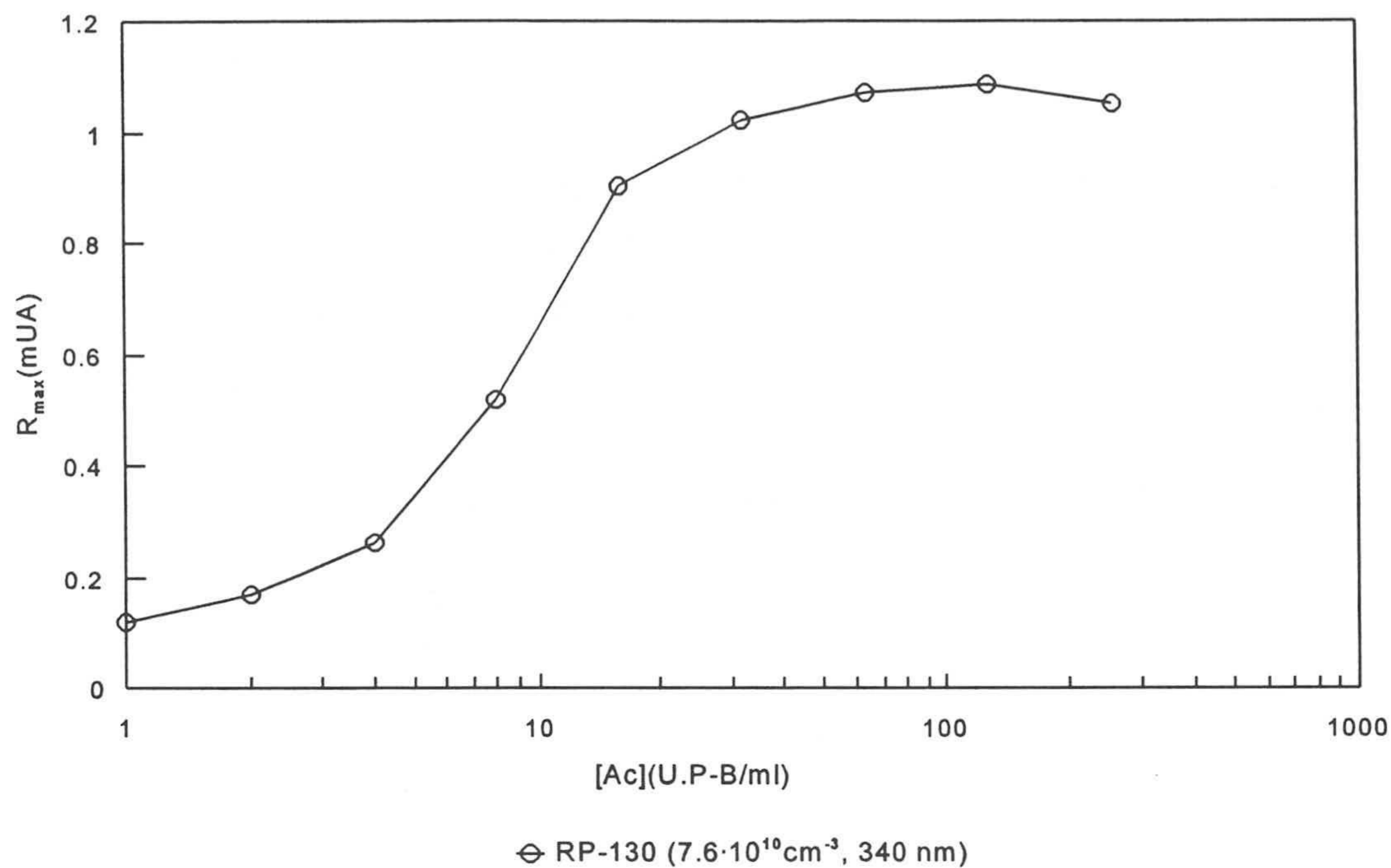


Figura 6.38. Shimadzu UV 2101 PC. Curva de inmunoaglutinación del RP-130 ($7.6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, $\lambda_0=340 \text{ nm}$). Número medio de datos analizados:4900.

Tiempo de medida.

El tiempo de medida debe ser lo suficientemente elevado para que β alcance su valor asintótico. Ahora bien, si este tiempo es demasiado alto pueden aparecer procesos de reestructuración y sedimentación de los agregados, lo que puede cambiar significativamente el resultado. Una reordenación dentro del agregado provoca un aumento de la dimensión fractal (estructura más compacta) mientras que la sedimentación tiene un efecto contrario (desaparición de las especies de mayor tamaño).

► Reestructuración

En todos los experimentos realizados la dimensión fractal es próxima a 2.5, lo que puede estar debido a una reestructuración interna del agregado. En el apartado 3.6 se comentó que la manera de saber si existe reordenación dentro del fractal, es estudiar la evolución temporal de la distribución de tamaños durante la reacción y determinar el parámetro de homogeneidad λ de van Dogen y Ernst. Conocida la dimensión fractal y $\xi(t)$, se puede calcular λ . Si λ es igual a 0, el proceso está controlado por difusión (DLCA) y la curva $\xi(t)$ -t tiene un comportamiento potencial (expresión [3.44]-(a)). Por el contrario, si λ vale

1, el mecanismo es de reacción (RLCA) y $\xi(t)$ se ajusta a una exponencial (expresión [3.44]- (b)).

En turbidimetría se puede estudiar la distribución de tamaños (ver referencias 18-22 y 24 del capítulo 5), pero sólo en sistemas monodispersos o poco polidispersos, y no en el caso de un proceso de agregación a tiempo largo. Por tanto no es posible, o al menos no se ha encontrado en la bibliografía, determinar el parámetro de homogeneidad λ a partir de las medidas de turbidez. Ahora bien, en los experimentos que se presentarán a continuación, el crecimiento de los agregados durante la reacción se ha seguido mediante la razón 340/600 (ver figuras 6.45 y 6.51) y se ha podido comprobar en todos los casos que existe una dependencia potencial entre $\xi(t)$ y t . La diferencia con otros estudios, es que se obtiene un λ negativo, lo que indica un proceso donde la aglutinación se debe a la unión de pequeños agregados.

A la espera de confirmar este resultado por otras técnicas, como por ejemplo el PCS, existirán por tanto dos posibles justificaciones para una d_f tan elevada (~ 2.5): la unión de pequeños agregados o la reordenación interna del fractal. Ambos son factibles, sobre todo en el caso concreto de un inmuno-diagnóstico de soporte coloidal. En este tipo de sistemas, para que dos partículas/agregados se unan, es necesaria una difusión traslacional y rotacional, además de un reconocimiento y reajuste de las proteínas (formación del "encounter complex") lo que hace al proceso de agregación aun más lento. Además, la unión entre las proteínas puede cambiar no sólo su estructura, sino también la especificidad de las mismas, sobre todo del anticuerpo. En estas condiciones es muy posible que los agregados que se formen sean de pequeño tamaño.

Por el contrario, si el agregado tiene una magnitud elevada, puede que este se fragmente durante la etapa de ajuste de las proteínas, fase donde actúan las interacciones secundarias, para a continuación volver a unirse, dando lugar a un fractal aun más compacto. Este resultado no sólo se ha obtenido en sistemas que aglutinan por la presencia de dos proteínas específicas (95), sino también cuando las partículas están recubiertas de detergentes como el SDS (96) o con polímeros como el óxido de polietileno o la poli (N-isopropilacrilamida) (97). En estos casos no sólo se plantea la posibilidad de que la unión sea reversible, sino también de que el enlace sea elástico debido a la presencia de las moléculas de polímero (96), lo que igualmente podría suceder en el caso de las proteínas. Existen también modelos informáticos como el SAK (Shih-Aksay-Kikuchi) (98, 99) que permiten simular la reordenación de un fractal debido a una ruptura interna y posterior recolocación.

Finalmente, en este trabajo no se ha podido llegar a ninguna conclusión en el tema de la reestructuración. Se espera poder confirmarlo por otras técnicas. Lo que parece claro

es la dependencia potencial de $\xi(t)$ con el tiempo (ver figura 6.56), comportamiento que corresponde a un proceso con un $\lambda < 1$.

► Sedimentación

Para evaluar la sedimentación a tiempos de medida elevados, se han utilizado dos maneras diferentes. La primera se puede calificar de óptica, ya se que realiza un seguimiento de la absorbancia a baja longitud de onda, que es donde mejor se observa el descenso provocado por la sedimentación. Por otro lado, si los agregados precipitasen, el tamaño de partícula calculado por el método turbidimétrico (razón 340/600) sería cada vez mayor, ya que la sedimentación afecta más a la absorbancia óptica a 340 nm que a 600 nm. Por consiguiente, si la razón 340/600 llega a un "plateau" para un determinado tiempo de medida, eso significa que el sistema ha alcanzado su mayor estado de agregación y que el efecto de la precipitación de los agregados es mínimo.

La otra manera es a partir de la expresión teórica que calcula la velocidad v_s de sedimentación de un agregado de radio ξ , y que viene dada por (100)

$$v_s = \frac{2g}{9\eta} (\rho - \rho_0) \left(\frac{\xi}{R}\right)^{d_f-1} \quad [6.12]$$

donde g es la aceleración de la gravedad y ρ y ρ_0 son las densidades de la partícula de poliestireno y del medio respectivamente.

Ahora bien, es necesario escoger un tiempo de medida lo suficientemente elevado como para que β alcance su valor asintótico. Para saber que si se cumple esta condición, se hará uso de la expresión [3.53] (figura 3.10), donde se comprueba que $\ln(\beta)$ es lineal con $\ln(\xi)$ hasta que β alcanza su valor asintótico, tal y como se puede ver en la gráfica 6.39, donde se representa la variación de $\ln(\beta)$ frente a $\ln(\xi)$ para $d_f=2.5$ junto con su ajuste lineal. La regresión está calculada entre 50 y 1200 nm y tiene un coeficiente r de 0.995. Por otro lado, a partir de la ecuación [3.44]-(a) se deduce que $\ln(\xi)$ es lineal con $\ln(t)$. Por tanto, $\ln(\beta)$ será lineal con $\ln(t)$, al menos hasta que β se acerque a su valor asintótico. Esta es una manera de saber si el tiempo de reacción es el apropiado, ya que β alcanza su asíntota cuando los agregados tienen un comportamiento fractal.

Un ejemplo de esto es el experimento que se presenta en la figura 6.40, donde se examina la evolución temporal de β (RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) para cinco concentraciones

diferentes de aglutinante 16, 32, 64, 128 y 256 U.P-B/ml (suero de origen humano). El tiempo de medida varía entre 40 y 4120 s con intervalos de 1 minuto hasta la primera media hora, a partir de la cual las medidas son cada 4 minutos. El monómero utilizado es el RP-130, con un recubrimiento de $34 \mu\text{g Ag/m}^2$ lx y con un número inicial de partículas de $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. En la figura 6.40 se comprueba que el tiempo de medida no es suficiente para que β llegue a su valor asintótico, aunque se observa que es prácticamente el mismo en todas las concentraciones de aglutinante (tabla 6.22). Sólo existen diferencias en los primeros instantes, que es donde se producen los mayores cambios de absorbancia por unidad de tiempo.

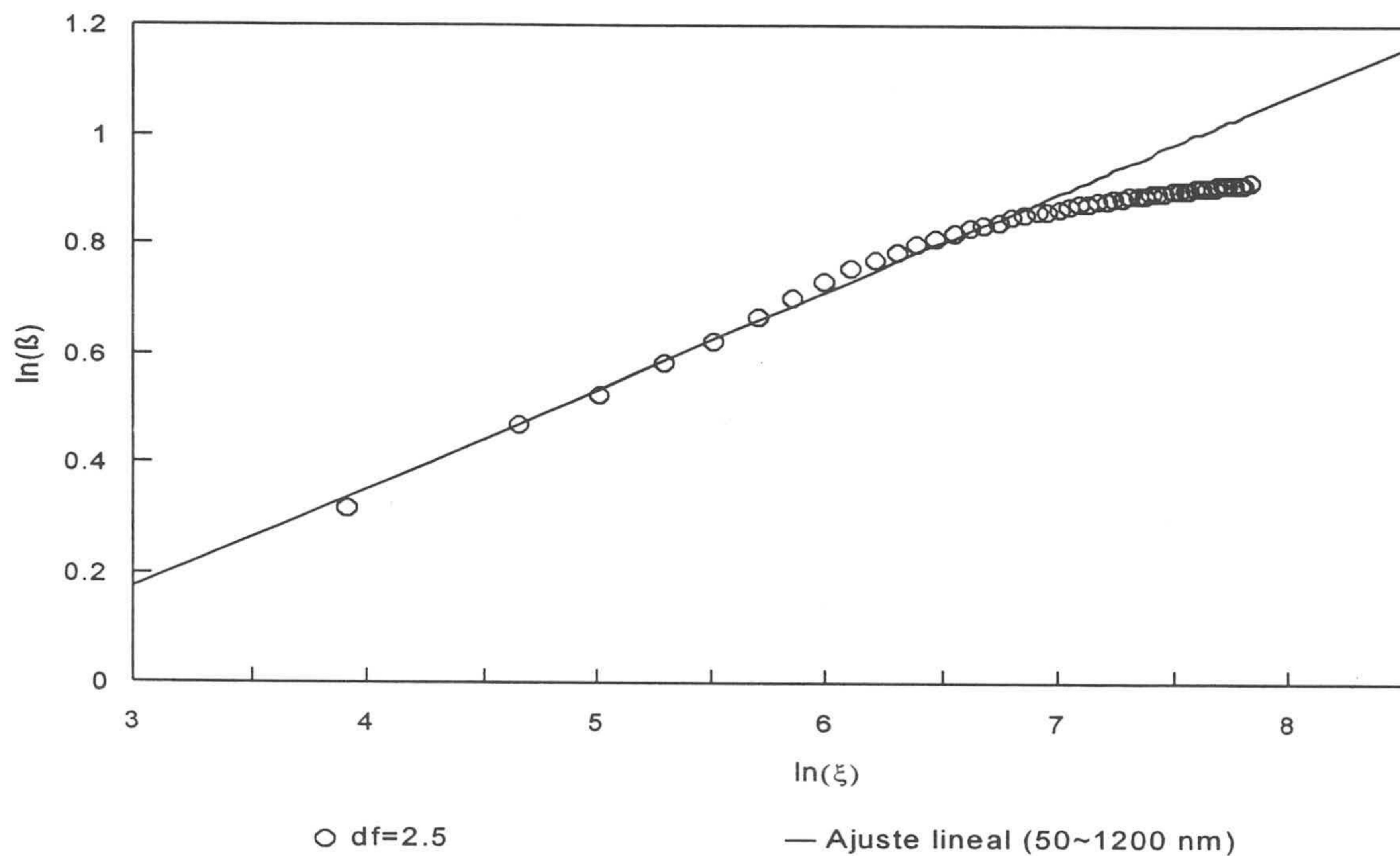


Figura 6.39. Variación teórica de $\ln(\beta)$ con $\ln(\xi)$. Separación del comportamiento lineal.

Aparte de que β sea asintótico o no, está su propio valor, ya que si la dimensión fractal fuese 2.25, correspondería a un sistema donde el mecanismo de reacción no es ni difusión ($2.25 > 1.8$) ni reacción ($2.25 > 2.1$). Por tanto, para que β quede perfectamente definido es necesario aumentar el tiempo de medida, controlando en todo momento la sedimentación de los agregados.

