



"Sistema de Lectura Eléctrica de Microarrays Proteomicos"

DIANA LISETTE BONILLA AGUILAR

Tesis de Doctorado

Doctorado en Ingeniería Electrónica

Directores:

Dr. Cesar Fernandez Sanchez

Dr. Antonio Baldi Coll

Departamento de Ingeniería Electrónica

2013

Memòria presentada per aspirar al grau de Doctor
per Diana Lisette Bonilla Aguilar

El Dr. César Fernández Sánchez y el Dr. Antonio Baldi Coll investigadores del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM-CSIC), junto con el Dr. Jordi Sacristán Riquelme, Profesor Asociado del Departamento de Electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "Sistema de Lectura Eléctrica de Microarrays Proteómicos", presentada por Diana Lisette Bonilla Aguilar para optar el grado de Doctor en Ingeniería Electrónica por la Universidad Autónoma de Barcelona ha estado realizada bajo nuestra dirección.

Bellaterra, 26 de Septiembre de 2013

Directores:

DR. CÉSAR FERNÁNDEZ SÁNCHEZ

DR. ANTONIO BALDI COLL

Tutor:

DR. JORDI SACRISTAN RIQUELME

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este trabajo, en especial a los doctores César Fernández Sánchez y Antonio Baldi Coll, directores de esta tesis, por su orientación, seguimiento y supervisión continúa, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Un reconocimiento especial a la ayuda y apoyo recibido de la doctora María Díaz, con la que me encuentro en deuda por su colaboración desinteresada y total disponibilidad para asesorarme siempre que hizo falta. También me gustaría agradecer profundamente la ayuda recibida de María Mallen quien ha sido la base de muchos resultados positivos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a todo el staff del Instituto de Microelectrónica de Barcelona CNM y, muy especialmente al Grupo de Transductores Químicos por su amistad y colaboración.

También quiero dar las gracias al CSIC por permitirme obtener este título por medio de la beca JAE-Predoc referencia: JAEPred_07_00725 y al proyecto MEC, TEC2007-29637-E/(Explora), con el que se financió este trabajo.

Y finalmente y no por ello menos importante, un eterno agradecimiento a la comprensión, paciencia y apoyo recibidos de mi familia y mis amigos que fueron la fuerza para que esta tesis sea hoy una realidad.

A todos ellos, muchas gracias.

ABSTRACT

An electrical readout system of microarrays comprising an array of conductimetric transducers, which enabled multiplexed detection of up to 36 biological events on the same substrate, is reported in this thesis. Similarly to fluorescent readout counterparts, regular glass slides were applied for carrying out the microarray. However, unlike them, the presented system is compact and requires a simple and inexpensive instrumentation, thus being ideally suited for deployment of bioarray detection approaches. Other compact electrical readout systems previously reported are based on the immobilization of the specific bioreceptors on the transducer surface, which make them single-use and thus expensive. Our system combines the merits of both previous electrical systems and the fluorescence scanner approaches.

An array of 40 μm -pitch gold interdigitated electrode pairs (IDEs) was fabricated on glass substrates. Conductimetric measurements were carried out with these transducers by applying urease-based (urease labeled) immunoassay reactions. The hydrolysis of urea catalyzed by urease produces ionic species in solution that increase its conductivity. In order to carry out such detection scheme, the bioarray was developed on a regular glass slide substrate, which was then placed over the IDE microarray leaving a fixed gap and aligned so that each spot of the bioarray faced one IDE.

Therein, the droplets of urea solution were placed in the gap to contact the IDEs and the corresponding spots of the bioarray. However, in the development of the first approach, some major drawbacks related to droplet evaporation and chemical cross-talk between adjacent droplets made the system to be far from achieving the performance of fluorescent detection approaches. Moreover, a microdispenser was required to accurately position the droplets.

In a second approach, we found the solution for circumventing these drawbacks and the demonstration of the potential of the system as a real competitor against fluorescence based systems in terms of analytical performance. An array structure of 36 PDMS microwells having a volume of 1.2 μL were fabricated by molding and positioned over the IDE array. The geometry of each microwell includes an O-ring like structure and an empty area around it, which enabled first, to easily fill it without using any specific instrumentation and second, to ensure its liquid tightness once the bioarray was positioned over it. This set-up was demonstrated to completely avoid the evaporation and chemical cross-talk issues.

Finally, a third approach is presented, where the readout automatized by means of a microfluidic structure that includes the PDMS microwells together with those fluidic components that enabled the automatic filling with the measuring solution as well as the cleaning step of the system once a microarray was measured. Working in this way improves the throughput of the electrical readout system as well as enhanced its reliability by minimizing the manipulation by the user.

RESUMEN

En esta tesis se presenta un sistema de lectura eléctrica de microarrays que comprenden una serie de transductores impedimétricos con los cuales realizar la detección multiplexada de hasta 36 eventos biológicos en un mismo sustrato. Al igual que con los microarrays de lectura fluorescente, se han empleado sustratos de vidrio desechables para la fabricación del microarray. Sin embargo, a diferencia de ellos, el sistema presentado es compacto y requiere una instrumentación sencilla y de bajo coste, lo que hace que el sistema pueda ser muy útil para realizar la descentralización de este tipo de medidas analíticas. Otros sistemas de lectura eléctricos compactos reportados anteriormente se basan en la inmovilización de los receptores biológicos específicos sobre la superficie del transductor, lo que hace que sean de un solo uso y por lo tanto costosos. Nuestro sistema combina las ventajas de los sistemas eléctricos anteriores y los escáneres de fluorescencia.

El array de electrodos interdigitados (IDEs) se fabricó sobre sustratos de vidrio. Las medidas conductimétricas fueron realizadas con estos transductores mediante la aplicación de reacciones de inmunoensayo que emplean la ureasa como marca. La hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa produce especies iónicas en solución que aumentan su conductividad. Los microarrays se fabrican sobre portaobjetos de vidrio convencional. Para la lectura, se coloca sobre el microarray sobre el array de IDEs dejando un espacio de fijo entre ambos, de modo que cada punto del microarray se alinea con su IDE correspondiente.

En el proceso de medida se depositaron gotas de solución de medida que contienen urea que ponían en contacto el IDE y el punto correspondiente del microarray. Sin embargo, en un primero trabajo se presentaron algunos inconvenientes importantes relacionados con la evaporación de las gotas y el cross-talk químico entre las gotas adyacentes debido a migración de especies iónicas, lo que hizo que el sistema presentase unas características de sensibilidad y límite de detección sensiblemente más limitadas que las mostradas por los sistemas de detección fluorescente. Por otra parte, se requería de un microdispensador para posicionar con precisión las gotas sobre los transductores.

En un segundo trabajo, se encontró una solución para resolver estos inconvenientes y se demostró el potencial del sistema para ser un competidor real, en términos de rendimiento analítico, frente a los sistemas basados en fluorescencia. Dicha solución se basó en el empleo una estructura de PDMS que incluye 36 micropocillos de 1.2 μL de volumen, los cuales se disponen sobre el array de transductores para contener el volumen de solución de urea y poder realizar la lectura de cada punto del microarray dentro de una cavidad cerrada. Con esta configuración se consiguió evitar por completo los problemas de evaporación y cross-talk químico.

Por último, se presenta un tercer trabajo donde se automatizó este sistema de lectura mediante la implementación de una estructura microfluídica que incluye el array de micropocillos de PDMS así como los componentes fluídicos necesarios para realizar el llenado automático de los mismos así como su lavado posterior una vez realizada la lectura de un microarray. De esta forma, se mejoró el rendimiento del sistema de lectura a la vez que su fiabilidad al minimizar la manipulación por parte de un usuario.