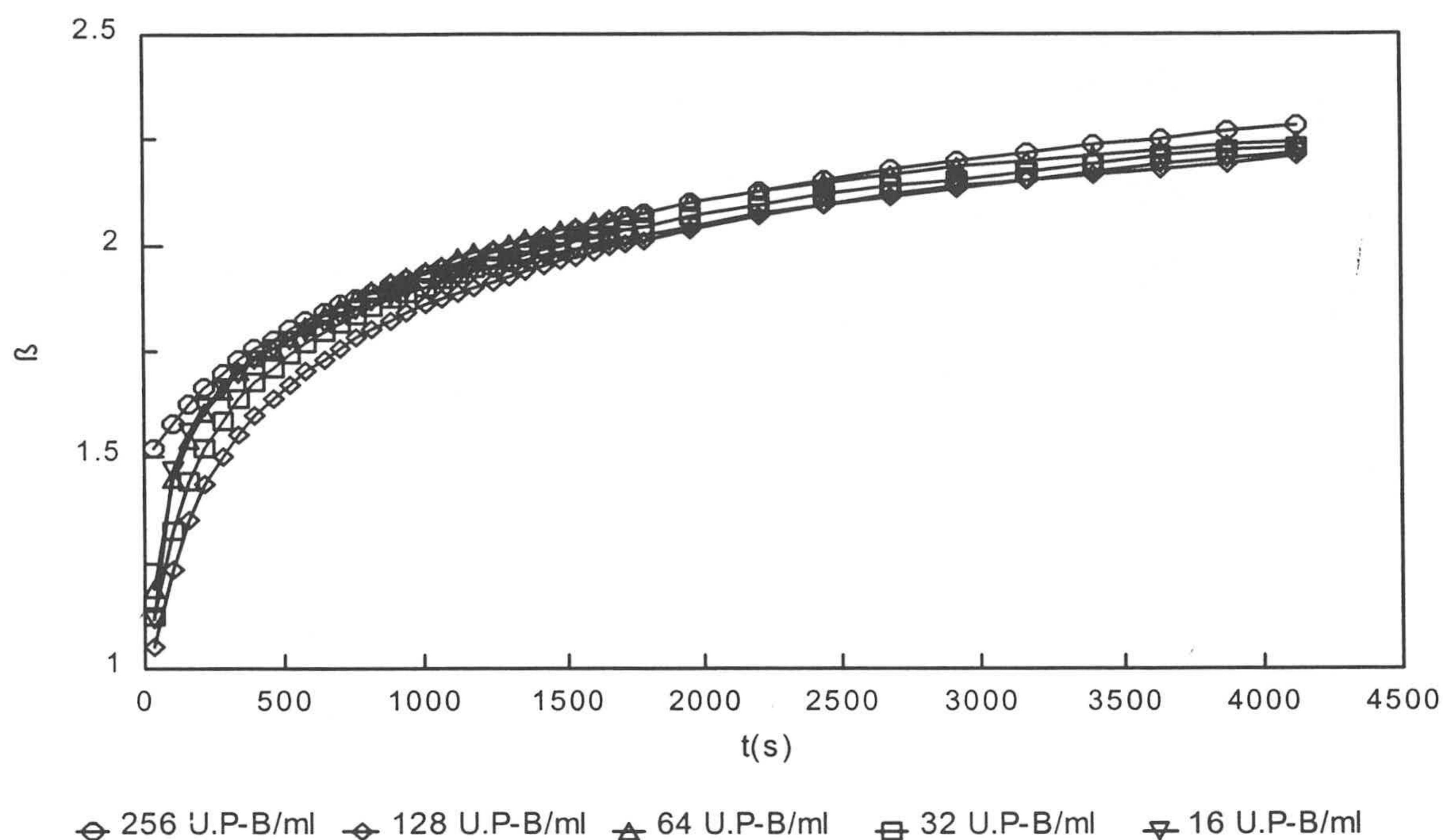


Figura 6.40 Variación de β (RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) con el tiempo (4120s) para cuatro concentraciones de aglutinante: 256, 128, 64, 32 y 16 U.P-B/ml (suero humano).

| U.P-B/ml | β (4120s) |
|----------|-----------------|
| 256 | 2.28 ± 0.01 |
| 128 | 2.21 ± 0.01 |
| 64 | 2.25 ± 0.01 |
| 32 | 2.23 ± 0.01 |
| 16 | 2.22 ± 0.01 |

Tabla 6.22. Valor del parámetro β (RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, 4120 s) para cuatro concentraciones distintas de Ac P-B: 256, 128, 64, 32 y 16 U.P-B/ml (suero humano).

Que el parámetro β valga lo mismo independientemente de la concentración de aglutinante, es un resultado muy interesante, que pone de manifiesto el control que ejercen las proteínas de sensibilización y aglutinación sobre la reacción y la estructura final del agregado (ver apartado 6.3.3). Parece que el mecanismo de agregación no cambia al

modificar la relación entre el número total de Ag P-B (n) y el de agregantes n_A (Ac P-B) por partícula. Por este resultado se ha preferido incluir la puesta a punto de la técnica dentro del presente capítulo y no en el de métodos.

Finalmente, las condiciones que se han escogido para la determinación de la dimensión fractal son las siguientes:

- ▶ Monómero. Partícula RP-130 con un recubrimiento de $34 \mu\text{g Ag/m}^2$ lx. El diámetro medio del complejo RP-130-Ag P-B es de $142 \pm 5 \text{ nm}$ (PCS).
- ▶ Número de partículas: $\sim 5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$.
- ▶ Tiempo de medida. Se han probado varios entre 1 y 3 horas, y al final se ha escogido este último. Las medidas realizadas a distinta longitud de onda con el espectrofotómetro Shimadzu UV 2101 PC tienen el inconveniente de que no son simultáneas, ya que instrumento tarda unos 10 segundos en realizar todo el barrido. Este tiempo es significativo, sobre todo en los primeros instantes de la reacción, donde los cambios de absorbancia son muy rápidos. Para solucionar este problema se ha establecido un intervalo de cinco minutos entre cada uno de los barridos, lo que minimiza la falta de simultaneidad de las medidas a distintas λ_0 .
- ▶ Concentración de aglutinante. Como β es prácticamente igual en el intervalo 16-256 U.P-B/ml (figura 6.40), para los experimentos siguientes sólo se utilizarán dos concentraciones, 32 y 256 U.P-B/ml.

6.9.3 Efecto de la concentración y naturaleza del aglutinante

Dentro de este apartado se han utilizado dos aglutinantes diferentes, uno humano de 256 U.P-B/ml (el habitual) y otro con el mismo título pero de origen animal (capítulo 4) que desde ahora en adelante se nombrarán como agregante/aglutinante IgM e IgG, respectivamente. Es importante destacar que la diferencia entre ambos no sólo se debe al tipo de proteína que aglutina, sino también a que la IgM es un heterófilo mientras que la IgG es un anticuerpo que se ha fabricado específicamente contra el Ag P-B. Esto podría ser el responsable de las diferencias encontradas a nivel de respuesta entre los dos agregantes, tal y como se verá más adelante.

6.9.3.1 Obtención de la dimensión fractal. Agregante IgM

En la figura 6.41 se presenta la variación del parámetro β en función del tiempo para dos concentraciones de aglutinante, 32 y 256 U.P-B/ml, donde el valor asintótico de β es de 2.45 ± 0.02 para 32 U.P-B/ml y de 2.46 ± 0.02 con 256 U.P-B/ml. Una d_f próxima a 2.45 pertenece a una estructura muy compacta, como se ha podido comprobar a nivel experimental (86, 87, 96, 98) con otros sistemas coloidales, o en la simulación por ordenador (96, 99).

En la figura 6.41, se observa que a pesar de que la relación entre número de lugares totales por partícula n y los ocupados por aglutinantes n_A sea diferente, la dimensión fractal con 32 (exceso de antígeno) y 256 U.P-B/ml (exceso de anticuerpo) es prácticamente la misma, lo que confirma el control que ejercen las proteínas de sensibilización y agregación en este reactivo.

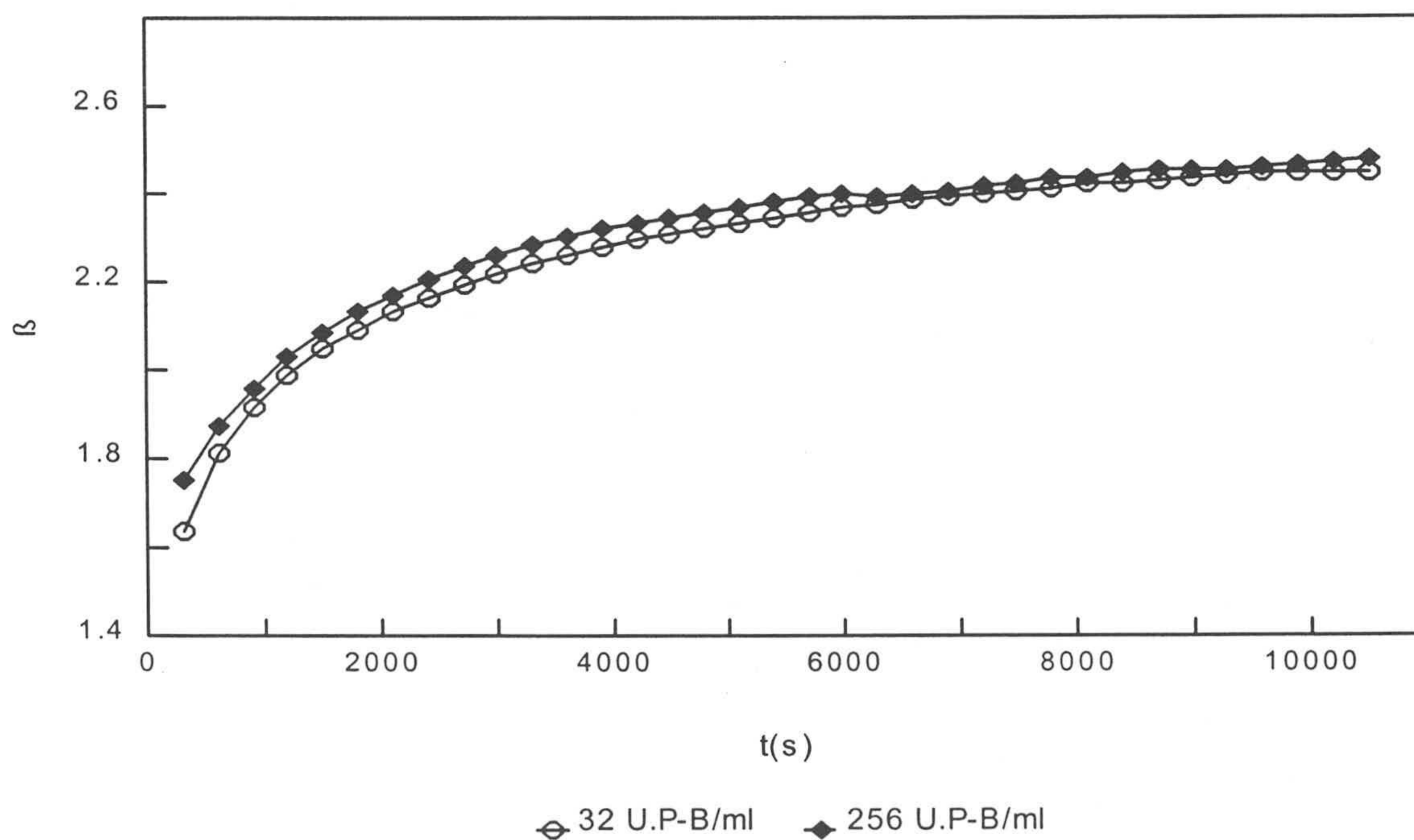


Figura 6.41. Variación de β en función del tiempo (10510s \approx 3h) para dos concentraciones de aglutinante, 32 y 256 U.P-B/ml (agregante IgM). RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{lx}$), $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$.

La figura 6.42 muestra las curvas $\ln(\text{Abs}) - \ln(\lambda_0)$ (32 y 256 U.P-B/ml) para un tiempo de medida igual a 10510 s, a partir de las cuales se obtiene β . Vease como ambas curvas tienen prácticamente la misma pendiente, y por tanto valor de β , aunque provengan de dos

concentraciones de aglutinante distintas, lo que indica que la dimensión fractal depende de la evolución temporal de la respuesta pero no de su valor. Este resultado demuestra también, que la concentración de partículas es la apropiada para que las distribuciones de tamaños correspondan a valores de absorbancia diferentes, y que no aparezca el "plateau" de respuesta a ninguna longitud de onda.

Para saber si β alcanza su valor asintótico, se aplica el método desarrollado en el apartado 6.9.2, que consiste en evaluar la variación de $\ln(\beta)$ en función de $\ln(t)$. Esto es lo que se presenta en la figura 6.43 para la muestra de 32 U.P-B/ml. Veáse que a tiempos elevados $\ln(\beta)$ se separa de la recta de ajuste, que en este caso está calculada entre 600 y 7000 s aproximadamente, con un coeficiente de regresión de 0.996. Este comportamiento aparece igualmente con 256 U.P-B/ml, por lo que el tiempo de medida es más que suficiente como para determinar la dimensión fractal para las dos concentraciones de aglutinante.

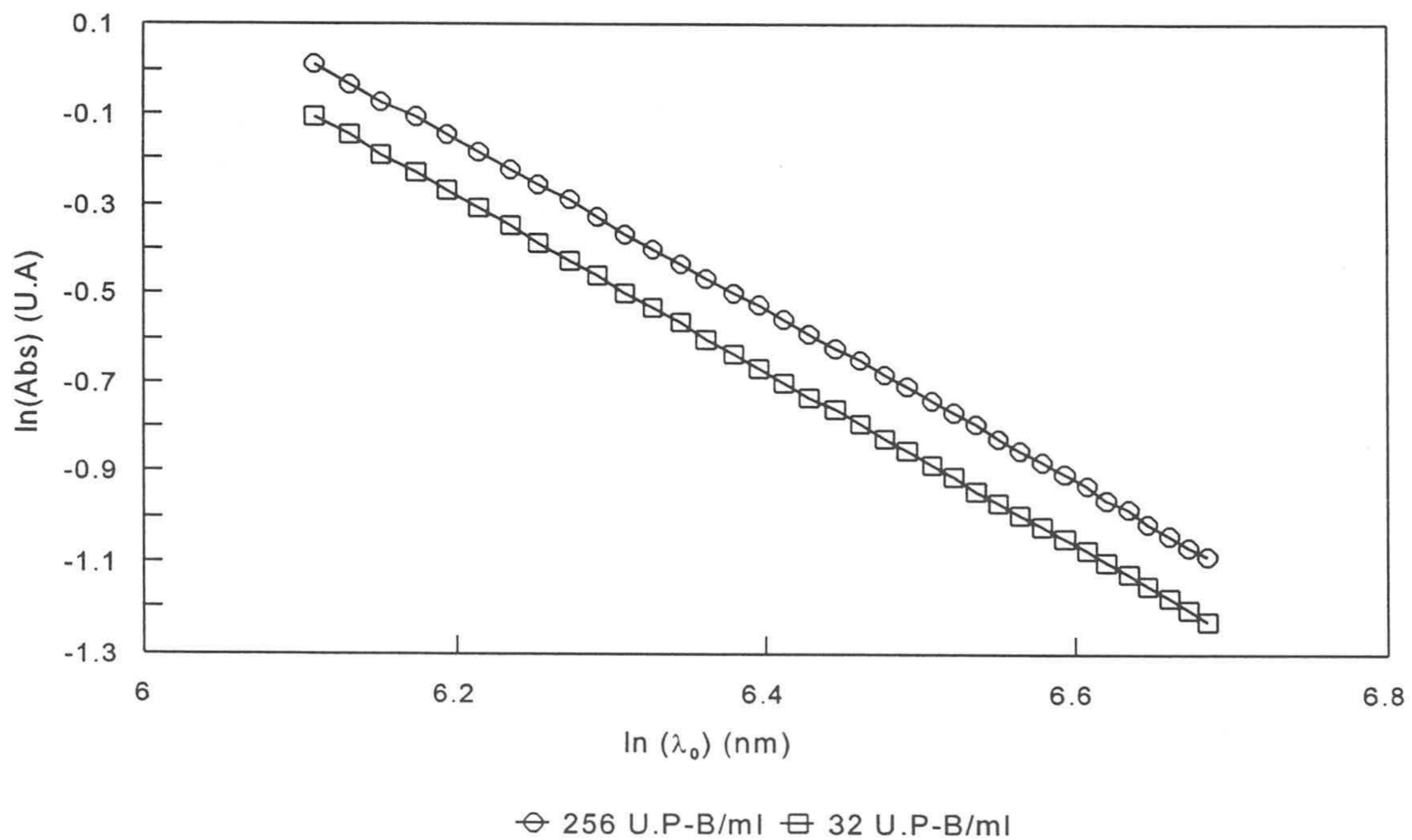


Figura 6.42. Variación de $\ln(\text{Abs})$ (U.A) en función de $\ln(\lambda_0)$ (nm) para el aglutinante IgM (32 y 256 U.P-B/ml). Tiempo de medida: 10510 s. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$.

Para evaluar la sedimentación, en las figuras 6.44-(a) y (b) se presenta la evolución temporal de la absorbancia a dos longitudes de onda, una baja (400 nm) y otra alta (600 nm). A 400 nm se observa un descenso de la absorbancia que no llega al 5% del valor máximo, mientras que a 600 nm no existe pérdida, sino que se llega a un "plateau". Esta bajada no afecta al valor de la dimensión fractal, ya que es prácticamente indetectable a una longitud

de onda por encima de 450 nm (límite inferior de medida). Sin embargo la sedimentación si que puede modificar la razón 340/600, debido a que el descenso de la absorbancia óptica a 340 nm está alrededor del 7%. La figura 6.45 muestra el cambio de la razón 340/600 durante la reacción, junto con su correspondiente tamaño de agregado. Si la variación de la absorbancia fuese muy elevada, la razón bajaría continuamente y no alcanzaría un comportamiento asintótico, como sucede en este caso. El cociente de absorbancias llega a un valor mínimo de 3, lo que equivale a un diámetro medio de 580 nm.

Aplicando la expresión [6.12], se obtiene que la velocidad de sedimentación de un agregado de 580 nm de diámetro, con una dimensión fractal de 2.46 y un radio inicial de monómero de 71 nm, es del orden de $3 \cdot 10^{-12}$ m/s, lo que equivale a $1.1 \cdot 10^{-5}$ mm/h. Por consiguiente se puede considerar despreciable el efecto de la precipitación de los agregados en el resultado final, tal y como se había deducido de las medidas de absorbancia (figura 6.44) y tamaño (figura 6.45).