INDICE

AGRADECIMIENTOS

ABSTRACT

RESUMEN

CAPITULO I 1

Introducción

1.1 Microarrays y sus aplicaciones 1

1.2 Sistemas de Lectura de microarrays 10

1.3 Detección de impedemtria 19

CAPITULO II 34

CAPITULO III 36

Lectura Eléctrica de Microarrays de Proteínas realizadas en portaobjetos de vidrio

3.1 Resumen 36

3.2 Introducción 37

3.3 Sección experimental 38

3.4 Resultados y discusión 48

3.5 Conclusiones 56

CAPITULO IV 59

Implementación de un Array de Micropocillos en el Sistema de Lectura Eléctrica.
Aplicación a la Detección de Boldenona

4.1 Resumen 59

4.2 Introducción 60

4.3 Sección experimental 61

4.4 Resultados y discusión 69

4.5 Conclusiones 77

CAPITULO V 78

Fabricación de un Dispositivo Fluídico para el Llenado Automático del Array de
Micropocillos: Automatización del Sistema de Lectura

5.1 Resumen 78

5.2 Introducción 79

5.3 Sección experimental 80

5.4 Resultados 84

5.5 Conclusiones 87

CAPITULO VI 89

Conclusiones 89

Capítulo I

INTRODUCCION

En este capítulo se describen conceptos fundamentales aplicados en este trabajo de Tesis Doctoral.

1.1 Microarrays y sus aplicaciones

1.1.1 Funcionamiento general:

La decodificación completa del genoma humano se ha considerado como uno de los mayores logros científicos de la humanidad. Ha permitido caracterizar cada uno de los genes que contiene el ser humano. Para cada gen se ha precisado las secuencias de ADN que lo conforman y se ha definido su función dentro del organismo [1].

Una de las funciones de los genes es sintetizar proteínas. Las proteínas son componentes básicos de las células, son imprescindibles para el crecimiento del organismo y entre sus muchas funciones se destacan la estructural, inmunológica, enzimática y homeostática, entre otras. La proteómica es un campo de investigación cuyo objetivo es identificar y caracterizar las proteínas sintetizadas o expresadas por un gen dentro de un organismo. Ofrece una visión global e integral del estado de una enfermedad y procesos celulares mediante el estudio del conjunto de proteínas de una célula, tejido u organismo en un momento dado [1].

Los microarrays son una herramienta analítica fundamental para la proteómica. Se emplean para la detección e identificación de nuevas proteínas y biomarcadores. Un biomarcador es una molécula que indica un cambio en la expresión o el estado de una proteína que se correlaciona con el riesgo o la progresión de una enfermedad, o con la susceptibilidad de la enfermedad a un determinado tratamiento. Un biomarcador también puede ser cualquier otra molécula, por ejemplo, una hebra de ADN mutado, que se pueda correlacionar con el estado de una

enfermedad particular. No obstante, dentro de una célula existen millones y millones de proteínas y genes diferentes.

De forma concreta, un microarray es un conjunto de áreas o puntos de ensayo de pequeñas dimensiones (desde pocos nm a pocos mm) desarrollados sobre un sustrato plano, de tal forma que permite realizar muchos ensayos en paralelo, aumentando enormemente la velocidad y la capacidad de análisis respecto a sistemas de análisis en serie. En la actualidad existen múltiples formatos para microarrays que permiten un análisis multiplexado de diferentes parámetros en un número elevado de muestras simultáneamente [5]. Los microarrays de alta densidad son ensayos en paralelo donde se pueden inmovilizar un número muy elevado de biomoléculas de reconocimiento para diferentes biomarcadores. De esta manera es posible analizar el perfil de una enfermedad o la interacción de miles de proteínas con un medicamento determinado. Esta técnica de alto rendimiento permite obtener un diagnóstico precoz, sofisticado y de bajo costo [2-4].

Los microarrays permiten trabajar con muestras biológicas de composición desconocida de muy variada naturaleza, desde células, tejidos lisados, sueros, etc. El formato de microarray más común conlleva la inmovilización de las muestras sobre el sustrato y la posterior incubación de los puntos de ensayo generados con una solución que contienen biomoléculas de reconocimiento (o bioreceptores) que se unen de forma específica a la molécula que se quiere analizar (analito) y que permiten realizar la detección y/o cuantificación de la misma empleando algún método de análisis instrumental adecuado. Para realizar dicha detección las biomoléculas de reconocimiento están marcadas con especies coloreadas o con propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes vienen marcadas con moléculas que permiten realizar la lectura del microarray [6]. De forma habitual se utilizan marcas colorimétricas, fluorescentes o quimioluminiscentes para la lectura óptica del array [7] y para la lectura eléctrica se utilizan marcas enzimáticas, magnéticas, o nanopartículas funcionalizadas [8], como se explicará más en detalle en la sección 1.2 . La **Figura 1** muestra un esquema de un microarray.

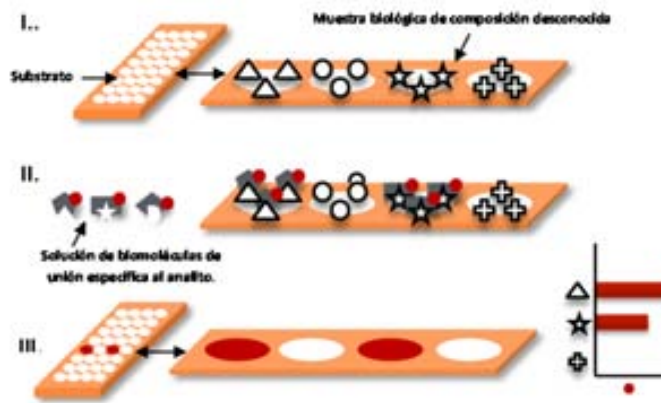


Figura 1: Esquema de un microarray y su funcionamiento.

Se han desarrollado microarrays para aplicaciones muy diversas, pudiendo clasificarse en función de las biomoléculas aplicadas: ADN, peptídicos, de proteínas, y celulares. Esta herramienta analítica se ha expandido más allá del campo de la genómica y la proteómica, revolucionando también el ámbito clínico [9] y farmacéutico [10].

En el caso de la genómica, las aplicaciones de los microarrays van desde la identificación de nuevos genes, sitios de unión de los factores de transcripción, cambios en el número de copias de ADN, hasta la detección de variaciones de la secuencia base [11]. En proteómica, se analiza el contenido proteico, las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN o proteína-ligando [5].

Donde está creciendo el interés por esta tecnología es en el campo clínico. El mercado global de microarrays fue valorado en Estados Unidos en \$ 2.6 mil millones en 2010 y se espera que alcance \$ 5.6 mil millones en 2015; creciendo a una tasa anual del 16,7%. Este crecimiento se atribuye al aumento de las aplicaciones en el diagnóstico del cáncer y de perfiles de expresión así como el auge de la medicina personalizada.

Los microarrays podrían constituir una herramienta poderosa para poner en marcha la llamada “medicina a la carta”, en el pasado una utopía, pero a día de hoy está convirtiéndose en una realidad que permitirá disminuir al mínimo los efectos secundarios de los fármacos, tan destacables, por ejemplo, en oncología mediante el análisis de las variaciones genéticas del paciente [2, 12].

Para la industria farmacéutica también son muy atractivas estas tecnologías que permiten poder testar a gran escala nuevos fármacos con diferentes dianas, e incluso, poder encontrar nuevas indicaciones o dianas para fármacos ya existentes [10].

El procedimiento tradicional para los ensayos multiplexados de proteínas ha sido durante décadas el llamado inmunoensayo tipo ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay), realizado comúnmente sobre placas de poliestireno con una matriz de 96 pocillos, cada uno de los cuales con un volumen de 350 μl . La mayoría de los ELISA se basan en modos de detección óptica, fluorescente o quimiluminiscente, con equipos de laboratorio voluminosos. La aparición de los microarrays ha permitido el escalado de este tipo de ensayos. Estas herramientas analíticas han reducido drásticamente los volúmenes de muestra requeridos para realizar un análisis, aumentado significativamente el número de parámetros que se pueden analizar simultáneamente en una muestra así como incrementado en gran medida la frecuencia de análisis. En un porta objetos de vidrio, con las herramientas adecuadas, es posible inmovilizar 50.000 muestras de 0.2 μl cada una, pasando así de 96 pocillos en las placas de ELISA a miles de puntos, los cuales requieren volúmenes para todo el microarray tan pequeños como 10 μl . Como se puede observar en la Figura 2, el mundo de los microarrays ha abierto las puertas a la miniaturización de los inmunoensayos y con ello el desarrollo de soportes para su fabricación y sistemas apropiados para su lectura [1].