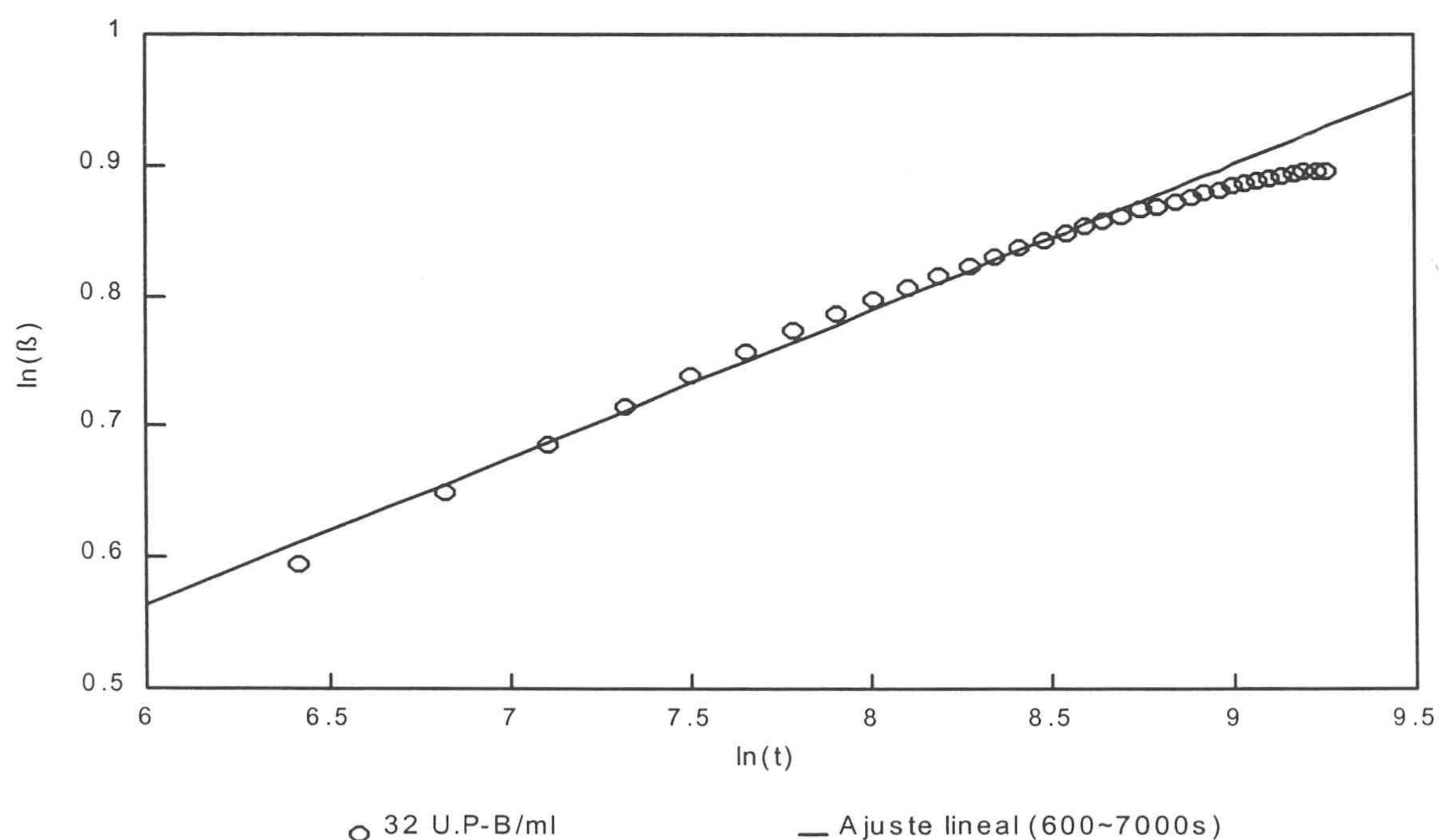


Figura 6.43. Cambio de $\ln(\beta)$ con $\ln(t)$. Agregante IgM (32 U.P-B/ml). RP-130, $5.67 \cdot 10^{10}$ cm⁻³.

Con 256 U.P-B/ml se ha repetido el mismo resultado a nivel de sedimentación que a 32 U.P-B/ml, por lo que se puede concluir que este factor no tiene una incidencia significativa, al menos en este caso, ni en la dimensión fractal ni en la determinación del tamaño de agregado.

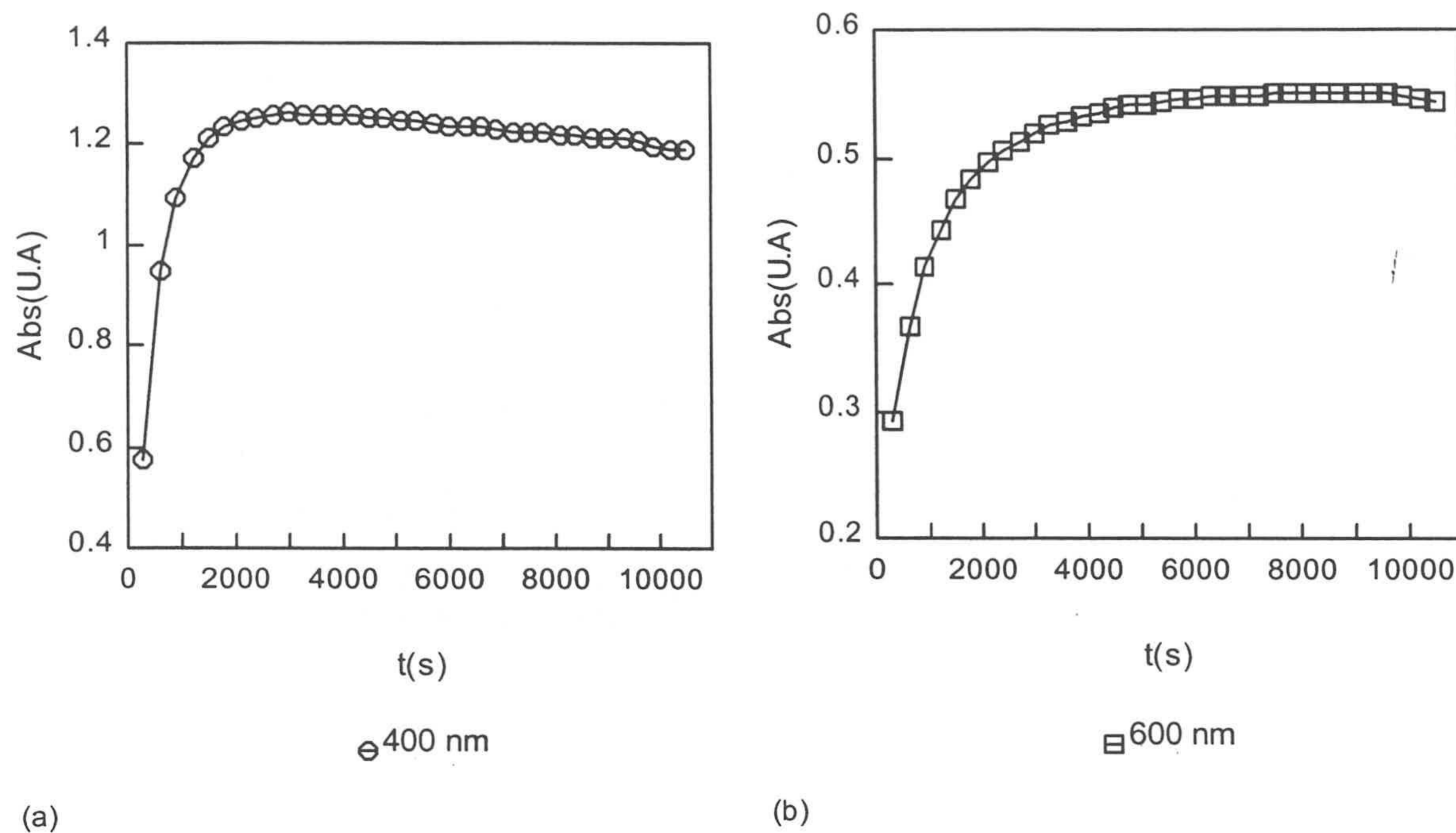


Figura 6.44. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Variación de la absorbancia óptica con el tiempo a dos longitudes de onda, 400 nm (a) y 600 nm (b). Agregante IgM: 32 U.P-B/ml.

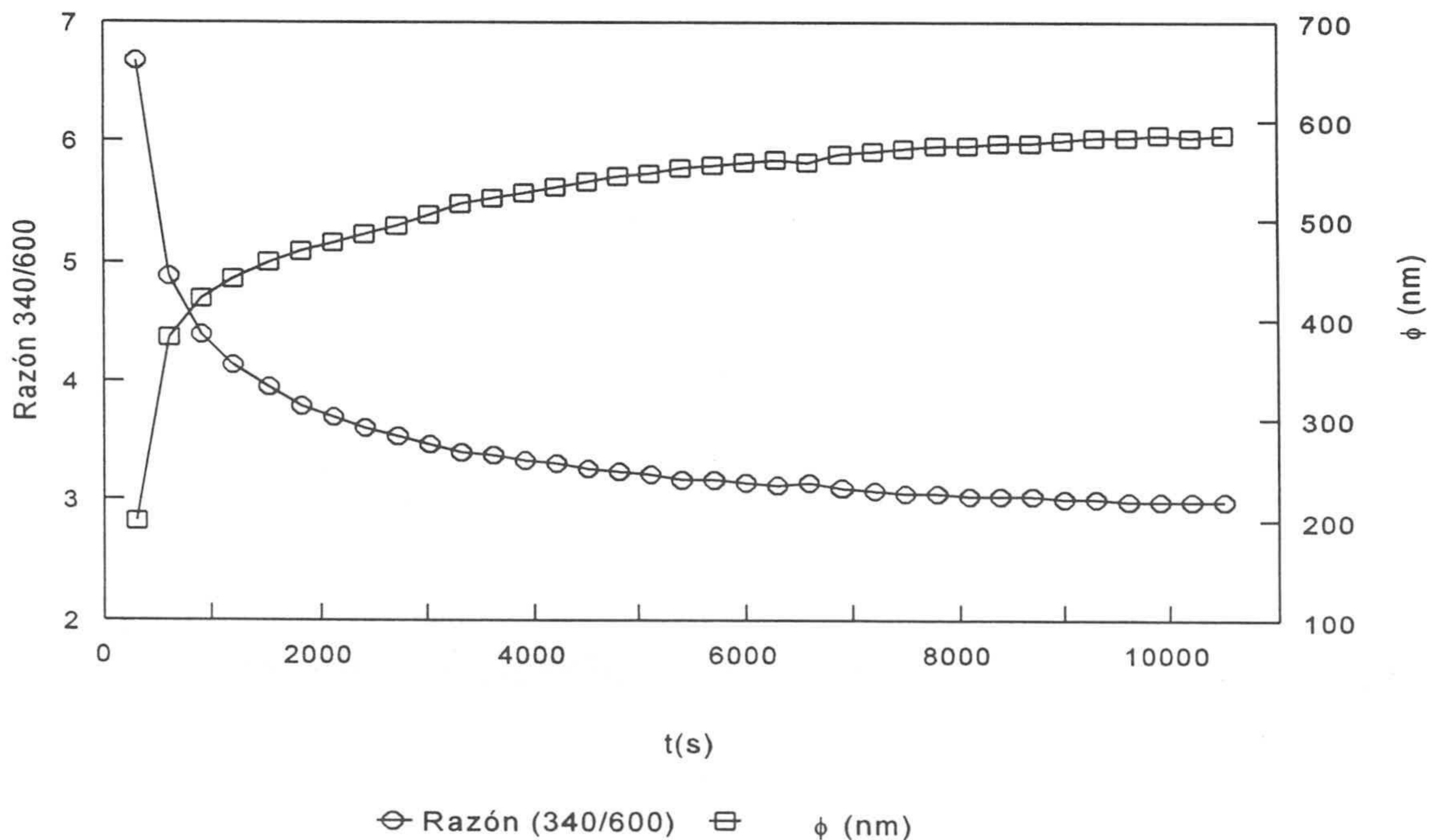


Figura 6.45. Evolución temporal de la razón de absorbancias 340/600 y del diámetro ϕ de agregado. Aglutinante humano: 32 U.P-B/ml. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$.

6.9.3.2 Obtención de la dimensión fractal. Agregante IgG

El agregante de origen animal no es exactamente un suero, sino un semipurificado obtenido a partir de un suero de conejo inoculado con Ag P-B (capítulo 4).

Antes de medir la dimensión fractal con este aglutinante, se han realizado unas pruebas en el Monarch comparando los dos agregantes, en las que se constata las grandes diferencias existentes tanto a nivel de respuesta (figura 6.46) como en la forma de la curva absorbancia-tiempo (figura 6.47). En este experimento el reactivo látex está fabricado a partir del RP-214 ($50 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$) y la concentración de partículas en el medio es de $7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Las medidas se realizaron a una longitud de onda de 570 nm.

Analizando las curvas de R_{max} (figura 6.46) se observa que la respuesta de suero humano es algo mayor en las primeras diluciones, mientras que a partir de 16 U.P-B/ml se invierte la tendencia, hasta llegar a 64 U.P-B/ml, donde vuelve a ser como al principio. La curva de respuesta del agregante IgG entra rápidamente en prozona inhibitoria, por lo que tiene un rango lineal muy corto que llega como máximo a 4 U.P-B/ml, mientras que en el humano está entre 16 y 32 U.P-B/ml.

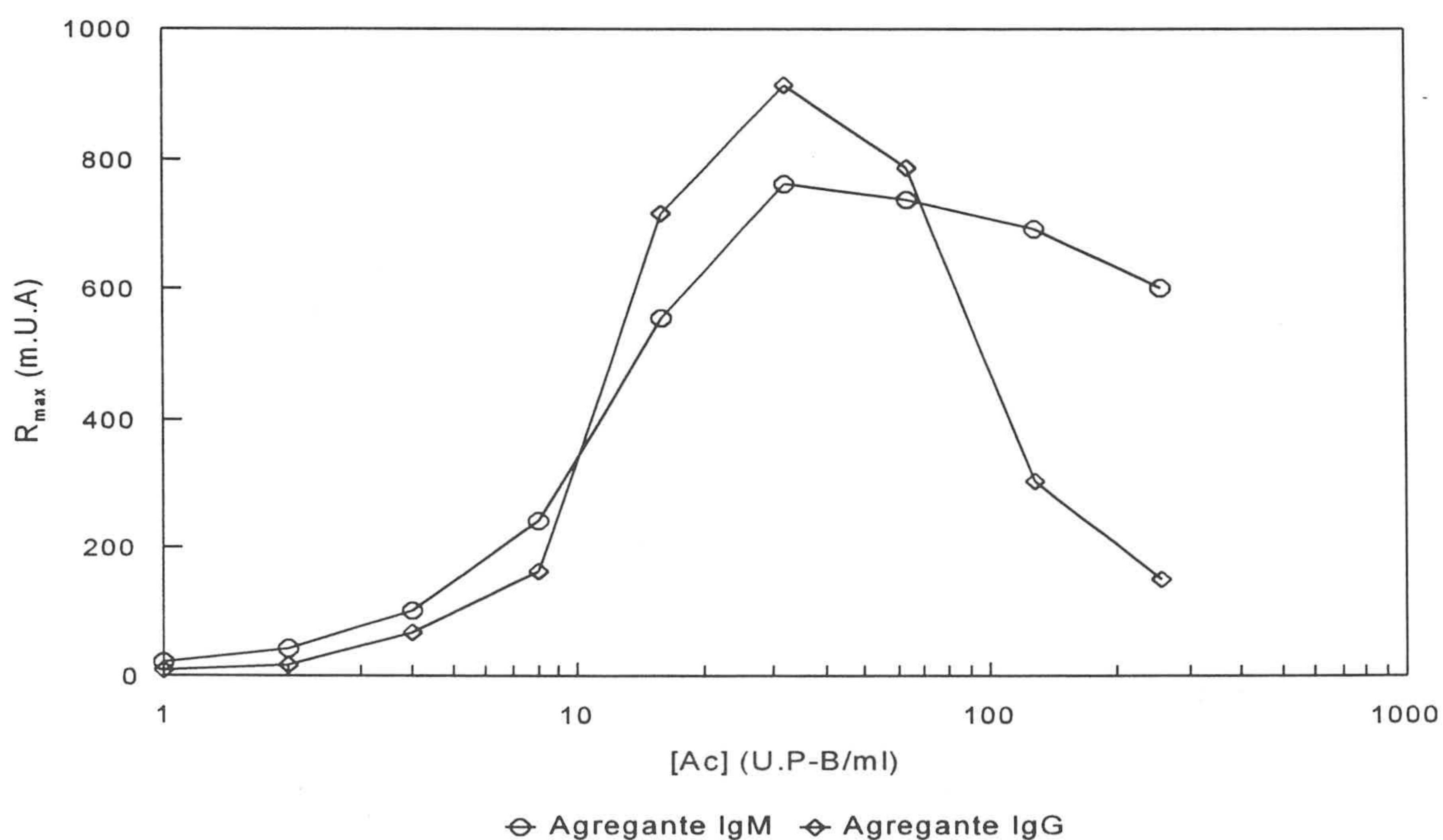


Figura 6.46. Variación de R_{max} con $[\text{Ac}]$ para los agregantes IgM e IgG. Monarch (570 nm). RP-214 ($7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ y $50 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$). Número medio de datos analizados por curva: 176.

La cinética de reacción es también diferente, como se observa en la figura 6.47, donde están representadas las curvas de absorbancia-tiempo de los dos aglutinantes a 32 y 64 U.P-B/ml. La velocidad inicial es mucho menor en el agregante IgG que en el IgM, aunque la respuesta final puede llegar a ser mayor o igual. Esta forma de reaccionar recuerda bastante a la que tiene el SN9.