Figura 2: Microarray de ADN de la empresa Arrayit que contienen los 25.000 genes del cuerpo humano.

Por último, una ventaja añadida de los microarrays es que pueden llegar a ser dispositivos *"Point-of-Care"*, es decir, dispositivos de análisis de diagnóstico inmediato donde con una muestra de sangre o saliva del paciente se puede obtener un análisis rápido del parámetro que se quiere observar sin necesidad de llevar la muestra del paciente y tratarla en un laboratorio especializado, lo que implica tiempos de largos desde la toma de muestra hasta la obtención de los resultados del análisis de dicha muestra [4], [8].

1.1.2 Bioensayos

Hasta la fecha, los microarrays se basan en dos tipos de bioensayos, principalmente: directo e indirecto [13]. Los indirectos pueden ser a su vez, competitivos y no competitivos, dividiéndose a su vez los no competitivos en los llamados *"forward"* y *"reverse phase"*. Un diagrama de esta clasificación se recoge en la Figura 3.

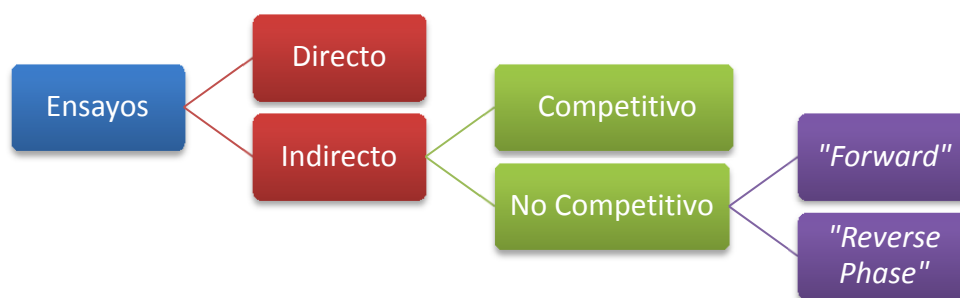


Figura 3: Formatos de bioensayo aplicados en el desarrollo de microarrays.

En el ensayo directo, como se muestra en la Figura 4, se modifica el sustrato con el receptor selectivo (elemento de reconocimiento), el cual interacciona con el analito y en la muestra, y esta interacción puede ser detectada directamente mediante un cambio de masa, índice de refracción, conductividad, o pH, entre otros [13].

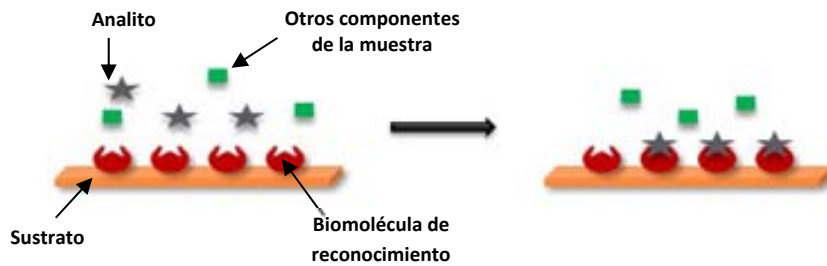


Figura 4: Esquema de un bioensayo directo.

En el ensayo indirecto se realiza una reacción adicional para detectar la unión entre la biomolécula de reconocimiento y el analito. Esta reacción, que puede ser competitiva o no competitiva, incluye un reactivo marcado necesario para realizar la lectura del ensayo. El tipo de lectura de este microarray depende de la naturaleza de la marca [13].

En el caso de los ensayos competitivos, como se puede observar en la Figura 5, el analito compite por la biomolécula de reconocimiento con el mismo analito marcado, el cual se añade en una concentración fija a la disolución. De esta forma, cuanto mayor es la concentración del analito en la muestra, menor es la concentración de analito marcado que se une al sustrato, y menor es entonces la señal registrada. Por lo tanto la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración del analito [13].

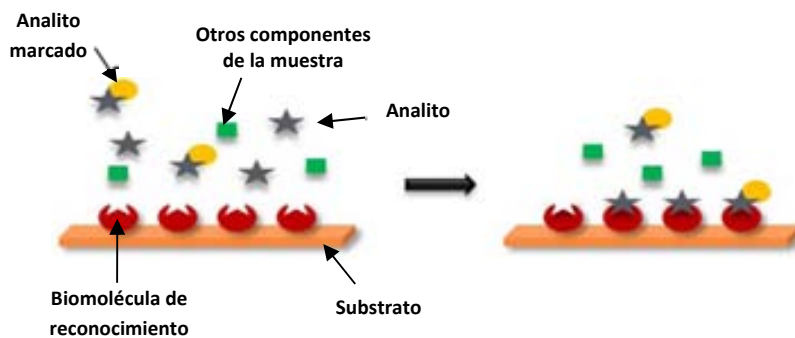


Figura 5: Esquema de un formato de bioensayo competitivo.

En los bioensayos no competitivos el analito reacciona con una biomolécula de reconocimiento inmovilizada sobre el sustrato, para a

continuación tener lugar una segunda reacción con otra biomolécula marcada. En este caso la señal registrada, debida a la presencia de la marca, es directamente proporcional a la cantidad del analito [13]. Este tipo de ensayos son los más comunes (Figura 6) y se conocen comúnmente como ensayos tipo “sándwich”.

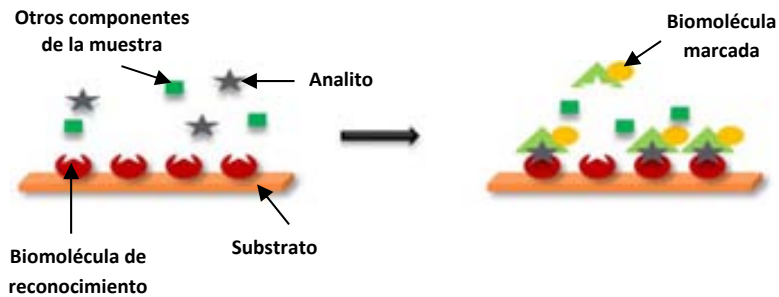


Figura 6: Esquema de un ensayo no competitivo.

Aunque se han desarrollado múltiples formatos para los bioensayos tipo *sandwich*, son dos los más generalizados: “*Forward*” y “*Reversed-phase*”.

En el caso de los “*Forward*”, como se puede observar en la Figura 7, se inmovilizan diferentes biomoléculas de reconocimiento en la superficie del microarray para después ser incubado todo el microarray con una misma muestra y de esta manera detectar múltiples parámetros para dicha muestra [4].

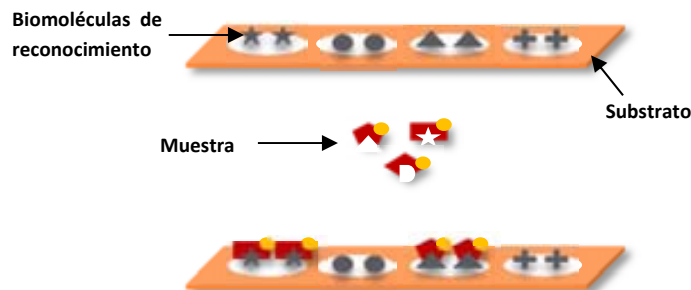


Figura 7: Esquema de un ensayo no competitivo “*forward*”.

En los ensayos tipo “*Reversed-phase*”, como se puede ver en la Figura 8, se inmovilizan múltiples muestras en la superficie del microarray, que se incuban posteriormente con una sola biomolécula de unión específica y así analizar simultáneamente un único parámetro para diferentes muestras [4].

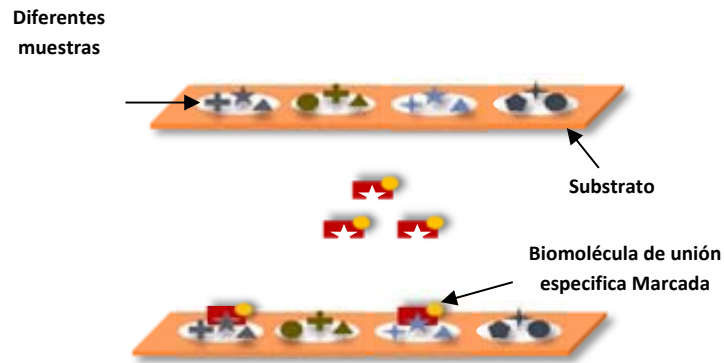


Figura 8: Esquema de un ensayo no competitivo “*reversed-phase*”.