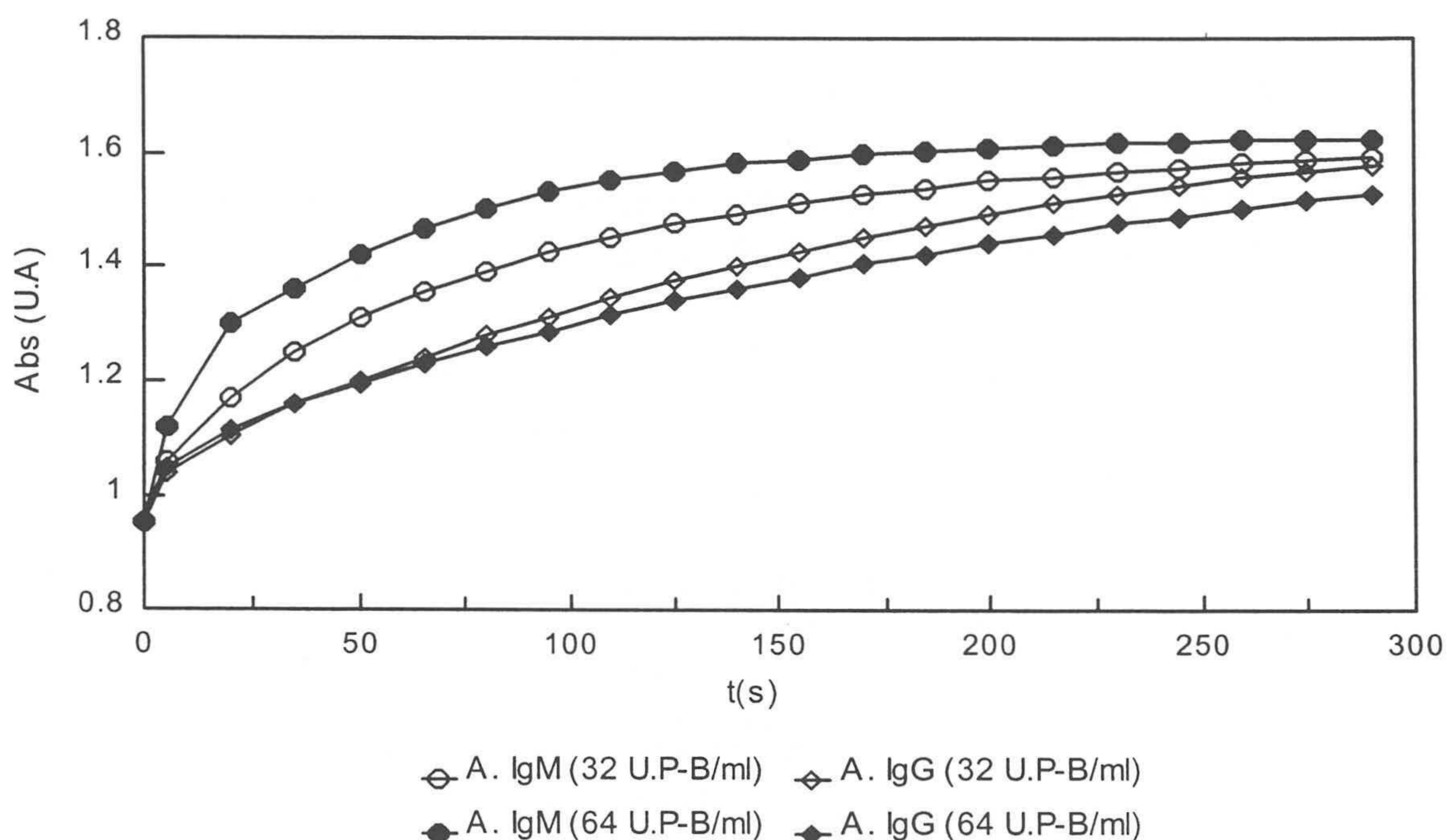


Figura 6.47. Curvas absorbancia-tiempo (32 y 64 U.P-B/ml) de los aglutinantes IgM e IgG. RP-214 ($7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ y $50 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$). Monarch (570 nm).

El comportamiento del aglutinante IgG sería difícil de interpretar, si no se conociese el efecto que puede tener el ión calcio en la respuesta (prozona) de algunos reactivos inmunológicos. El calcio es capaz de cambiar la conformación de las proteínas (101, 102), lo que en consecuencia afectará a la forma que tienen de reaccionar con otras moléculas. Esto podría explicar que las reacciones en el agregante IgG sean más lentas que con el IgM, ya que un cambio estructural puede hacer más "inaccesibles" las regiones de unión activa del antígeno o del anticuerpo. La magnitud y el efecto de la modificación estructural, dependerán de las cantidades de proteína agregante y del calcio presente en el medio de reacción, como se refleja en la curva de R_{max} (figura 6.46). En la zona baja (1-2 U.P-B/ml), la poca concentración de IgG unida a la presencia de calcio, hacen que la reactividad sea prácticamente nula. Al aumentar la cantidad de agregante (4-32 U.P-B/ml), es posible que la respuesta sea suficiente como para compensar el efecto negativo de los iones Ca^{2+} . Superada una determinada concentración (>32 U.P-B/ml), el exceso de aglutinante junto con

el cambio estructural de las proteínas, dan lugar a una R_{\max} mucho menor que el agregante IgM.

El Ca^{2+} es también ión muy caotrópico (serie de Hofmeister del apartado 6.6.3), por lo que su presencia en el medio de reacción puede hacer que las proteínas tengan mayor dificultad a la hora de unirse. Esto podría explicar también las diferencias entre los agregantes.

La presencia de calcio se ha confirmado al añadir EDTA al tampón de reacción. El EDTA es una sustancia quelante, lo que significa que es capaz de “capturar” los iones Ca^{2+} (101, 103, 104) del medio. Sea cual sea el efecto de ión Ca^{2+} , la adición de EDTA al tampón de reacción ha supuesto un gran cambio en el comportamiento del sistema, sobre todo en el aglutinante IgG (figuras 6.48-(b) y 6.49), ya que no se ha detectado variación con el IgM (figura 6.48-(a)). Ahora bien, no debería existir calcio en el agregante IgG, ya que durante el proceso de purificación, primero hay una precipitación con sulfato amónico, donde el calcio del suero se convierte en sulfato cálcico, sustancia poco soluble que precipita y se elimina. A continuación hay dos diálisis frente a agua y después una frente a un tampón fosfato potásico, donde desaparecerían las trazas de calcio que hubiesen quedado. Existe sin embargo la posibilidad de que todavía haya una pequeña cantidad de Ca^{2+} , ya que sólo con 0.45 mM de EDTA en el medio de reacción (figuras 6.48 y 6.49), se produce un cambio significativo tanto en el valor de la respuesta, como en forma de la curva absorbancia-tiempo.

En la figura 6.48 se presentan las curvas de R_{\max} frente a la concentración de anticuerpo, para el aglutinante IgM (a) e IgG (b), con un tampón de reacción sin EDTA (0 mM) y con EDTA (0.45, 0.9 y 1.8 mM). La concentración de EDTA corresponde a cubeta. Con el agregante IgM no existe ninguna variación en función de la cantidad de EDTA (figura 6.48-(a)), mientras que en el caso del IgG se ha podido constatar un cambio tanto en el valor de la respuesta (figura 6.48-(b)), como en la forma de curva absorbancia-tiempo (figura 6.49). El formato log-log de la figura 6.48 facilita la visualización de la zona baja (1-2 U.P-B/ml), aunque existe una pérdida resolución en la parte alta. Sin embargo, se aprecia un descenso en punto de equivalencia en el agregante IgG, que pasa de estar situado alrededor de 32 (sin EDTA) a 16 U.P-B/ml (con EDTA).

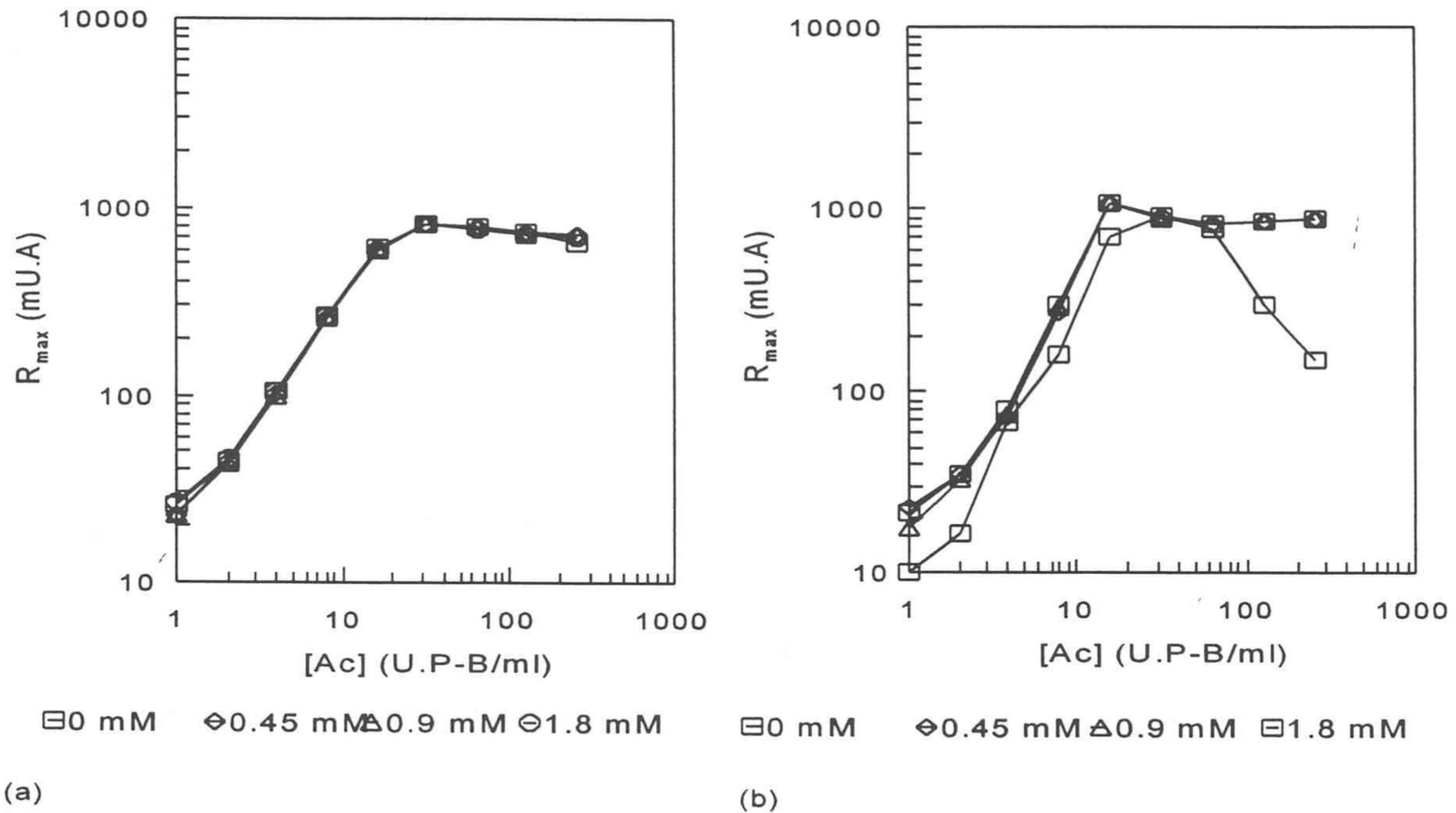


Figura 6.48. Variación de la respuesta dependiendo de la cantidad de EDTA. (a) Aglutinante IgM. (b). Agregante IgG. RP-214 ($7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ y $50 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$). Número medio de datos por curva: 164. Monarch (570 nm).

La presencia de EDTA en el medio de reacción modifica también la cinética del sistema, como se puede ver en la figura 6.49, donde están representadas las curvas absorbancia-tiempo con 64 U.P-B/ml en las distintas condiciones de medida. La forma de la curva del aglutinante IgG se asemeja a la que tiene IgM, pero algo más rápida. Además de 0.45, 0.9 y 1.8 mM se han probado dos concentraciones más, 3.6 y 7.2 mM, siendo los resultados prácticamente iguales.

Que el EDTA no tenga efecto sobre la muestra de origen humano, puede deberse simplemente a que esta no contiene iones Ca^{2+} , ya que ha sido dializada frente a una dilución 1/20 de una solución salina de NaCl 154 mM y 1 g/l de NaN_3 (capítulo 4).

A continuación se verá como afecta la presencia de EDTA a la estructura de los agregados. Para comparar los resultados con los del agregante IgM, se trabajará otra vez con 32 y 256 U.P-B/ml y dos concentraciones de EDTA, 0 y 0.9 mM. Se utilizará de nuevo el Shimadzu UV 2101 PC.

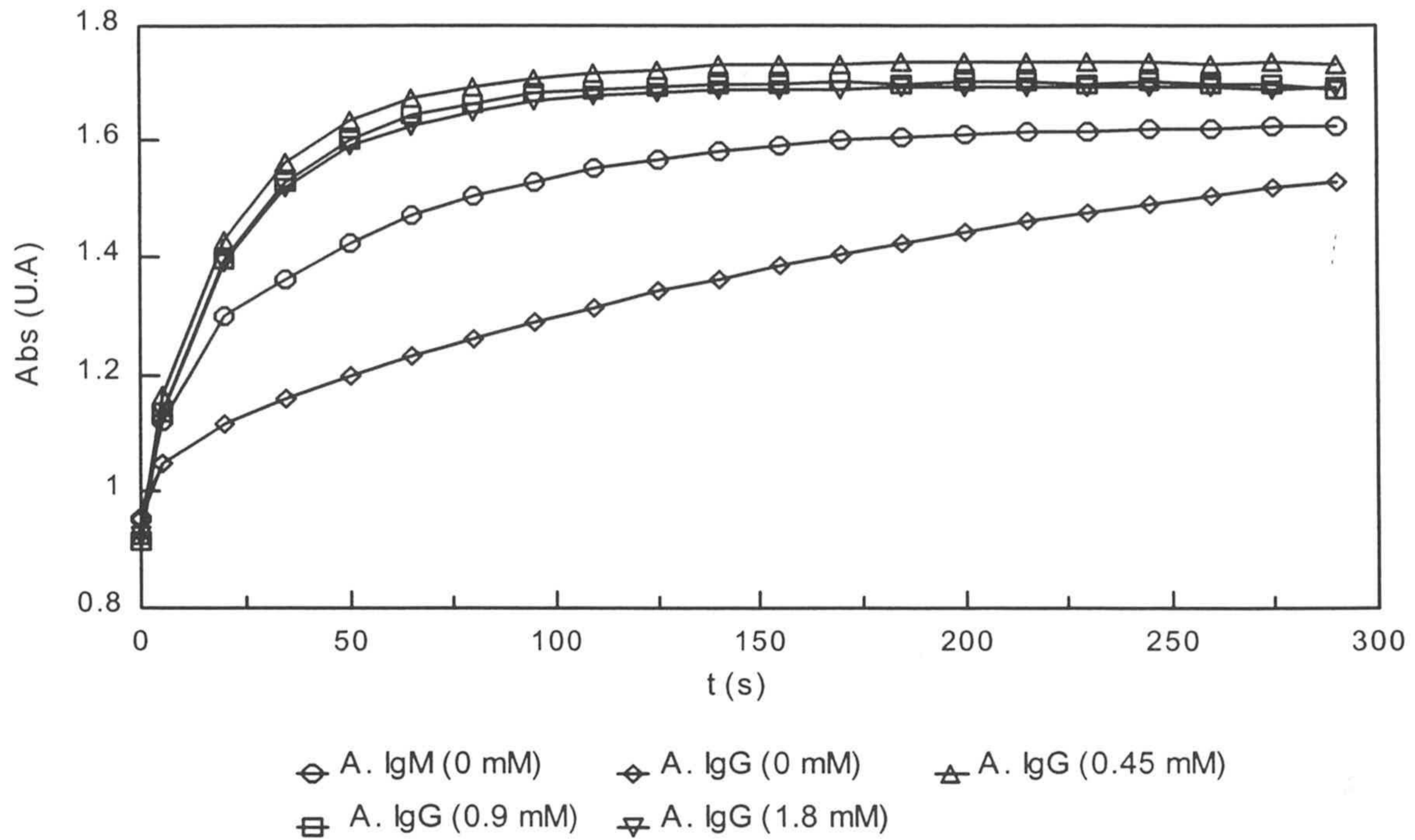


Figura 6.49. Curvas absorbancia-tiempo para el aglutinante IgM (0 mM EDTA) e IgG (0-1.8 mM EDTA). RP-214 ($7.65 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, $50 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ lx}$). Monarch (570 nm). $[\text{Ac}] = 64 \text{ U.P-B/ml}$.

► Medio de reacción sin EDTA.

En este caso, como se verá, no hay casi aglutinación a 256 U.P-B/ml, con lo que se repite el resultado obtenido en el experimento del Monarch. Al igual que antes, la evolución temporal tanto de la absorbancia (figura 6.50) como del parámetro β (figura 6.52) es diferente a la que tiene el aglutinante IgM.

En la figura 6.50 se presentan las curvas absorbancia-tiempo del agregante IgM e IgG, para 32 U.P-B/ml y 0 mM de EDTA en el medio de reacción. Comparando ambas curvas, se observa que la agregación en el agregante IgG es más lenta, aunque llega a unos valores de absorbancia mucho mayores. Esto se corresponde con lo que sucedía en las figura 6.46, 6.47 y 6.49. Por ejemplo en la 6.46, la R_{max} del aglutinante IgG con 32 U.P-B/ml es de 917 mU.A, mientras que en el IgM es de 761 mU.A a esa misma concentración.