1.1.3 Evento de bioreconocimiento

En un organismo vivo tienen lugar de forma natural multitud de interacciones biológicas entre biomoléculas, siendo probablemente las más conocidas las que tienen lugar entre un anticuerpo producido por el sistema inmunitario de un organismo y un antígeno o molécula extraña al mismo, así como las reacciones de hibridación entre secuencias complementarias de nuestro material genético. Ambas han sido desarrolladas *in vitro* durante décadas para la detección y cuantificación de moléculas de interés.

Reacción ANTIGENO-ANTICUERPO

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas. Su función biológica es identificar las moléculas extrañas y marcarlas para su posterior destrucción. Las moléculas reconocidas por los anticuerpos se llaman antígenos. Prácticamente, cualquier molécula externa al organismo vivo puede ser reconocida como un antígeno. Cada antígeno se unen con su anticuerpo en una interacción altamente específica [14].

DNA-cDNA

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una biomolécula que forma parte de todas las células y algunos virus. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos, y es responsable de su transmisión hereditaria.

Desde el punto de vista químico, el DNA es un polímero, con una estructura de doble hélice. Cada hebra de la doble hélice se conoce como cadena simple de DNA. Cada cadena está formada por nucleótidos que contienen cuatro tipos de bases nitrogenadas diferentes (adenina, guanina, timina y citosina), las cuales, para formar la doble hélice interaccionan de forma complementaria con las bases presentes en la cadena complementaria, de tal forma que la adenina se une a la guanina, y la timina a la citosina (Figura 9). La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética. Esta interacción altamente selectiva se ha empleado *in vitro* para detectar mutaciones en el código genético de un ser vivo.

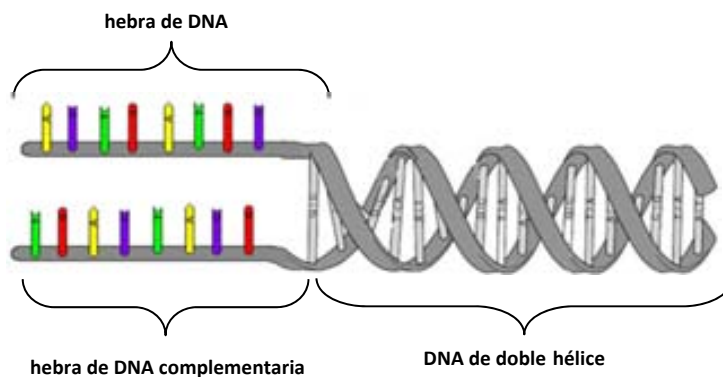


Figura 9: Esquema de la molécula de DNA

1.1.4 Estrategias de inmovilización selectiva de biomoléculas a un sustrato

Los sustratos comúnmente empleados en la preparación de microarrays son de vidrio, sin embargo, los plásticos y membranas poliméricas están ganando popularidad. La inmovilización estable de biomoléculas sobre dichos sustratos conlleva la modificación previa de los mismos con algún

reactivo que aporte una funcionalidad química adecuada [1]. Si nos centramos en los sustratos de vidrio, la modificación más extendida es la silanización empleando organoalcoxisilanos que permiten la obtención de superficies modificadas con grupos como aldehído o epoxi (Figura 10) a los cuales se pueden unir directamente las biomoléculas a través de sus grupos amino. Dicha unión es de tipo covalente y es muy estable.

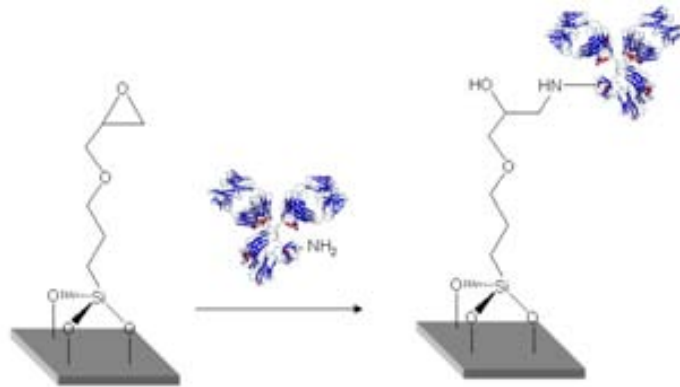


Figura 10. Silanización de un sustrato de vidrio con un epoxi-silano y posterior unión covalente a una biomolécula, en este caso un anticuerpo, a través de sus grupos amino primarios.

Algunos microarrays emplean geles, como la poliacrilamida, el cual absorbe directamente las biomoléculas. Esta técnica se utiliza para la fabricación de arrays de 3 dimensiones donde es importante anclar una gran cantidad de biomoléculas en la misma área y mantenerlas en un medio húmedo para impedir su desnaturalización. Este procedimiento, sin embargo, encarece sensiblemente el coste de los microarrays desarrollados [1].

1.2 Sistemas de lectura de microarrays

El progreso en la tecnología para leer microarrays depende del desarrollo de métodos e instrumentos cada vez más precisos, sensibles, baratos, automatizables y con capacidad para la detección de múltiples parámetros en la muestra de un mismo paciente. Estos sistemas están ligados a la marca que se utilizan para la lectura, pudiendo ser

principalmente de tipo óptico o eléctrico. En la Tabla 1 se puede observar diferentes tipos de sistemas de lectura, que se explicaran más adelante.

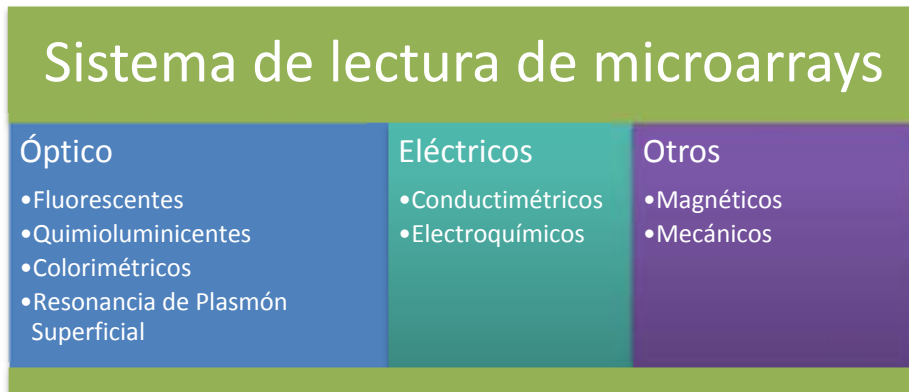


Tabla 1: Tipos de sistemas de lectura para microarrays

1.2.1 Sistemas Ópticos

Los métodos de lectura de microarrays basados en sistemas ópticos, utilizan dispositivos capaces de detectar un cambio en las propiedades ópticas tales como la absorción, fluorescencia, luminiscencia o índice de refracción, entre otros. Son los más importantes y desarrollados que hay hasta el momento. Tienen gran aceptación en el análisis de importantes biomarcadores de cáncer y de otras enfermedades debido a su buena sensibilidad y bajo límite de detección [8, 15].

A) MICROARRAYS FLUORESCENTES

La detección de biomarcadores mediante espectro de fluorescencia se lleva a cabo cuando la biomolécula que detecta el analito está marcada con un fluoróforo. Un fluoróforo es el componente de una molécula, a menudo su grupo funcional, que absorbe energía en una determinada longitud de onda y re-emite esta energía en una longitud de onda diferente, pero específica [16]. La lectura se hace a través de la imagen del microarray, donde se estimula el fluoróforo con una longitud de onda específica provocando una emisión de luminiscencia a otra longitud de onda, fácilmente registrable [17]. La cuantificación de la fluorescencia de

cada punto del microarray se corresponde con la concentración del analito [8].