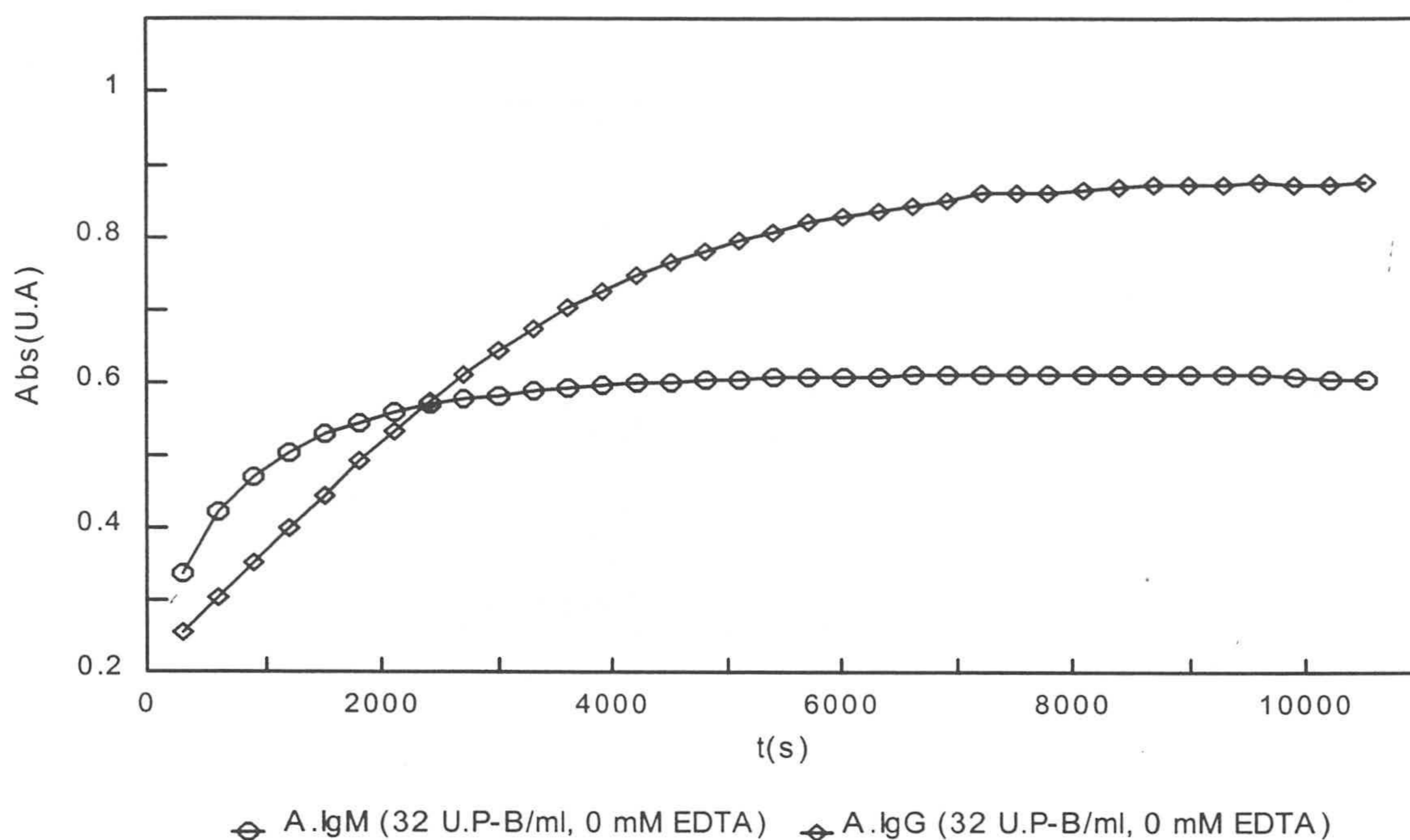


Figura 6.50. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Curvas absorbancia-tiempo a una longitud de onda de 600 nm del aglutinante IgM e IgG. $[\text{Ac}] = 32 \text{ U.P-B/ml}$. 0 mM de EDTA en el medio de reacción.

La sedimentación tiene un efecto similar al del experimento con el aglutinante de origen humano. Es de un 7% como máximo sobre el valor de la absorbancia a 340 nm, lo que supone una variación de unos 30 nm en la determinación del tamaño de agregado. El diámetro medio final es de 620 nm aproximadamente, valor que es algo superior al del agregante IgM, como se puede ver en la figura 6.51, donde están representadas la evolución temporal de la razón 340/600 y del tamaño de agregado. El valor de la velocidad de sedimentación es prácticamente igual al que se obtuvo con el aglutinante IgM.

Parece también que los agregados adquieren una estructura algo más compacta con el aglutinante IgG que con el IgM, como se observa en la figura 6.52, donde se compara la variación del parámetro β con el tiempo para los dos agregantes. El valor asintótico de β es en este caso de 2.62 ± 0.02 . Las diferencias en la cinética absorbancia-tiempo dan lugar a un cambio temporal de β y un valor final de d_f totalmente diferentes. Las dimensiones de la IgG y su capacidad de aglutinación podrían ser las responsables del cambio en la conformación de los agregados. Por un lado los complejos $[\text{x-Ag P-B}] - \text{Ac P-B}$ son de menor tamaño, y por otro la presencia de los iones Ca^{2+} hace que la IgG sea menos aglutinante, de manera que los complejos dispondrán de más tiempo para unirse y acomodarse unos con otros. Además de las diferencias en la compactidad de los agregados, la figura 6.52 indica también que el valor asintótico de β se alcanza a un tiempo de reacción mayor que en el aglutinante humano.

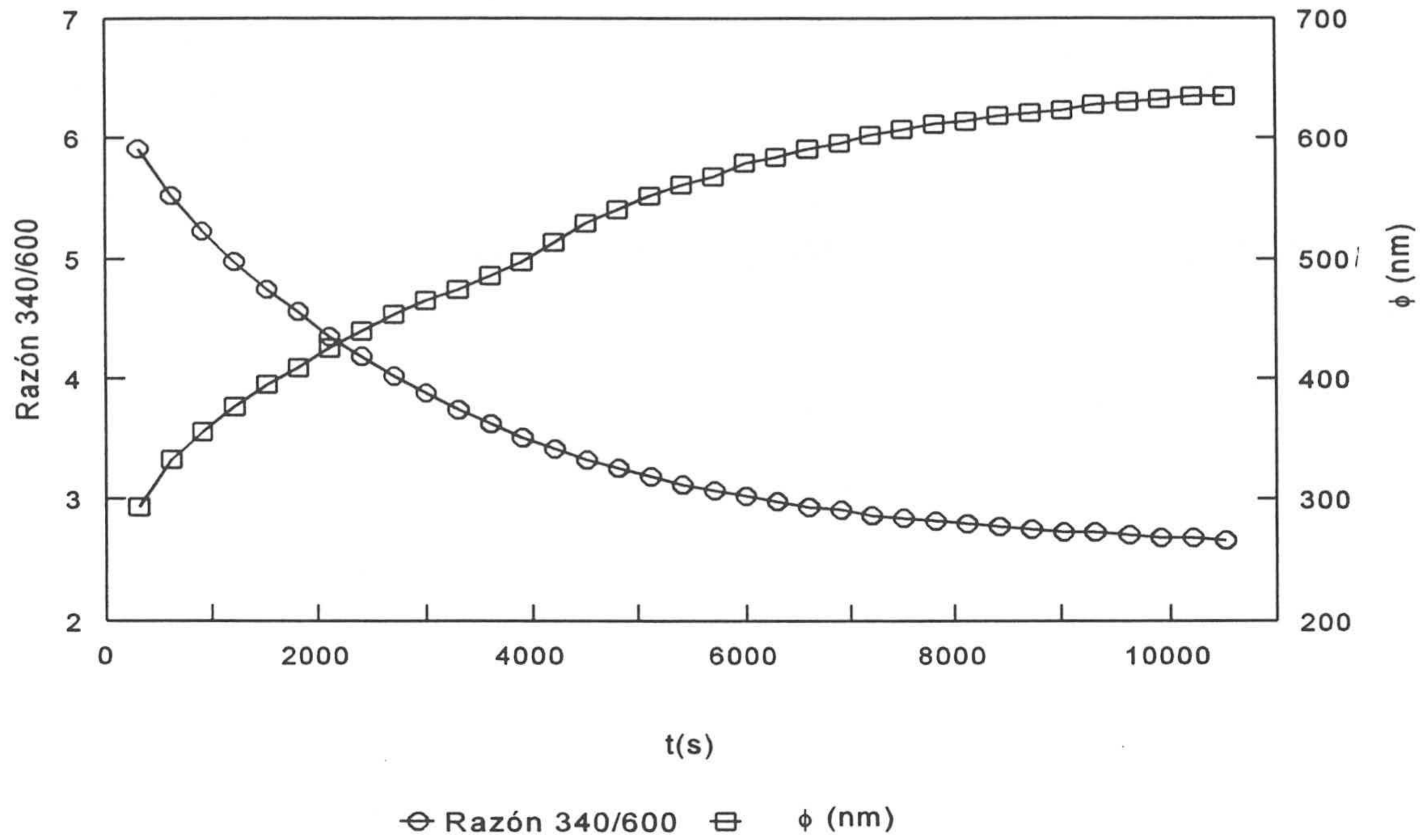


Figura 6.51. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Evolución temporal de la Razón 340/600 y del diámetro ϕ (nm) de agregado. A.IgG: 32 U.P-B/ml. 0 mM de EDTA en el medio de reacción.

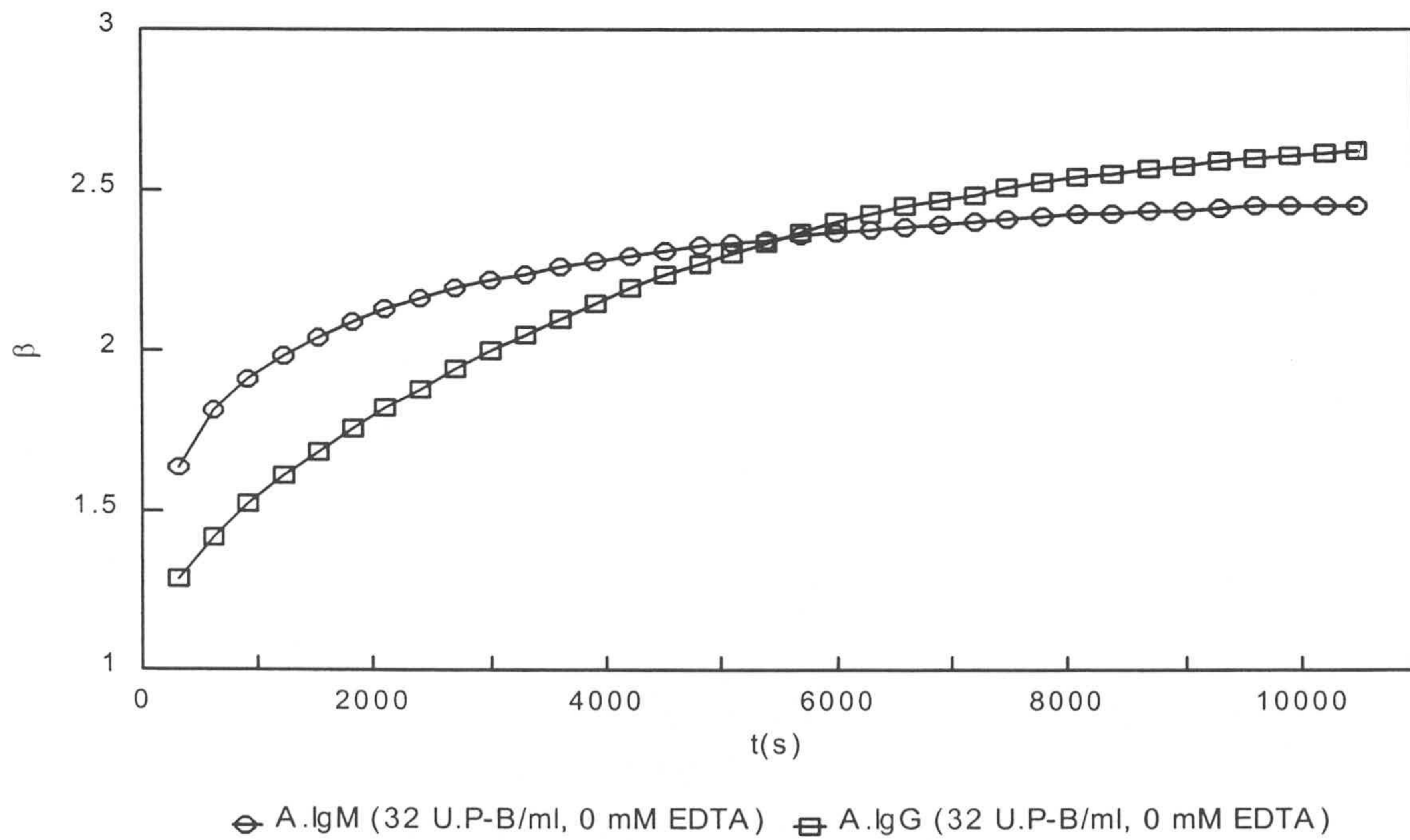


Figura 6.52. Cambio de β con el tiempo (10510s \approx 3h) para los dos aglutinantes. Medio de reacción: 32 U.P-B/ml, 0 mM de EDTA. Partícula RP-130 ($34 \mu\text{g Ag/m}^2 \text{ Ix}$, $5.6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$).

Para comprobar que el tiempo de medida es suficiente para que β alcance su valor asintótico, se utilizará de nuevo la representación gráfica del $\ln(\beta)$ en función de $\ln(t)$. En la figura 6.53 está representada la curva $\ln(\beta)-\ln(t)$, donde se observa que el tiempo es más que suficiente para que β llegue a su asíntota. La recta de ajuste está calculada entre 600 y 8100 segundos aproximadamente y tiene un coeficiente de regresión de 0.999. Tal y como se comentó anteriormente, la figura 6.53 indica que el sistema tarda más tiempo en alcanzar su comportamiento fractal que el agregante IgM (figura 6.43), lo que se corresponde con las diferencias encontradas a nivel cinético.

► Medio de reacción con EDTA.

Los resultados son bastante similares a los del experimento del Monarch. En este caso sí que existe respuesta a 256 U.P-B/ml, y la cinética de aglutinación es muy diferente a la que se obtenía sin EDTA, pero parecida a la del agregante IgM. En la figura 6.54 se observa que la curva absorbancia-tiempo del agregante IgG (32 U.P-B/ml, 0.9 mM EDTA) tiene la misma forma que la del humano, lo que da lugar a una estructura fractal muy parecida (figura 6.55).

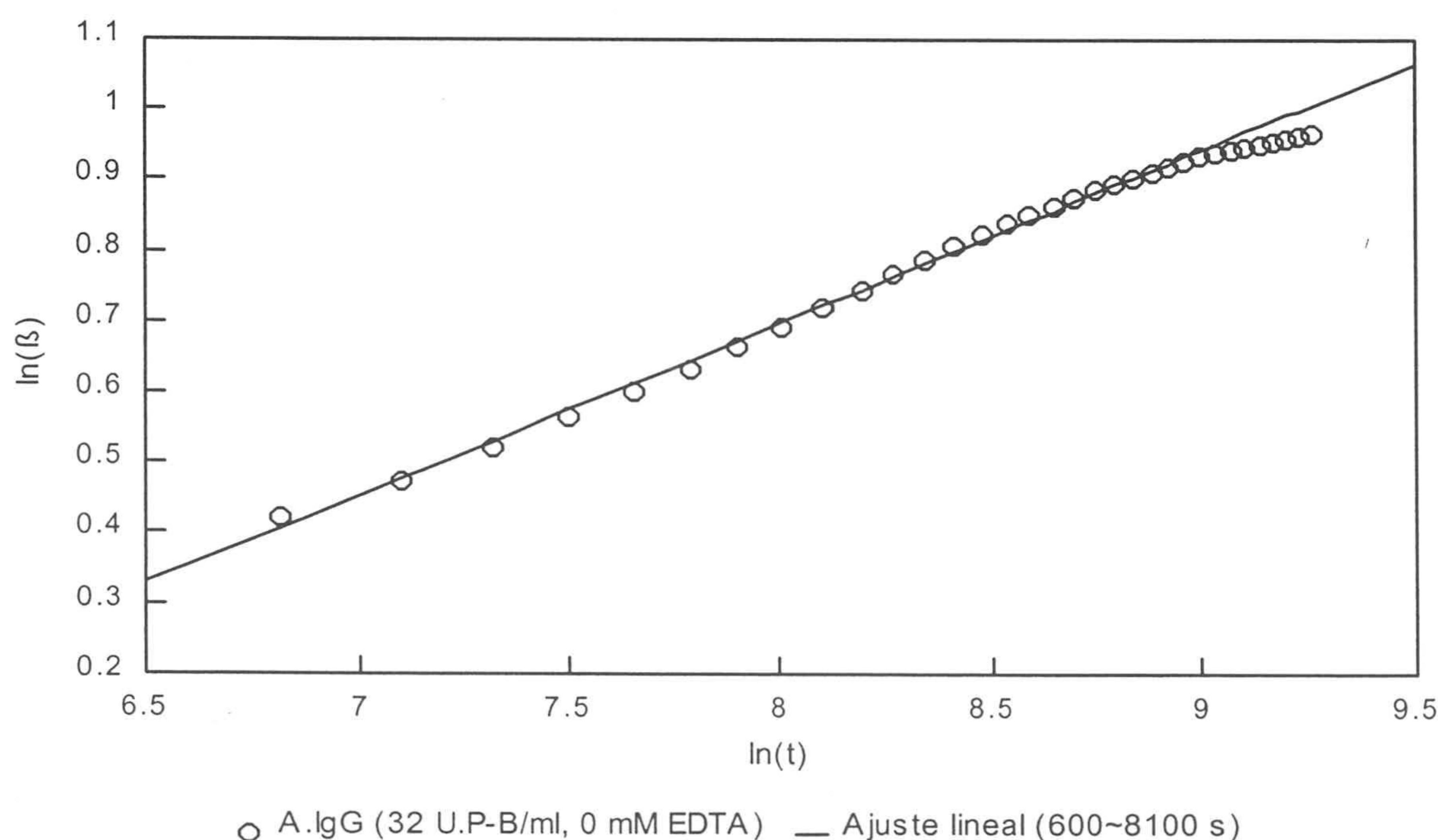


Figura 6.53. Cambio de $\ln(\beta)$ con $\ln(t)$. Agregante IgG (32 U.P-B/ml, 0 mM EDTA). Partícula RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$.