Existen muchos instrumentos para medir microarrays de fluorescencia:

Microscopio de Fluorescencia: en este microscopio, la luz de una determinada longitud de onda se transmite a través de un condensador especializado que se concentra la luz en un haz muy estrecho. Cuando la luz incide en el microarray, los fluoróforos se excitan y empiezan a emitir luz. La imagen resultante se puede inspeccionar visualmente o almacenar con una cámara de CCD para después ser analizada mediante software [17].

Microscopio Confocal: es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste. Utiliza un "*pinhole*" (diafragma) espacial que elimina la luz desenfocada. Sólo la luz que está dentro del plano focal puede ser detectada, de modo que la calidad de imagen es mucho mejor. Como sólo se ilumina un punto cada vez, se requiere un "*scanning*" de toda la muestra para poder obtener la imagen resultante [17].

Scanner de Disco de Nipkow: el funcionamiento es similar al microscopio confocal, con la diferencia que este sistema puede analizar varios puntos simultáneamente. La luz incidente se proyecta sobre un disco en rotación que contiene múltiples líneas de pequeños "*pinholes*" colocados en espiral. La fluorescencia emitida desde cada punto vuelve a través de los mismos "*pinholes*" y es proyectada sobre una cámara de CCD [17].

Existen otros sistemas que se basan en los mencionados anteriormente, con mejoras tecnológicas como es el caso de los escáneres láser de barrido que se basan en el escáner de disco donde pueden lograr velocidades compatibles con la creación de videos y así producir un mayor rendimiento en la calidad de la imagen. Estos sistemas utilizan MEMS basados en espejos de barrido [18].

B) MICROARRAYS QUIMIOLUMINICENTES

Se basan en el empleo de una biomolécula marcada con un catalizador capaz de oxidar sustancia como el luminol, cuyos productos de la reacción son luminiscentes. Al igual que en casos anteriores, la imagen resultante de este tipo de sistemas se almacena mediante una cámara CCD para ser analizada después mediante software [19].

C) MICROARRAYS COLORIMETRICOS

Como un método alternativo a la fluorescencia o la quimioluminiscencia descritos anteriormente, aparecen los sistemas colorimétricos. Este sistema es utilizado en microarrays marcados con nanopartículas de oro, por ejemplo. El oro al ser un metal refleja la luz. Las propiedades químicas del oro se pueden aprovechar también para amplificar la señal. Para esto, después del evento de bioreconocimiento se agrega nitrato de plata y un agente de reducción. La nanopartícula de oro actúa como catalizador de la reacción de reducción de los iones de plata en plata metálica, precipitando sobre las nanopartículas de oro. Las manchas de plata en los puntos del microarray son claramente visibles. La imagen se obtiene mediante un escáner normal o simplemente una cámara de CCD con una luz apropiada. La ventaja que tiene este método frente a los dos mencionados anteriormente es su bajo coste. La plata depositada tiene la característica que refleja muy bien la luz en el espectro visible, y esto permite el uso de lectores basados en el principio de reflexión de la luz. Otra ventaja de este método es que la plata depositada es muy estable, esto hace que el microarray se pueda almacenar durante un período largo de tiempo [20].

D) MICROARRAYS DE RESONANCIA DE PLASMON SUPERFICIAL (RPS)

Este sistema de lectura es una importante alternativa a los métodos de análisis químico clásicos. Permite la realización de medidas en tiempo real con gran sensibilidad. Su principal ventaja es que se trata de una medida directa. No es necesario el empleo de reactivos marcados. El gran inconveniente de estos sistemas es el costoso detector óptico que se necesita para la lectura [21]. La resonancia de plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite la detección de cambios de índice de refracción en las proximidades de la superficie de separación entre un metal y un dieléctrico. La luz que incide en la interfase entre un metal y un dieléctrico provoca la excitación de un plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz (llamado ángulo de resonancia). El evento de bioreconocimiento produce un cambio en el ángulo de resonancia y este cambio es proporcional a la concentración del analito [8].

En la

Figura 11 se puede observar el esquema de un dispositivo de RPS para la lectura de microarrays, donde la luz incidente que proviene de una fuente de luz blanca colimada, pasa a través de un polarizador que genera una luz polarizada. Esta luz polarizada incide en un prisma de alto índice y en la muestra, colocados en un ángulo de incidencia óptimo. Cuando tiene lugar el evento de reconocimiento, la luz reflejada pasa a través de un filtro y se focaliza en una cámara CCD [22].

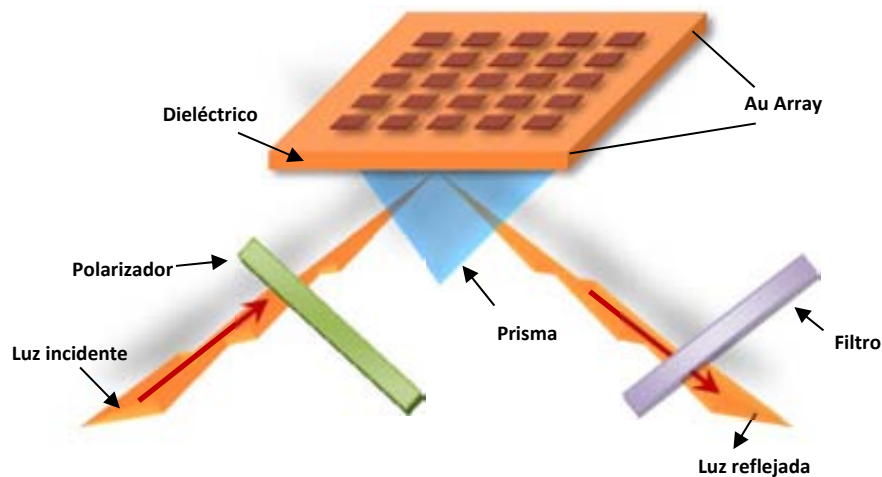


Figura 11: Esquema del principio de resonancia de plasmón superficial.

1.2.2 Sistemas magnéticos

Los sistemas de detección basados en transductores magnetoresistivos utilizan la misma tecnología de los lectores de discos duros, donde los *spin-valves* presentan un efecto magnetoresistivo, es decir, un fenómeno cuántico donde un cambio en el campo magnético local induce un cambio en la resistencia de los discos debido a la dispersión de los *spines*.

MICROARRAY DE SENSORES DE MAGNETORRESISTENCIA GIGANTE (GMR)

GMR cuantifican la unión de biomoléculas de unión específica marcadas magnéticamente a proteínas o cadenas de DNA que se encuentran inmovilizadas en el sustrato. Detectan el campo de dispersión de la marca

magnética para inferir el número de analitos capturado. Tienen la capacidad de detectar y cuantificar la cinética de unión antígeno-anticuerpo o las interacciones proteína-ADN de un ensayo multiplexado con límites de sensibilidad inferiores a los obtenidos mediante métodos de detección óptica [23].

Las partículas magnéticas se han utilizado durante muchos años en bioensayos. Estas se pueden modificar fácilmente con diferentes biomoléculas. Inicialmente estas partículas se utilizaron para separar y concentrar analitos, siendo su uso más común hoy en día la inmovilización de biomoléculas en sustratos para la fabricación de biosensores [24].

1.2.3 Sistemas mecánicos

ARRAY DE MICROCANTILEVERS

Este sistema de lectura es capaz de detectar además del evento de reconocimiento, las fuerzas implicadas en la interacción molecular. Para detectar el analito se inmoviliza la biomolécula de reconocimiento en la superficie de una palanca (cantiléver). Cuando tiene lugar la interacción con el analito se produce una flexión del cantiléver que se puede medir eléctricamente mediante una técnica de lectura piezoresistiva. Las micropalancas también pueden funcionar en el modo de frecuencia de resonancia donde se detecta el cambio de masa debido a la interacción con el analito como en la frecuencia de resonancia de las mismas. Sin embargo, la amortiguación de la frecuencia de resonancia de los líquidos hace que la resolución de este tipo de medias no sea muy buena [25].