La presencia de EDTA en el medio de reacción modifica el comportamiento de las proteínas, de forma que el agregante IgG termina dando la misma reactividad que el IgM. Aunque no se sepa con certeza cuál es el efecto real del calcio, parece que los iones Ca^{2+} pueden modificar la estructura del Ag P-B y por tanto su capacidad de aglutinación, como se vio en el experimento con el SN9. En ese caso la carga de la partícula parecía ser la responsable del cambio conformacional del Ag P-B. El EDTA, al “eliminar” el calcio del medio, permite que la reacción Ag P-B-IgG de lugar a unos agregados similares a los que se consiguen con la IgM.

Los resultados, tanto a nivel de tamaño de agregado y sedimentación son equivalentes a los que se obtuvieron con el aglutinante IgM. El parecido entre ambos sistemas se confirma en la figura 6.55, donde está representada la evolución temporal de β para el agregante IgG y dos concentraciones diferentes de Ac P-B, 32 y 256 U-P-B/ml. El valor asintótico de β es de 2.51 ± 0.01 y 2.48 ± 0.01 con 32 y 256 U.P-B/ml respectivamente.

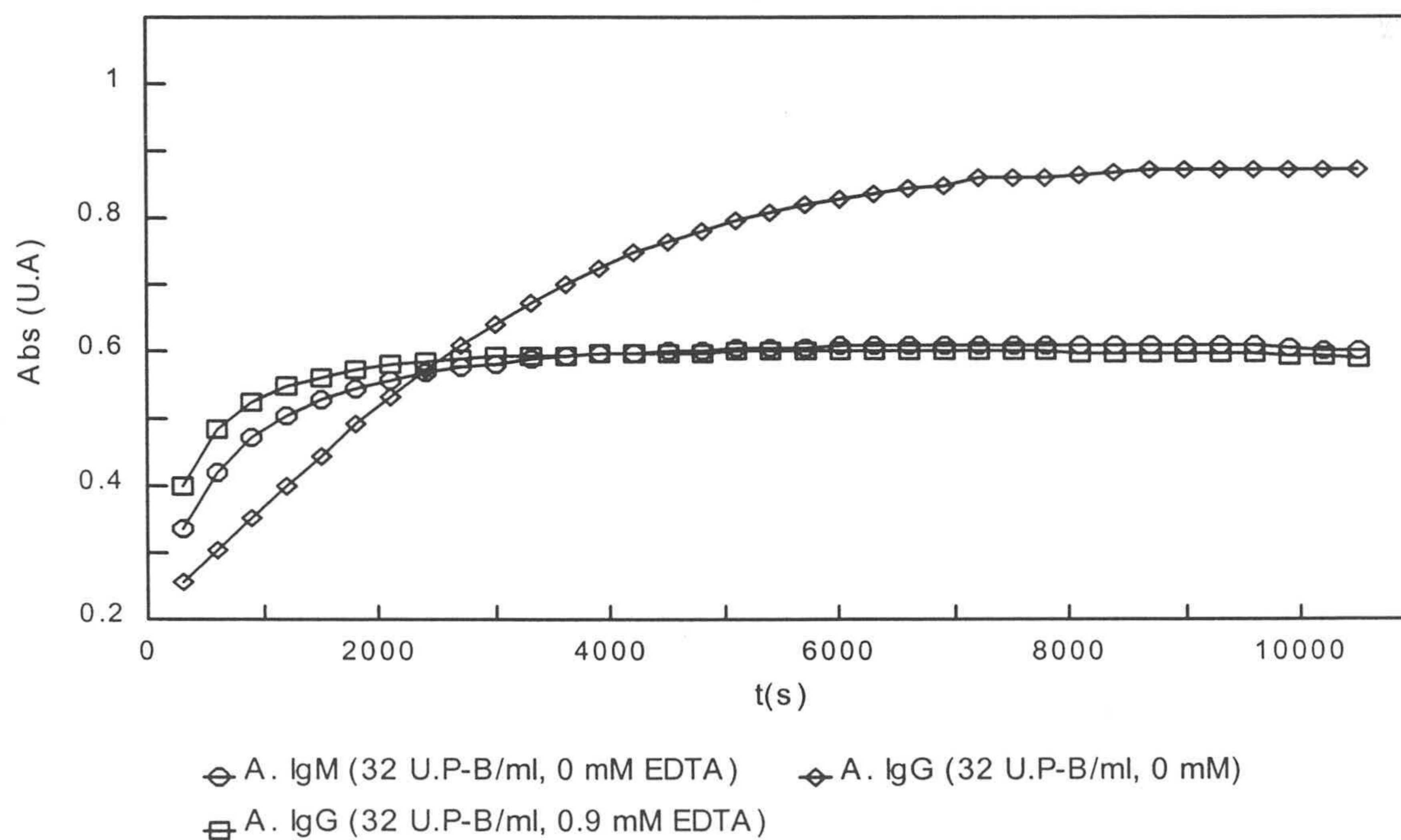


Figura 6.54. RP-130, $5.67 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Curvas absorbancia-tiempo ($[Ac]=32 \text{ U.P-B/ml}$) del aglutinante IgM(0 mM EDTA) e IgG (0 y 0.9 mM).

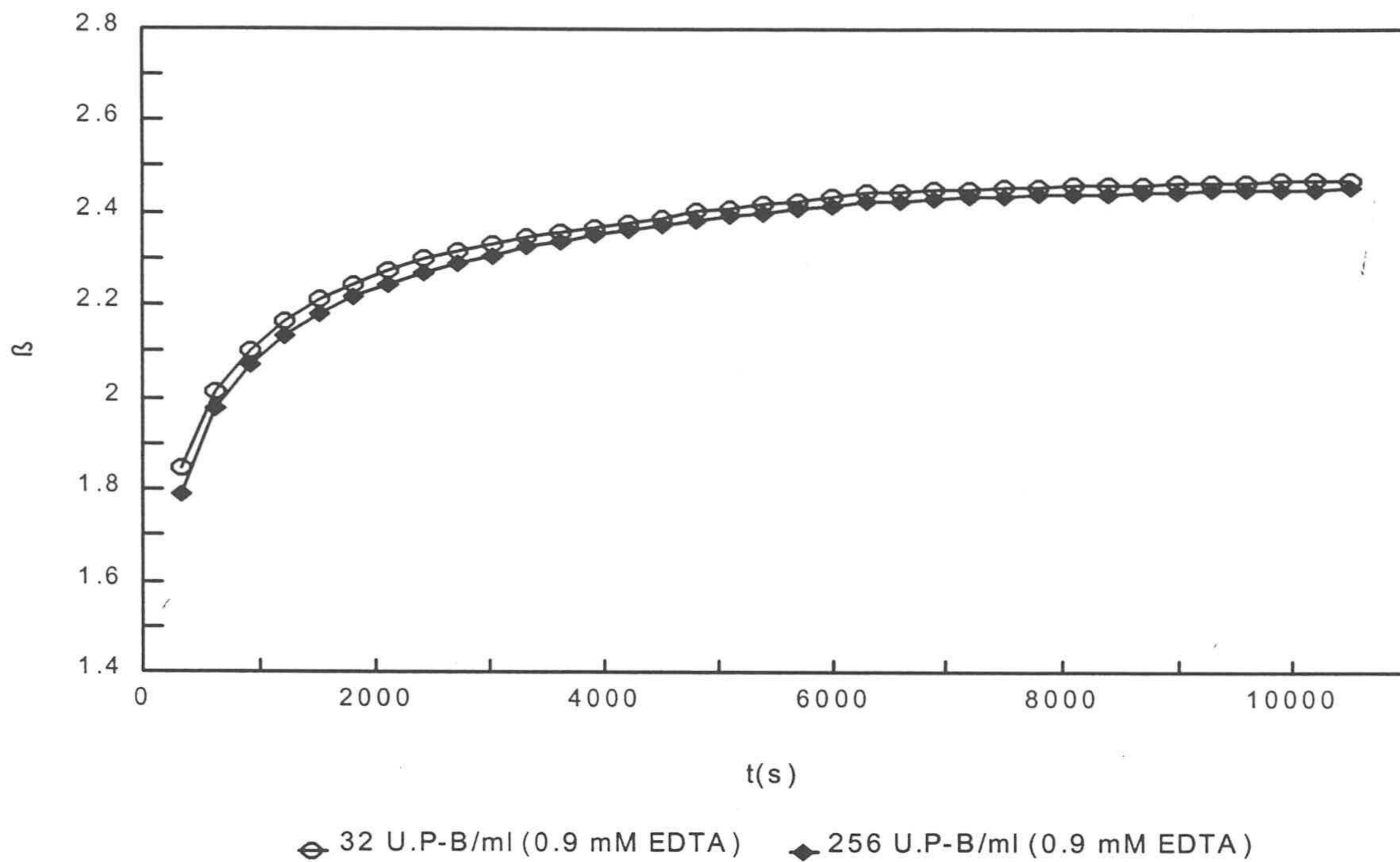


Figura 6.55. Variación de β en función del tiempo ($10510s \approx 3h$) para dos concentraciones de aglutinante, 32 y 256 U.P-B/ml (agregante IgG). RP-130, $5.6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$, 0.9 mM EDTA.

En la figura 6.56 se comparan las curvas de $\xi(t)$ para los tres casos analizados, aglutinante IgM (gráfica (a)), IgG sin EDTA e IgG con EDTA (gráfica (b)) para 32 U.P-B/ml. La dependencia de $\xi(t)$ con el tiempo es potencial ($y=px^b$), y por tanto sigue la expresión [3.44]-(a). En la tabla 6.23 se presentan los parámetros p y b del ajuste y el coeficiente de correlación del mismo. La curva de ajuste está calculada entre 600 y 10500 segundos. Vease que el parámetro p corresponde al radio inicial de monómero R y b al cociente $1/d_r(1-\lambda)$. En la figura 6.56 y en la tabla 6.23 se observa que el mejor ajuste es el del aglutinante IgG sin EDTA, que es el que alcanza más tarde el valor asintótico de β (figura 6.53) y de ξ (figura 6.51). En todos los casos el valor del parámetro de homogeneidad de van Dogen y Ernst λ es negativo, lo que indica que la aglutinación se produce por la unión de pequeños agregados. Tal y como se ha comentado anteriormente, este resultado es posible en el caso de un inmuno-ensayo de soporte coloidal, ya que la unión entre las partículas se debe a la presencia de dos proteínas (Ag y Ac P-B), de manera que su enlace puede cambiar la conformación de las moléculas, sobre todo del anticuerpo (105). Aquellas partículas o agregados con anticuerpos en su superficie, tendrán mayores dificultades a la hora de aglutinar, a lo que hay que unir la difusión traslacional y rotacional necesarias.

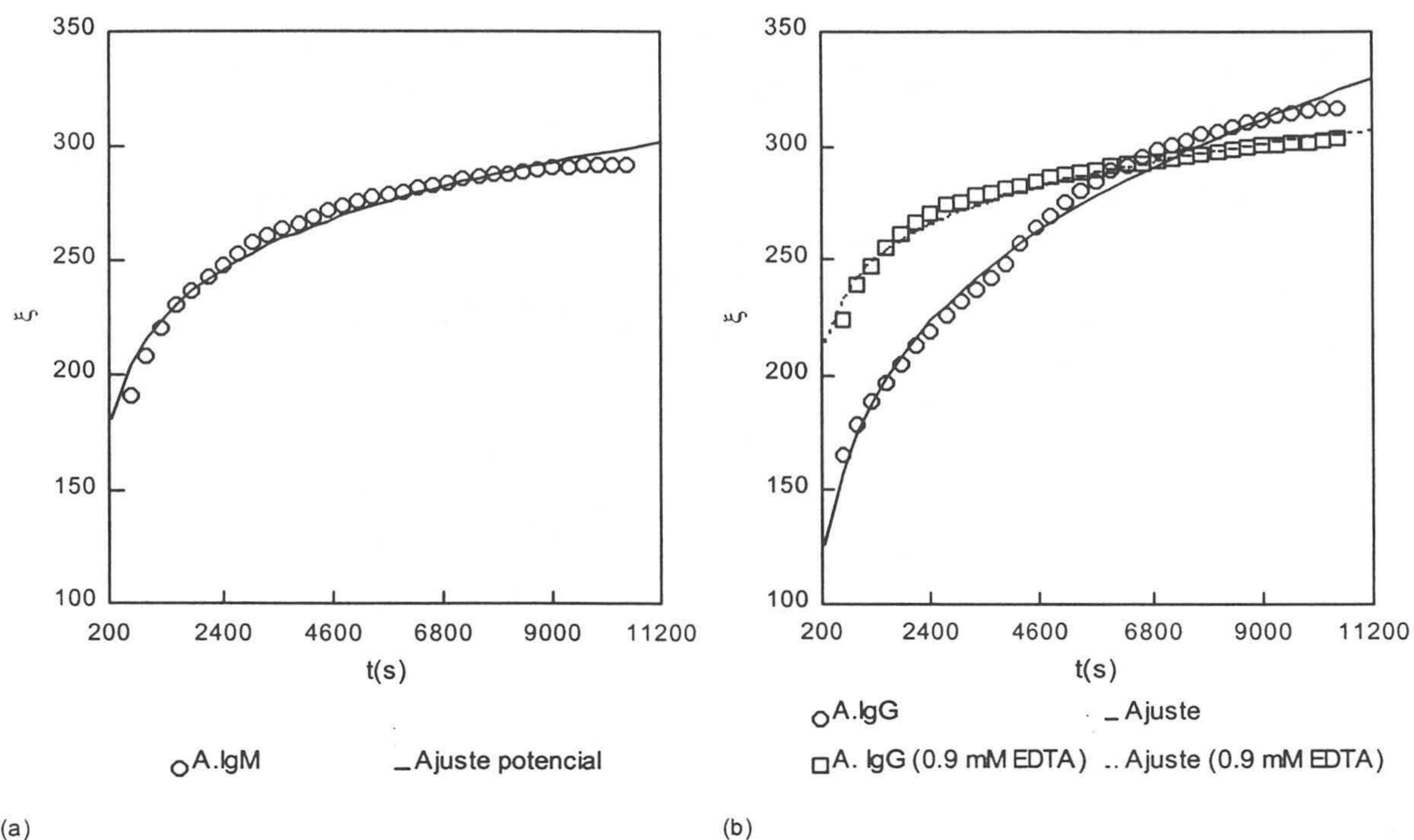


Figura 6.56. Evolución de ξ (razón 340/600) en función de t para los dos aglutinantes, IgM e IgG (con y sin EDTA), junto con sus ajustes potenciales (600~10500 s). La concentración de aglutinante es de 32 U.P-B/ml. RP-130 ($3.26 \cdot 10^0 \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$).

| Aglutinante | p | b | r |
|-------------|-------|-------------|-------|
| IgM | 86±3 | 0.135±0.004 | 0.987 |
| IgG | 31±1 | 0.250±0.050 | 0.995 |
| IgG (EDTA) | 128±3 | 0.094±0.003 | 0.988 |

Tabla 6.23. Ajuste potencial (600~10500 s) de $\xi(t)$ (razón 340/600) para el aglutinante IgM e IgG (con y sin EDTA). Parámetros p, b, coeficiente de correlación lineal r, $\xi(10500 \text{ s})$. RP-130 ($3.26 \cdot 10^0 \text{ cm}^{-3}$, $34 \mu\text{g Ag/m}^2\text{Ix}$). [Ac]= 32 U.P-B/ml.

El valor negativo de λ no se ha confirmado con otra técnica, como puede ser la espectroscopía de fotocorrelación, ya que en el PCS sólo se disponen de medidas de tamaño (resultados no presentados) hasta un 15 minutos aproximadamente (15~900 s), tiempo insuficiente como para determinar el comportamiento de la curva $\xi(t)$.