SENSORES DE SUPERFICIE DE ONDA ACÚSTICA (SAW)

El principio de funcionamiento de estos sensores se basa en la medición de vibraciones mecánicas que se propagan bajo la superficie de piezoeléctricos sólidos a una frecuencia de resonancia. La velocidad de las SAW es sensible a los cambios en la masa que tienen lugar en la zona activa, a la viscosidad del material aplicado y a la temperatura de la superficie. Un esquema de un sistema basado en el efecto SAW se muestra en la Figura 12.

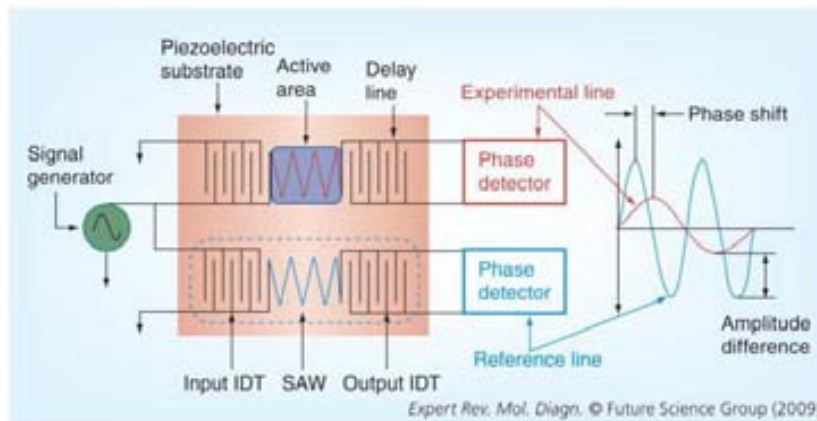


Figura 12: "SAW delay-line"[26]

Se trata de una estructura denominada "SAW delay-line", que incluye dos electrodos interdigitados fabricados sobre un substrato piezoeléctrico. La tensión sinusoidal aplicada a la entrada de los electrodos se traduce en una tensión de oscilación mecánica, formando una onda acústica que se propaga en la superficie del material piezoeléctrico. La onda acústica se convierte de nuevo a la salida de los interdigitados en una tensión sinusoidal con diferente frecuencia y amplitud. El evento de bioreconocimiento que se produce sobre la superficie del sustrato piezoeléctrico puede resultar en un cambio masa detectable por este tipo de dispositivos [26-27].

1.2.4 Sistemas Eléctricos

Tal y como se ha descrito arriba, los microarrays constituyen unas herramientas analíticas muy poderosas pero presentan todavía importantes limitaciones asociadas con la lectura óptica de los mismos. Por ejemplo, los escáneres para lectura óptica son caros y voluminosos[15]. Una alternativa a los sistemas de lectura ópticos, que se viene investigando intensamente en los últimos años, es la lectura eléctrica de los microarrays, normalmente, empleando matrices de transductores amperométricos o conductimétricos que convierten un evento químico asociado con la concentración del analito en una señal eléctrica [28]-[29].

Este tipo de sistemas podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la próxima generación de dispositivos “*Point-of-Care*” para el diagnóstico molecular, ya que permiten su integración con dispositivos microfluídicos y tecnologías de telemetría [30].

La mayoría de los sistemas de lectura eléctricos son de tipo electroquímico, es decir, están basados en el análisis de reacciones electroquímicas que tienen lugar en la interfase entre un electrodo y la disolución de medida. Sin embargo existe un grupo más reducido de sistemas basados en medidas puramente eléctricas, como pueden ser la conductividad o capacidad de una solución. A continuación se describirán algunos ejemplos de sistemas de lectura eléctricos para arrays.

SISTEMAS CONDUCTIMETRICOS (Conductividad eléctrica)

Array basado en estructuras de “Nanogap”

Es un sistema de lectura que detecta cambios de conductividad eléctrica. Este sistema está formado por electrodos de microbandas de oro alineados verticalmente en combinaciones ortogonales (Nanogap), como se puede observar en la Figura 13. Esta estructura se ha empleado para detectar secuencias de DNA. En la parte inferior del Nanogap se inmoviliza una hebra de DNA, y en la parte superior se inmoviliza otra hebra que contiene la secuencia de interés. Cuando se incuba la muestra, tiene lugar la hibridación con las dos hebras, formando un puente, tal y como se ilustra en la Figura 13. Finalmente se realiza una etapa de metalización de la hebra hibridada, la cual produce un la conductividad eléctrica entre los dos electrodos que forman el nanogap, el cual es directamente proporcional a la concentración de la hebra. Los autores de este trabajo lo describen como un sistema simple, rápido y sencillo para la detección de RNA mensajero sin necesidad de amplificación por PCR [31].

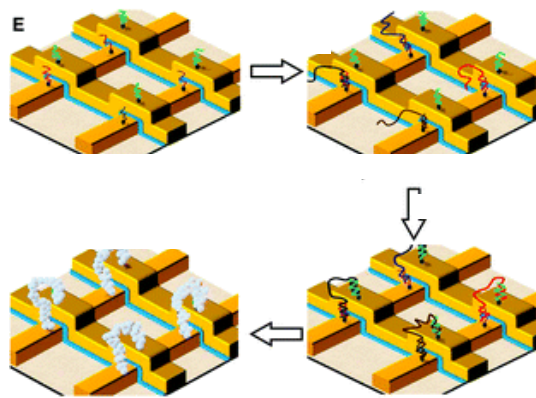


Figura 13: Array de NanoGaps. Ilustración esquemática de los dos pasos de hibridación y el mecanismo de transducción eléctrica [31].

SISTEMAS ELECTROQUÍMICOS

Los sistemas de lectura basados en fluorescencia, a pesar de ser los más estudiados y extendidos, tienen importantes limitaciones, entre las que cabe destacar una instrumentación costosa y de alta precisión, y la necesidad de desarrollar sofisticados algoritmos numéricos para interpretar los datos, lo que hace que su uso se limite a laboratorios de análisis clínico centralizados [32].

Los sistemas electroquímicos requieren de una instrumentación sencilla y barata y no requieren de tratamientos de señal sofisticados, siendo a la vez muy sensibles. La mayoría de ellos se basan en el empleo de marcas electroactivas unidas a biomoléculas, las cuales pueden ser detectadas sobre electrodos sólidos y la señal que generan se relaciona directamente con la concentración del analito. [33]. A continuación se mencionaran algunos ejemplos de sistemas electroquímicos.

ElectraSense™

Este un sistema de detección electroquímica comercial basado en el empleo de una marca enzimática, la peroxidasa de rábano silvestre (HRP, del inglés horseradish peroxidase), la cual cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a la vez que tiene lugar la oxidación de un mediador de transferencia de carga. Como mediador se emplean

moléculas orgánicas pequeñas como la tetrametilbenzidina (TMB). El producto de oxidación de la TMB se puede detectar electroquímicamente. El sistema está constituido por un dispositivo que contiene 12.544 microelectrodos individualmente direccionables, en una matriz de semiconductores. Los electrodos se modifican con el elemento de bioreconocimiento adecuado, donde posteriormente tienen lugar las reacciones biológicas necesarias. Finalmente tiene lugar la detección electroquímica y la corriente generada debido a la electro-reducción del producto de oxidación catalítica del TMB es directamente proporcional a la concentración del analito [34].

Array de Microelectrodos Amperométricos

Este sistema consiste en un microarray de electrodos amperométricos colocados en un sistema fila columna sobre dos sustratos de vidrio. Cada par de electrodos está formado por dos bandas de platino dispuestas ortogonalmente, como se puede observar en la en la

Figura 14. El evento de bioreconocimiento se lleva a cabo en el espacio intermedio entre los electrodos. Este array se ha empleado junto con un bioensayo que emplea la la fosfatasa alcalina como marca enzimática, la cual hidroliza el sustrato 4-aminofenil fosfato para general 4-aminofenol, el cual se oxida selectivamente a un potencial adecuado. La corriente generada en este proceso de oxidación se registra con cada par de electrodos de platino [35].

Basados en un modo de transducción similar, basado en el empleo de fosfatasa alcalina, se ha desarrollado un microarray que incorpora una matriz de electrodos interdigitados y procesos de “redox cycling” para amplificar la corriente de oxidación generado [36]

1.3. Detección Impedimétrica

Es otro sistema de lectura eléctrica, la cual, por la relevancia que tiene para el trabajo presentado en esta Tesis, se describe con más profundidad en este apartado.

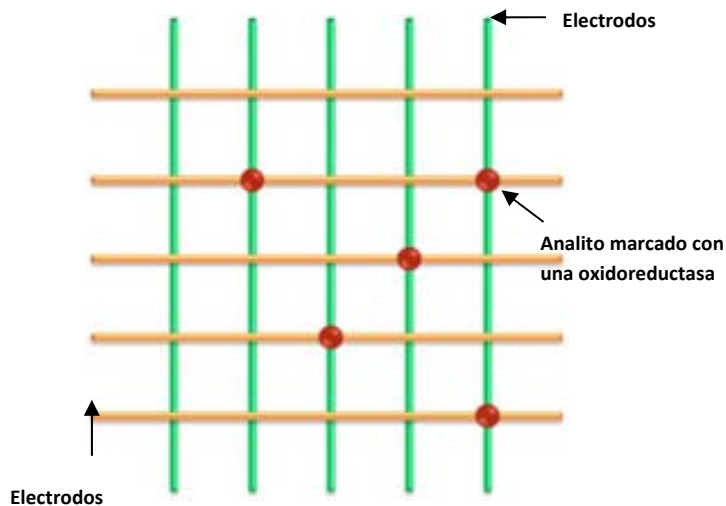


Figura 14 : Array de microelectrodos direccionables. El ensayo se lleva a cabo en los puntos de unión de los electrodos y la marca enzimática utilizada es la fosfatasa alcalina.

La espectroscopía de impedancias se ha aplicado como técnica de detección eléctrica / electroquímica y se basa en la aplicación de una señal eléctrica periódica de pequeña amplitud, ya sea tensión o corriente, y la medida de la corriente o la tensión alterna correspondiente, respectivamente. .

A pesar de ser un sistema muy sensible e informativo, la difícil interpretación de los datos de impedancia ha limitado durante años su expansión. A diferencia de los métodos electroquímicos convencionales que suministran directamente la información relevante del sistema, los datos obtenidos de los sistemas impedimétricos son más difíciles de interpretar. El análisis de los datos por lo general implica el uso de complejas expresiones matemáticas que modelan los procesos físico-químicos que ocurren en el sistema. El desarrollo de software simple y comercial para el análisis de los datos ha favorecido la implementación de este método. Por lo tanto, el interés en la espectroscopia de impedancia se ha incrementado de manera exponencial, llegando a ser extremadamente popular en la investigación y ciencias aplicadas. En la actualidad, la importancia de esta técnica emergente en la ciencia es muy alta y el número de publicaciones relacionadas con este tipo de detección se incrementa anualmente.

A continuación, se explicarán algunos conceptos que ayudan a la interpretación de los datos y el empleo de parámetros eléctricos extraídos de los espectros de impedancias como señales analíticas en microarrays.

1.3.1 Espectroscopia de Impedancias

Como se ha indicado más arriba, se basa en la perturbación del sistema con un impulso eléctrico (corriente o potencial) y el estudio de la respuesta obtenida (potencial o corriente, respectivamente). La dependencia entre la perturbación aplicada y la respuesta generada puede suministrar información cinética y termodinámica del experimento. En la espectroscopia de impedancias, se utilizan tres tipos de estímulos eléctricos:

1. Tensión de paso, donde se aplica una tensión [$V(t) = V_0$ para $t > 0$, $V(t) = 0$ para $t < 0$], y se mide la corriente resultante, la cual varía en función del tiempo $i(t)$.
2. Ruido aleatorio (blanco) de tensión, donde se aplica una señal $v(t)$ compuesta por ruido aleatorio y se mide la corriente resultante. Para este caso los resultados se analizan en el dominio de la frecuencia por medio de un análisis de transformada de Fourier, que permite la obtención de la impedancia.
3. Frecuencia única de tensión o corriente, donde se mide la impedancia directamente en el dominio de la frecuencia aplicando una tensión a una frecuencia determinada y midiendo el cambio de fase y la amplitud de la corriente resultante a esta frecuencia.

A continuación se evaluará la perturbación mediante un potencial sinusoidal (v , en V) de amplitud pequeña (V , en V) oscilando a un potencial fijo (Corriente Directa (DC), en V) con una frecuencia angular ($\omega=2\pi f$, donde f es la frecuencia en Hz).

$$v = V \sin(\omega t) \tag{1}$$

En los sistemas electroquímicos, la respuesta del sistema por lo general sigue la naturaleza de la señal de excitación, por lo tanto, una señal

sinusoidal de tensión genera una respuesta sinusoidal de corriente (i , en A), pero con diferente amplitud (I , en A) y diferente fase ($\omega t + \phi$, donde ϕ es el ángulo de fase, en radianes):

$$i = I \sin(\omega t + \phi) \quad (2)$$

Por definición, la resistencia (R en Ω) de un elemento es la oposición de este elemento al flujo de corriente eléctrica. Consecuentemente, la impedancia ($Z(\omega)$, in Ω) puede ser entendida como la resistencia de los sistemas complejos, donde, en lugar de corriente directa, se aplica corriente alterna. De hecho, la impedancia es un concepto más general que la resistencia ya que toma en cuenta la diferencia de fase entre la tensión y la corriente. Teniendo en cuenta la señal de excitación y la respuesta definidas en las ecuaciones (1) y (2), la ley de Ohm define la impedancia como:

$$Z(\omega) = \frac{v}{i} = \frac{V \sin(\omega t)}{I \sin(\omega t + \phi)} = Z \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (3)$$

Con el fin de facilitar la representación y la interpretación de datos, la expresión de impedancia generalmente se simplifica usando la notación de los números complejos.

$$Z(\omega) = Z \frac{e^{j\omega t}}{e^{j(\omega t - \phi)}} = Z e^{j\phi} \quad (4)$$

$$e^{j\phi} = \cos \phi + j \sin \phi \quad (5)$$

$$Z(\omega) = Z (\cos \phi + j \sin \phi) = Z_{re}(\omega) + Z_{im}(\omega) \quad (6)$$

donde $j = \sqrt{-1}$.

En general la impedancia cambia con la frecuencia, salvo los sistemas puramente resistivos. Por eso, en este tipo de medidas se suele hacer una representación generando el espectro de impedancia, que se define como la impedancia medida en un rango de frecuencias determinado [37].

Las dos formas más comunes de graficar el espectro de impedancias son:

El diagrama de Nyquist (Figura 15), que se obtiene al representar la parte real de la impedancia frente a la parte imaginaria. La parte real se

representa en el eje de abscisas y en el eje de ordenadas generalmente se representa la parte imaginaria cambiada de signo.

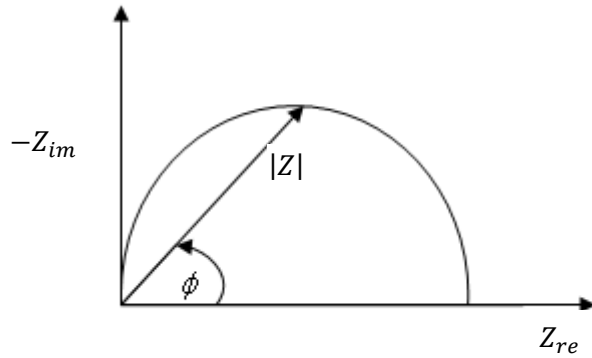


Figura 15. Diagrama de Nyquist

En el diagrama de Nyquist, la impedancia se puede representar como un vector de magnitud $|Z|$. El ángulo entre este vector y el eje X, es la fase ϕ .

La segunda forma de representar el espectro de impedancias es el diagrama de Bode (Figura 16). En realidad son dos gráficas, una es logaritmo de $|Z|$ frente al logaritmo de la frecuencia y la otra es ϕ frente logaritmo de la frecuencia.