Finalmente, se puede concluir que el método turbidimétrico permite calcular la

dimensión fractal y de esta manera diferenciar los tipos de proteína que pueden aglutinar a los complejos Ix-Ag P-B. Se ha comprobado que las estructuras obtenidas son bastante compactas, además del comportamiento potencial de las curvas $\xi(t)$. También se ha podido constatar el efecto del ión calcio sobre la reactividad y la morfología de los agregados. Sin embargo quedan pendientes una serie de experimentos, como el cambio del diámetro de partícula, el número inicial de monómeros o el recubrimiento, que servirían para definir el efecto de estas variables sobre la estructura de los agregados y el tiempo que estos tardan en adquirir un comportamiento fractal.

6.10 Bibliografía

- (1) Okubo, M; Yamamoto, Y; Uno, M; Kamei, S; Matsumoto. Immunoactivity of polymer microspheres with their hydrophilic/hydrophobic heterogeneous surface sensitized with antibody. *Colloid & Polymer Science*; 265, 1061, (1987).
- (2) Tilton, R. D; Robertson, C. R; Gast, A. P. Manipulation of Hydrophobic Interactions in Protein Adsorption. *Langmuir*, 7, 2710, (1991).
- (3) Elgersma, A. Tesis Doctoral, Universidad Agrícola de Wageningen (Holanda), (1989).
- (4) Martin, A; Puig, J; Galisteo, F. Serra, J; Hidalgo-Alvarez, R. On Some Aspects of the Adsorption of Immunoglobulin-G Molecules on Polystyrene Microspheres. *J. Dispersion Sci. Tec.* 13 (4), 399, (1992).
- (5) Norde, W. Adsorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces. *Cells and Materials*, 5, 97, (1995).
- (6) Andrade, J. D; Hlady, V; Wei, A-P; Ho, C-H; Lea, A. S; Jeon S. I; Lin, Y.S; Stroup, E. Proteins at Interfaces: Principles, Multivariate Aspects, Protein Resistant Surfaces, and Direct Imaging and Manipulation of Adsorbed Proteins. *Clin. Materials* 11, 67, (1992).
- (7) Hidalgo-Álvarez, R; Galisteo-Gonzalez, F. The Adsorption Characteristics of Immunoglobulins. *Heterogeneous Chem. Rev.* 2, 249, (1995).
- (8) Lu, D. R; Lee, S. J; Park, K. Calculation of solvation interactions energies for protein adsorption on polymer surfaces. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 3, 127, (1991).
- (9) Elgersma, A. V; Zsom, R. L. J; Norde, W; Lyklema, J. The adsorption of different types of monoclonal immunoglobulin on positively and negatively charged polystyrene latices. *Colloids Surf.*, 54, 89, (1991).
- (10) Shirahama, H; Suzuki, K; Suzawa, T. Bovine hemoglobin Adsorption onto Polymer Latices. *J. Colloids Interface Sci*; 129, 483, (1988).
- (11) Bale, M. D; Mosher, D. F; Wolfarht, L; Sutton, R. C. Competitive adsorption of fibrectin,

fibrinogen, immunoglobulin, albumin and bulk plasma proteins on polystyrene particles. *J. Colloids Interface Sci*; 125, (1988).

(12) Arai, T; Norde, W. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solution. *Colloids Surf*; 51, 1, (1990).

(13) Arai, T; Norde, W. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 2. Secuencial and competitive adsorption. *Colloids Surf*; 51, 17, (1990).

(14) Galisteo-Gonzalez, F; Puig, J; Martín-Rodríguez; Serra-Domenech, J; Hidalgo-Alvarez, R. Influence of electrostatic forces on IgG adsorption onto polystyrene beads. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2, 435, (1994).

(15) Hwan Lee, Sang; Ruckenstein, Eli. Adsorption of proteins onto polymeric surfaces of different hydrophilicities. A case study with bovine serum albumin. *J. Colloid Interface Sci*; 125, 365, (1988).

(16) Buijs, J; White, D. D; Norde, W. Adsorption of monoclonal IgGs and their F(ab)₂ fragments onto polymeric surfaces. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 5, 11, (1995).

(17) Horbett, T. A; Brash, J. L. Proteins at interfaces: Currents Issues and Future Prospects. In: *Proteins at interfaces*. (Eds:), 1, (1987). American Chemical Society.

(18) Scopes, R. K. Separation by Precipitation. In: *Protein purification. Principles and Practice*. (Eds: Cantor, C. R), 38 (1992). Springer-Verlag New York Inc.

(19) Dulm Van P; Norde, W. The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects. *J. Colloid Interface Sci*; 91, 248, (1982).

(20) Puig, J; Fernández-Barbero, A; Bastos-González, D; Serra-Domenech, J; Hidalgo-Álvarez, R. Sequential IgG and BSA adsorption on homodisperse polystyrene latex. *Surface Properties of Biomaterials*, 39, (1994).

(21) Lundström, I; Elwing, Hans. Simple Kinetic Models for Protein Reactions on Solid Surfaces. *J. Colloid Interface Sci*; 136, 68, (1989).

(22) Lee, S. H; Ruckenstein, Eli. Adsorption of Proteins onto Polymeric Surfaces of Different

Hydrophilicities. A case Study with Bovine Serum Albumin. *J. Colloid Interface Sci*, 1125, 365, (1987).

(23) Elgersma, A. V; Zsom, R. L. J; Norde, W; Lyklema, J. The adsorption of different types of monoclonal immunoglobulin on positively and negatively charged polystyrene latices. *Colloids Surf.*, 54, 89, (1991).

(24) Skoog, D. A; West, D. N. En: *Fundamentos de Química Analítica*. Editorial Reverté, 125, (1970).

(25) Bale, M; Danielson, S; Daiss, J; Goppert, K; Sutton, R. Influence of copolymer composition on protein adsorption and structural rearrangements at the polymer surface. *J. Colloid Interface Sci*. 132, 176, (1989).

(26) Kondo, A; Oku, S; Higashitani, K. Adsorption of γ -Globulin, a Model Protein for Antibody, on Colloid Particles. *Biotech&Bioeng*; 37, 537, (1990).

(27) Peula Garcia, J. M. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, (1995).

(28) Van Oss, C.J; Absolom, D. R. Nature and Thermodynamics of the antigen-antibody Interactions. *Mol. Immunol*; 337, (1987).

(29) Peula, J. M; Hidalgo-Alvarez, R; De las Nieves, F.J. Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: I. Sequential and competitive coadsorption isotherms. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 7, 231 (1995); Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: II. Sequential and competitive coadsorption isotherms. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 7, 241 (1995).

(30) Price, P. Newman, D. Precipitation and Agglutination Methods. In: *Methods of Immunological Analysis*. (Eds: Albert, H.W), 134, (1993). VCH press. Weinheim (Germany).

(31) Hasemann, C.A; Capra, J.D. Immunoglobulins: Structure and Function. In: *Fundamental Immunology*. (Eds: Paul, W.E). 209, (1989). Raven Press Ltd. New York.

(32) Waldmann-Meyer, H; Knippel, E. A Surface Charge Density Model for Structure and Orientation of Polymer-Bound Proteins. *J. Colloid Interface Sci*. 142, 508, (1992).

- (33) Dalgleish, D. G. The conformations of proteins on solid/water interfaces-caseins and phosvitin on polystyrene latices. *Colloids and Surfaces*, 46, (1990).
- (34) Spitznagel, T. M; Clark, D. S. Surface-Density and Orientation Effects on Immobilized Antibodies and Antibody Fragments. *Biotech.* 11, 825, (1993).
- (35) Norde, W; Zoungrana, T. Surface-induced changes in the structure and activity of enzymes physically immobilized at solid/liquid interfaces. *Biotechnol. Appl. Biochem*; 28, 133, (1998).
- (36) Caessens, P. W. J. R; De Jongh, H. H. J; Norde, W; Gruppen, H. The adsorption-induced secondary structure of β -casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochim. Biophys. Acta*; 1430, 73, (1999).
- (37) Kondo, A; Kawano, T; Fumio, I; Higashitani, K. Immunological agglutination kinetics of latex particles with physically adsorbed antigens. *J. Immunol. Meth*; 135, 111, (1990).
- (38) Kondo, A; Uchimura, S; Higashitani, K. Immunological Agglutination Behaviour of Latex Particles with Covalently Immobilized Antibodies. *J. Ferment. Bioeng*; 2, 164, (1994).
- (39) Newman, D. J; Henneberry, H; Price, P. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann. Clin. Biochem*, 29,22, (1992).
- (40) Absolom, D. R; Van Oss, C.J. The nature of the antigen-antibody bond. Factors affecting its association and dissociation. *CRC.Critical Rev.Immuno*; 6, 1, (1986).
- (41) Jefferis, R; Deverill, I. The antigen antibody reaction. In: *Principles and Practice of Immunoassay*. (Eds Price,C., Newman,D); 96-153, Stokton Press. New york, (1991).
- (42) Molina-Bolivar, J. A. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, (1999).
- (43) Gouy, G. J. *Physique*, 9, 457, (1910); *Ann Phys*, 7, 129, (1917).
- (44) Chapman, D. L. *Ph. Mag*; 25, 475, (1913)
- (45) Debye, P; Hückel, E. *Physik. Z*; 24, 185, (1923).

- (46) Stern, O. Z. *Electrochem*; 30, 508, (1924)
- (47) Hamaker, H. C. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica*; 4, 1058, (1937).
- (48) Lyklema, J. Principles of the stability of lyophobic colloids dispersions in non-aqueous media. *Advan. Colloid. Interface. Sci*; 2, 67, (1968).
- (49) Napper, D. H. Colloid stability. *Ind. Eng. Chem. Res. Develop*, 9, 467, 8, (1970); Flocculation studies of sterically stabilized dispersions. *J. Colloid Interface Sci.* 32, 106, (1969).
- (50) Vincent, B. The effect of adsorbed polymers on dispersion stability. *Advan. Colloid. Interface. Sci*; 4, 193, (1974).
- (51) Ortega-Vinuesa, J. L; Martin-Rodriguez, A; Hidalgo-Alvarez, R. Colloidal stability of polymer colloids properties: mechanisms. *J. Colloid Interface Sci.* 184, 259, (1996).
- (52) Napper, D. H; Netscahey, A. Studies of the steric satbilization of colloidal particles. 37, 528, *J. Colloid Interface Sci*; 37, 528 (1971).
- (53) San Biagio, P. L; Bulone, D; Martorana, V; Palma-Vittorelli, M. B; Palma, M. U. Physics and biophysics of solvent induced forces: hydrophobic interactions and context-dependent hydration. *Eur. Biophys. J.* 27, 183, (1998).
- (54) Martorana, V; Corongiu, G; Palma, M. U. Interaction of explicit solvent with hydrophobic/philic/charged residues of a protein: residue character vs conformational contetxt. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*: 32, 129, (1998).
- (55) Molina-Bolivar, J. A; Galisteo-Gonzalez, F; Hidalgo-Alvarez, R. Stabilization of protein-latex complexes at high ionic strength. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*; 8, 73, (1996); Anomalous colloidal stability of latex-protein systems. *J. Colloid Interface Sci*; 206, 518 (1998).
- (56) Delgado-Calvo-Flores, J. M; Peula-García, J. M; Martínez-García, R; Callejas-Fernández, J. Experimental evidence of hidration forces between polymer colloids obtained by photon correlation spectroscopy measurements. *J. Colloid Interface Sci*; 189, (1997).

- (57) Churaev, N. V; Derjaguin, B. V. J. Colloid Interface. Sci. 103 (2), 542, (1985).
- (58) Van Oss, C.J; Absolom, D. R. Nature and Thermodynamics of the antigen-antibody Interactions. Mol. Immunol; 337, (1987).
- (59) Bradford, C. B; Poljak, R. J. The Structural and Thermodynamic Basis of antibody-Protein Antigens Interactions. In: The Antibodies. (Eds: Zannetti, M; Capra, D), 4, (1997). Harwood Academic (Amsterdam).
- (60) Persson, K. M; Gekas, V. Factors Influencing Agregation of Macromolecules in Solution. Process Biochem; 89, (1994).
- (61) Cacace, M. G; Landau, E. M; Ramsden. The Hofmeister series: salt and solvents effects on interfacial phenomena. Quaterly Rev. Biophys, 30, 241, (1997).
- (62) Napper, D, H. Steric Stabilization and the Hofmeister Series. J. Colloid Interface Sci., 33, 384, (1969).
- (63) Hofemister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. Arc. exp. Pathol. Pharmakol, 24, 247, (1888).
- (64) Collins, K. D; Washabaugh, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. Q. Rev. Biophys. 18, 323, (1985).
- (65) Oscarsson, S. Influence of salts on protein interactions at interfaces of amphiphilic polymers and adsorbents. J. Chomatography B, 666, 21, (1994).
- (66) Gueffroy, D. E. Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation, (1992).
- (67) Price, C. P; Newman, D. J. Precipitation and agglutination methods. In: Methods of immunological analysis. (Eds: Masseyeff, R. F; Albert, W. H; Stanies, N. A), 1, 134 (1993).
- (68) Medcalf, E. A; Newman, D. J; Gilboa, A; Gorman, E. G. A rapid and robust particle-enhanced turbidimetric immunoassay for serum β_2 microbulin. J. Immunol. Methods, 129, 97, (1990).

- (69) Levison, S. A; Kierszenbaum, F; Dandlinker, W. B. Salt Effects on Antigen-Antibody Kinetics. *Biochem*, 9, 322, (1970).
- (70) Franks, F. Solution Properties of Proteins. In: *Protein Biotechnology. Isolation, Characterization and Stabilization*. (Eds Frans, F). Human Press, (1993).
- (71) Kondo, A; Kawano, T; Higashitani, K. Immunological agglutination kinetics of latex particles with covalently immobilized antigens. *J. Ferment. Bioeng.* 6, (1992).
- (72) Quesada, M; Puig, J; Delgado, J. M; Hidalgo- Alvarez, R. Modelling the kinetics of antigen-antibody reactions at particle enhanced optical immunoassays. *J. Biom. Sci. Polymer Edition.* 9, 9, 961, (1998).
- (73) Berzofsky, J. A; Epstein, L. S; Berkower, I. J. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies. In: *Fundamental Immunology, Second Edition*.(Eds, Paul, W. E); 315, Raven, Press Ltd, New York, (1989).
- (74) Horne, D. S. Steric Stabilization and Casein Micelle Stability. *J. Colloid Interface Sci*, 111, 250, (1986).
- (75) Holt, C. Structural Studies on Bovine Casein Micelles by Laser Light Scattering. In: *The Application of Laser Light Scattering to the Study of Biological Motion*. (Eds Earnshaw, J.C; Steer, M. W); 353, Plenum Press, NATO Scientific Affairs Division, (1982).
- (76) Gorgani, N. N; Easterbrook-Smith, S. B; Altin, J. G. The formation of insoluble immune complexes between ovalbumin and anti-ovalbumin IgG occurs at least two distinct phases dependent on reactant concentration and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta* 1317, 45, (1996).
- (77) *Handbook of Chemistry and Physics*. 59TH edition. Ed: Weast, R. C; Astle, M. J. CRC-Press (Boca Raton, Florida). D-308, E-356, E-359. (1978-1979).
- (78) Kitano, H; Iwai, S; Okubo, T; Ise, N. Direct examination of chemical kinetics by visual imagery.3. Association of latex particles modified with antigens and antibodies. *J. Am. Chem. Soc*, 109, 7608, (1987).
- (79) Van der Scheer, A; Tanke, M. A; Smolders, C. A. Influence of Adsorbed Proteins on the

Stability of Polystyrene Latex Particles. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 65, 264, (1978).

(80) Barnett, R. N. *Estadística en el laboratorio clínico. Aplicaciones al control de calidad y valores de referencia.* Editorial Reverté, 22, (1983).

(81) Calef, D. F; Deutch, J, M; Diffusion-controlled reactions. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 34, 493, (1983).

(82) De young, L. R; Fink, A. L; Dill, K. A. Aggregation of globular proteins. *Accounts Chem. Research*, 26, 614, (1993).

(83) Tamai, H; Hasegawa, M; Suzawa, T. Flocculation of polystyrene latex particles by bovine serum albumin. *Colloid Surf*, 5, 271, (1990).

(84) Brouwer, A. C; Kirsch, J. F. Investigations of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation. *Biochemistry*, 21, 1302, (1982).

(85) Zanten, J. H; Elimelech, M. Determination of absolute coagulation rate constants by multiangle light scattering. *J. Colloid Interface Sci*; 154, 1, (1992).

(86) María. Tirado-Miranda, M. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada, (1997).

(87) Antonio Fernández Barbero, A. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (1994).

(88) Schmitz, K. S; Schurr, J. M. The role of orientation constraints and rotational diffusion in bimolecular solution kinetics. *J. Phys. Chem.*, 76, 1934, (1972).

(89) Wank, S. A; Delisi, C; Meteger. H. Analysis of the rate-limiting step in a ligand-cell receptor interaction: the immunoglobulin E system. *Biochem*, 22, 954, (1983).

(90) Balgi, G; Leckband, D. E; Nitsche, J. M. Transport effects on the kinetics of protein surface binding. *Biophys. J.*, 68, 225, (1995).

(91) Morgan, C. L; Newman, D. J; Burrin, J. M; Price, C. P. The matrix effects on kinetics rate constants of antibody-antigen interactions reflects solvent viscosity. *J. Immunol. Meth*; 217, 51, (1998).

- (92) Sadana, A; Beela, R. A. Fractal analysis of antigen-antibody binding kinetics: biosensor applications. *Biotechnol. Prog.*, 10, 291, (1994).
- (93) Teixeira, J. Experimental methods for studying fractal aggregates. In: *On Growth and Form*. (Eds: Stanley, H. E; Ostrowsky, N). Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, 145, (1986).
- (94) Horne, D. S. Determination of fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*; 83, 259, (1987).
- (95) Stoll, S; Lanet, V; Pefferkorn, E. Kinetics and modes of destabilization of antibody-coated polystyrene latices in the presence of antigen: reactivity of the system IgG-IgM. *J. Colloid Interface Sci.*; 157, 302, (1993).
- (96) Tirado-Miranda, M; Schmitt, A; Callejas-Fernández, J; Fernández-Barbero, A. Colloidal clusters with finite binding energies: fractal structure and growth mechanism. *Langmuir*; 15, 3437, (1999).
- (97) Zhu, P. W; Napper, D. H. The effects of different electrolytes on the fractal aggregation of polystyrene latexes coated by polymers. *Colloids Surfaces*, 98, 93, (1995).
- (98) Liu (39) Liu, J; Shih, W. Y; Sarikaya, M; Asay, I. A. Fractal colloidal aggregates with finite interparticle interactions: Energy dependence of fractal dimension. *Phy. Rev. A*; 41, 3206, (1990).
- (99) Shih, W. Y; Aksay, I. A; Kikuchi, R. Reversible-growth model: cluster-cluster aggregation with finite binding energies. *Phy. Rev. A*; 36, 5015, (1987).
- (100) Carpineti, M; Ferri, F; Giglio, M. Salt-induced fast aggregation of polystyrene latex. *Phys. Rev. A*; 42, 7347, (1990).
- (101) Lin, S. H. C; Leong, S. L; Dewan, R. K; Bloomfield, V. A; Morr, C. V; Effect of calcium ions on the structure of native bovine casein micelles. *Biochem.*, 11, 1818, (1972).
- (102) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. (3^o edición). (Eds: Colman, R. W; Hirsch, J; Marder, V. J; Salzman, E. W). J. B. Lippincott Company, (1994).

-
- (103) Nordin, G; Samuelson, I. Anderson, B; Börjesson, J. C-reactive protein: the difference between quantitation in serum and EDTA plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, 56, 123, (1996).
- (104) Hayakawa, K; Masuko, M; Mineta, M; Yoskikawa, K; Yamauchi, K; Hirano, M; Katsumata, N; Tanaka, T. Serum protein determination by high-performance gel-permeation chromatography. *J. Chrom. B*, 696, 19, (1997).
- (105) Berger C; Weber-Bornhauser; Eggenberger, J; Hanes, J; Plückthum, A; Bosshard, H. R. Antigen recognition by conformational selection. *FEBS Letters*, 450, 149, (1999).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

7.1 Conclusiones

Dentro de este capítulo se presenta un resumen de los resultados experimentales más relevantes, así como también de las conclusiones que de los mismos pueden extraerse

1ª La turbidimetría es una técnica eficaz en el seguimiento y caracterización de los procesos de agregación producidos por la unión específica de un Ag y un Ac, como es un inmunoensayo óptico de soporte coloidal. En el caso del reactivo para la detección de los anticuerpos heterófilos de Paul-Bunnell, el análisis matemático de las curvas absorbancia-tiempo ha permitido determinar dos parámetros de ajuste R_{max} y V_0 , que corresponden a la reactividad máxima (respuesta asintótica) y a la velocidad inicial respectivamente. Con estos dos valores ha sido posible caracterizar el sistema, estudiando el efecto de los distintos parámetros, como tamaño de partícula, recubrimiento, pH y fuerza iónica del medio, etc.

2ª. Se ha encontrado que la carga superficial de la partícula de poliestireno influye en la adsorción del Ag P-B. En igualdad de condiciones (pH, fuerza iónica, etc), a mayor densidad de carga, menor adsorción. Además, la estructura de la proteína adsorbida y por tanto su funcionalidad pueden variar en función del valor de la densidad de carga de la partícula.

3ª. En ciertas condiciones, a partir de un recubrimiento y manteniendo fija la cantidad de aglutinante, un aumento del Ag P-B adsorbido implica un descenso de la reactividad, tanto de R_{max} como de V_0 . Esta bajada está ocasionada por un exceso de proteína de sensibilización, lo que conlleva una pérdida de los lugares de unión activos del Ac P-B.

4ª. A partir del modelo teórico de V_0 como de los valores de R_{max} , se deduce que el tamaño inicial de partícula es el que determina el límite de detección y el rango lineal del reactivo en un amplio intervalo de recubrimientos y número de dispersores. A mayor diámetro, más respuesta a baja concentración de aglutinante y menor rango lineal. Esta tendencia se invierte al disminuir el tamaño de partícula.

5ª. La turbidimetría tiene una serie de limitaciones relacionadas con el número de partículas y el título del suero. Cuando la cantidad inicial de dispersores es elevada, en las concentraciones altas de aglutinante aparece un "plateau" de respuesta que impide determinar correctamente el rango lineal del reactivo. Este plateau se debe a que dos distribuciones de agregados pueden tener la misma absorbancia óptica, aunque el número de dispersores y su tamaño medio sean diferentes. Basta que un descenso en número debido a la agregación, esté equilibrado por un aumento de tamaño o viceversa. En estos

casos, para poder observar la campana de inmuno-aglutinación habría que aumentar la longitud de la onda de medida o el título del aglutinante.

Otro de los problemas que puede provocar un número elevado de partículas, es la saturación óptica del instrumento. En un turbidímetro saturado no es posible diferenciar las respuestas cuando la absorbancia óptica ha superado un determinado valor.

6ª. Existen unas condiciones de tamaño de agregado y longitud de onda (parámetro α) que dan lugar a la máxima respuesta inmunológica. Esta se produce cuando α alcanza un valor próximo a 5.

7ª. Del estudio del pH, naturaleza del electrolito y fuerza iónica se deduce que el tampón fosfatos es el más anticaotrópico, que el pH óptimo de reacción es 7 y la importancia que tienen la viscosidad y el índice de refracción a la hora de analizar los resultados. También se ha puesto de manifiesto el carácter caotrópico del NaCl, aunque la inhibición provocada por esta sal podría deberse también a las fuerzas estructurales y más concretamente a las de hidratación.

8ª. Se ha comprobado la validez del modelo teórico de V_0 , demostrando la linealidad de la velocidad inicial con N y N^2 . También se ha calculado la constante de formación de dímeros k_f . La relación lineal entre k_f y la viscosidad indica que la relación está controlada por difusión, al menos en los primeros instantes.

9ª. Se ha desarrollado un método turbidimétrico que permite calcular la dimensión fractal de los agregados y que se basa en la variación de la absorbancia óptica durante la reacción con la longitud de onda. Del estudio de la dimensión fractal se deduce lo siguiente:

- ▶ El mecanismo que controla la agregación es la difusión, ya que la evolución de los tamaños con el tiempo tiene una dependencia potencial.
- ▶ El valor de d_f es próximo a 2.5, lo que corresponde a una estructura muy compacta. Esta compacidad puede deberse a una reorganización interna o a que los agregados se han formado por la unión sucesiva de monómeros a agregados de mayor tamaño.
- ▶ La morfología del agregado es independiente de la cantidad de aglutinante y de la naturaleza del mismo.
- ▶ La presencia del calcio puede modificar la estructura de las proteínas y por tanto su funcionalidad.

APÉNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos y abreviaturas

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------|
| a | Coeficiente de pegado (“sticking coefficient”) |
| A, Abs | Absorbancia óptica a un tiempo de medida t |
| Ac P-B | Anticuerpo Paul y Bunnell |
| Ac | Anticuerpo |
| Ag P-B | Antígeno Paul y Bunell |
| Ag | Antígeno |
| A_0 | Absorbancia a t_0 |
| A_{max} | Absorbancia máxima de la curva (valor asintótico) |
| Ac_0 | Anticuerpo añadido inicialmente |
| Ac_{pe} | Anticuerpo correspondiente al punto de equivalencia |
| $(AB)_i$ | Estado intermedio en la formación de un dímero |
| $(A \cdot B)_0$ | Encuentro complejo (“encounter complex”) |
| A.IgG | Agregante IgG (semipurificado de origen animal) |
| A.IgM | Aglutinante IgM (suero humano) |
| b | Extensión lineal de un receptor en una superficie esférica |
| B.C.A | Método de determinación de proteína (Bicinconinic Acid) |
| BSA | Albúmina bovina |
| c | Velocidad de la luz en el vacío |
| $C_{1/2}$ | Tiempo correspondiente a $R_{max}/2$ (ajuste hiperbólico) |
| c.c.c | Concentración crítica de coagulación |
| c^0 | Concentración inicial de soluto |
| C_e | Concentración de electrolito |
| C_{ef} | Factor de colisiones eficaces |
| CV(%) | Coeficiente de variación |
| C_{abs} | Sección eficaz de absorción |
| C_{ext} | $C_{abs} + C_{sca}$ |
| C_1, C_{sca} | Sección eficaz de los monómeros |
| C_2 | Sección eficaz de los dímeros |
| C_i | Sección eficaz de un agregado formado por i monómeros |
| d | Espesor de la capa de proteína |
| D | Coeficiente de difusión traslacional |

| | |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d_f | Dimensión fractal |
| d.c.e | Doble capa eléctrica |
| D.L.A | Cinética de agregación controlada por difusión |
| \vec{E} | Vector campo eléctrico |
| \vec{E}_0 | Campo eléctrico externo a la esfera |
| \vec{E}_p | Campo eléctrico dentro de la esfera |
| EDTA | Ácido Etil Dinitrilo Tetracético |
| E.E | Error estándar |
| f.i | Fuerza iónica |
| f-c | Adaptación final menos cero |
| F_{op} | Factor óptico ($C_2/2 \cdot C_1 - 1$) |
| F_{id} | $F_{op} \alpha^2 S A_0$ (parte variable de V_{id}) |
| F_{pe} | $F_{op} \alpha^2 A_0^2 S / C_1$ (termino variable de V_{pe}) |
| g | Aceleración de la gravedad (9.806 m/s ²) |
| G(τ) | Función de correlación |
| HSA | Albúmina humana |
| H | Distancia entre dos partículas |
| \vec{H} | Vector campo eléctrico |
| i | Ángulo de incidencia |
| I | Intensidad de la luz |
| I_0 | Intensidad de la luz incidente |
| i.p | Índice de polidispersidad |
| J(r) | Densidad de corriente |
| K | 0.003s ⁻¹ (corrección de Hagenbach). Viscosímetro Ubbelohde Parámetro óptico igual a $2\pi/\lambda$ |
| k_1, k_2, k_0, k_{-0} | Constantes de aglutinación |
| k_B | Constante de Boltzman |
| k_r | Constante inversa de aglutinación de dos monómeros |
| k_f, k_{11} | Constante de aglutinación directa de formación de un dímero |
| k^{-1} | Espesor de la d.c.e |
| Ix-Ag P-B | Complejo látex antígeno Paul-Bunnell |
| [Ix-Ag P-B]-Ac P-B | Complejo látex antígeno-anticuerpo Paul-Bunnell |
| m | Índice de refracción complejo de la partícula respecto al medio |
| M | Peso molecular de la proteína adsorbida |

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| M.N.I | Mononucleosis infecciosa |
| $\langle M \rangle$ | Masa media de un agregado fractal |
| n | Índice de refracción de la partícula respecto del medio (n_e/n_m) |
| n | Número de lugares activos por partícula |
| n_e | Índice de refracción de las partículas |
| n_m | Índice de refracción del medio |
| n_{mon} | Número medio de monómeros por agregado fractal |
| N | Número de dispersores |
| N_0 | Número inicial de monómeros |
| N_1, N_2 | Número de monómeros y dímeros a un tiempo t de reacción |
| N_i | Número de agregados formados por i monómeros |
| N.S | Nivel de significación |
| $n(t)$ | Número de cuentas o fotones (P.C.S) |
| n_A | Número de aglutinantes por partícula |
| $n-n_A, n_A(n-n_A)$ | Número de lugares activos de unión entre dos partículas |
| n_e | Índice de refracción del soporte de poliestireno |
| n_m | Índice de refracción del medio de reacción |
| N_A | Número de Avogadro |
| l | Paso de luz de la célula de medida |
| Or | Ordenada en el origen del ajuste lineal |
| $P(\theta)$ | Factor de forma |
| $P_n^{(1)}(x)$ | Funciones asociadas de Legendre |
| \vec{P} | Momento dipolar |
| P.C.S | Espectroscopía de fotocorrelación |
| p.i.e | Punto isoeléctrico de la proteína |
| q | Cociente entre u y R ($2\alpha \text{sen}(\theta/2)/R$) |
| Q | Factor de forma de turbidez |
| Q_{sca} | Factor de eficacia ($C_{sca}/\pi R^2$) |
| r | Coefficiente de correlación lineal |
| r | Angulo de refracción |
| r_s | Radio del lugar reactivo |
| R | Reactividad ($R = A - A_0$). Radio de partícula |
| $R_{exp}(t)$ | Reactividad experimental a un tiempo de medida t |

| | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Rteo(t) | Reactividad teórica a un tiempo de medida t |
| Razón 340/600 | Cociente de absorbancia óptica a 340 y 600 nm |
| R.G.D | Teoría de Rayleigh-Gans-Debye |
| R.L.A | Cinética de agregación controlada por difusión |
| R_{\max} | Valor máximo (asintótico) de R (ajuste hiperbólico) |
| RP | Látex comercial de la casa Rhône-Poulenc |
| r_s | Radio del lugar reactivo |
| S | Grado de recubrimiento de las partículas |
| S.D | Desviación estándar |
| S_{yx} | Desviación estándar de la distribución de residuos |
| S(q) | Factor de estructura de los agregados |
| t | Tiempo de medida |
| t | Prueba de la t de Student |
| t_0 | Tiempo cero de reacción (0 ó 5s) |
| T | Temperatura Trasmitancia óptica |
| Teoría D.L.V.O | Teoría de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek |
| T.E.M | Microscopio Electrónico de transmisión |
| U.A | Unidades Arbitrarias (referidas a la absorbancia) |
| U.P-B | Unidades Paul-Bunnell (título del suero de MNI) |
| v | Valencia del contraion Velocidad de la luz en un medio material |
| V_1 | Volumen molar del disolvente |
| V_s | Velocidad de sedimentación de los agregados |
| V | Volumen de la esfera dispersora |
| V_0 | Velocidad inicial de reacción de curva absorbancia-tiempo |
| V_A | Energía de interacción atractiva entre dos partículas |
| V_M | Barrera energética entre dos partículas |
| V_R | Energía de interacción repulsiva entre dos partículas |
| V_T | Energía total de interacción entre dos partículas |
| V_{est} | Potencial repulsivo estérico ($V_{\text{est}} = V_{\text{osm}} + V_{\text{el}}$) |
| V_{el} | Potencial de repulsión elástico |
| V_{hyd} | Potencial repulsivo de hidratación |
| V_{osm} | Potencial de repulsión osmótico |

| | |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| V_{ld} | Valor V_0 en el límite de detección |
| V_{pe} | V_0 correspondiente al punto de equivalencia |
| u | Parámetro óptico ($2\alpha \text{sen}(\theta/2)$) |
| $U(r)$ | Potencial de una "fuerza media" de largo alcance |
| W | Factor de estabilidad de Fuchs |
| x | Variable independiente |
| y, y_i | Variable dependiente |
| z_i | Carga del contraion |
| Z_0 | Impedancia característica del medio |
| α | Parámetro adimensional ($\alpha=2\pi R n_m/\lambda_0$) |
| β | Parámetro β ($\beta-d_f$) |
| δ | Espesor de la capa de proteína |
| $\Delta\tau$ | Tiempo de muestreo o "sample time" (técnica PCS) |
| γ | Coefficiente que recoge el cambio de n_e y n_m con λ_0 |
| ϵ_c | Constante dieléctrica del medio |
| ϵ_0 | Permitividad del vacío |
| η | Viscosidad |
| η/η_0 | Viscosidad relativa a la del agua a una temperatura T_0 |
| θ | Coordenada polar |
| θ_A, θ_B | Ángulo de reacción de las partículas A y B, respectivamente |
| λ | Longitud de onda en el medio de reacción ($\lambda=\lambda_0/n_m$) Parámetro de van Dogen y Ernst |
| λ_0 | Longitud de onda de la radiación en el vacío |
| μ | Permeabilidad magnética del medio Movilidad mecánica |
| ξ | Radio del agregado |
| ρ_0 | Densidad del medio de reacción |
| ρ_2 | Densidad de la proteína |
| ρ_m | Densidad media de la muestra (partículas/volumen) |
| ρ | Densidad del poliestireno |
| σ | Conductividad del medio |
| σ_0 | Densidad superficial de carga |
| τ | Turbidez Tiempo de traslación de la partícula (movimiento "browniano") |
| ϕ | Diámetro de partícula |

| | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|
| ϕ | Coordenada polar |
| Φ_2 | Fracción de volumen efectivo de proteína en la superficie de la partícula |
| Φ_M | Flujo por unidad de concentración de partículas |
| ψ | Coordenada polar |
| χ | Parámetro de solvencia de Flory-Huggins |
| χ^2 | Chi ² (determina la bondad del ajuste) |
| ω | Frecuencia angular de la onda |