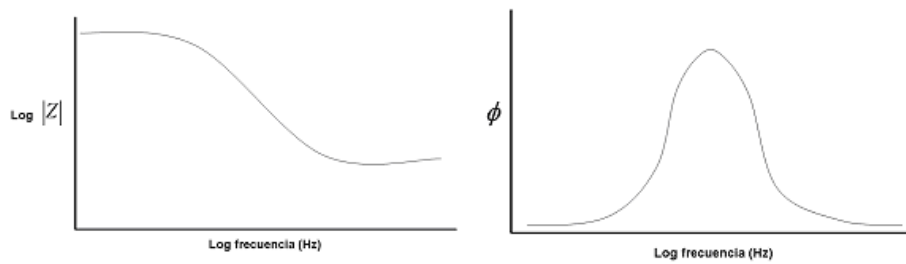


Figura 16. Diagrama de Bode usado en espectroscopia de impedancias [38].

Una vez realizado el espectro de impedancias, una forma útil para interpretar los resultados es realizar el ajuste de los datos a un circuito eléctrico equivalente formado por componentes eléctricos discretos, como resistores, capacitores e inductores.

Los circuitos eléctricos equivalentes suelen ser representaciones ideales del sistema que se está midiendo. Para un resistor ideal la impedancia no depende de la frecuencia a la que se realiza la medida y la corriente está en fase con la tensión de entrada. Para un capacitor ideal la corriente está desfasada 90° con la tensión de entrada. Así, para un resistor la impedancia sólo tiene componente real, mientras que para un capacitor esta sólo consta de la componente imaginaria:

Resistor ideal	Capacitor ideal
$\phi = 0$	$\phi = 90^\circ$
$ Z = Z_{re}$	$ Z = Z_{im}$
$Z_{re} = Z$	$Z_{re} = 0$
$Z_{im} = 0$	$Z_{im} = Z$

En la Figura 17 y Figura 18 se muestra, como ejemplo, el espectro de impedancias de un circuito eléctrico ideal correspondiente a una resistencia de 1 K Ω en paralelo con un capacitor de 1 nF.

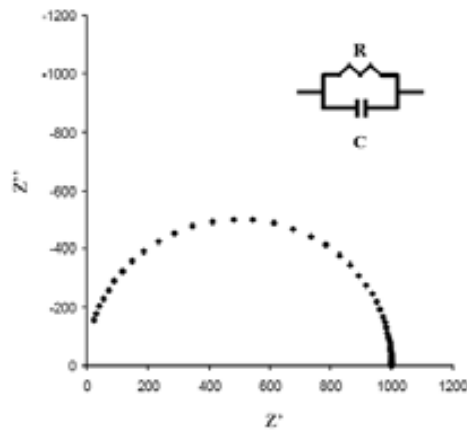


Figura 17. Gráfica de Nyquist para el espectro de impedancia de un resistor en paralelo con un capacitor

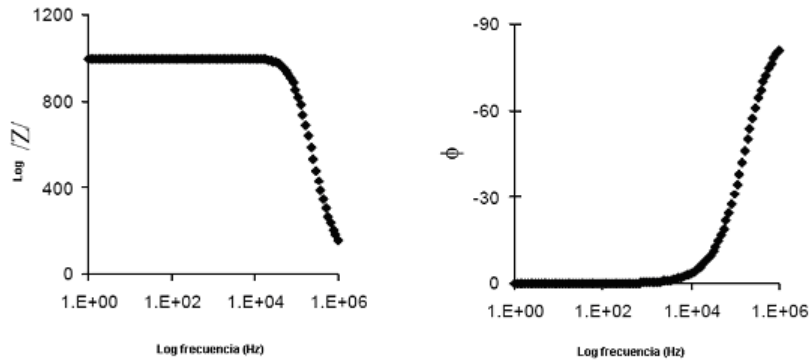


Figura 18. Diagrama de Bode para el espectro de impedancia de un resistor en paralelo con un capacitor

Como se puede observar en los diagramas de Bode de la Figura 18, para las altas frecuencias el circuito RC paralelo se comporta como una capacidad, con una pendiente negativa típica de 10 dB por década. A frecuencias bajas la impedancia del circuito se vuelve independiente de la frecuencia, tomando el valor de la resistencia $|Z| = R$ y $\phi = 0$. De la misma manera, en el diagrama de Nyquist se observa como para bajas frecuencias la impedancia solo tiene componente real cuyo valor es $1\text{K}\Omega$. Para frecuencias intermedias (cercasas a $\frac{1}{2\pi RC}$) la representación de la impedancia del circuito RC en este diagrama (Figura 17) toma la forma de un semicírculo que empieza en el eje de las abscisas ($Z_{re} = R$ y $Z_{im} = 0$) y acaba en el origen para frecuencias mas elevadas.

El comportamiento de los sistemas eléctricos analíticos habituales no siempre se puede representar con circuitos equivalentes formados por resistores y capacitores ideales. Dichos circuitos equivalentes intentan representar con componentes discretos el comportamiento de resistencias y capacidades distribuidas en el espacio. Sin embargo, cuando las constantes de tiempo ($\frac{1}{RC}$) no son exactamente iguales en todas las partes del sistema, por ejemplo debido a la existencia de rugosidad en los electrodos, el comportamiento resultante es el de un elemento con fase constante, la cual no es ni 0° (resistencia) ni 90°

(capacidad). En estos casos los elementos de fase constante (CPE) proveen una representación más exacta del comportamiento del sistema. La impedancia eléctrica de un elemento de fase constante se expresa como (7)

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q_0(\omega i)^n} = \frac{1}{Q_0(\omega)^n} e^{-\frac{\pi}{2}ni}$$

(7)

Donde Q_0 es la admitancia $Q_0 = \frac{1}{|Z|}$ con $\omega = 1$ rad/s

La fase de la impedancia de un CPE es independiente de la frecuencia según esta expresión y tiene un valor de $-(90n)^\circ$, con n de 0 a 1. Cuando $n = 1$, se comporta como un capacitor ideal donde $Q_0 =$ capacidad. Cuando $n = 0$, se comporta como un resistor puro.

Una vez obtenido el espectro de impedancias para un sistema determinado, se debe hacer un análisis que consiste en ajustar el espectro de impedancias obtenido experimentalmente al espectro de impedancias de un circuito equivalente.

Para que la información obtenida pueda ser útil, los elementos del circuito deben tener una explicación física. El circuito se construye teniendo en cuenta todas las partes del sistema donde fluye corriente. Por ejemplo, cuando se sumergen dos electrodos en una solución electrolítica, la corriente que fluye entre ellos se debe a la movilidad de especies iónicas. De esta manera la solución se comporta como un resistor, en el cual, la resistencia depende de la cantidad de iones presentes en la solución.

La importancia de dar un significado físico al circuito equivalente radica en que un espectro de impedancias se puede ajustar a diversos circuitos equivalentes lo que conlleva a interpretaciones erradas de los datos experimentales. Idealmente se debería asegurar que cada elemento del circuito corresponda a una magnitud física asignada [39-41].

1.3.2 Medidas de Impedancia con electrodos interdigitados

En la Figura 19 se muestra la configuración básica de un sistema de electrodos interdigitados (IDEs, del inglés interdigitated electrodes). Consta de dos electrodos de polaridad inversa, cada uno de los cuales está formado por varios dedos intercalados entre sí, de manera que se crea un campo eléctrico entre ambos.

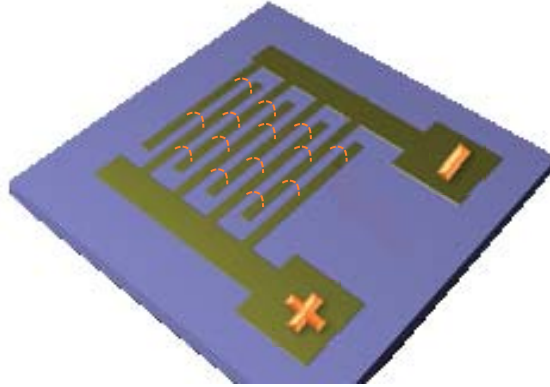


Figura 19. Estructura básica de los electrodos interdigitados. La presencia de especies iónicas en una solución en contacto con los mismos permite que la corriente fluya entre ellos [42].

La **Figura 20** muestra el espectro de impedancias típico de un par de IDEs sumergidos en una disolución donde no existen moléculas electroactivas (no se producen procesos de transferencia de carga). Este espectro se puede asociar a un circuito equivalente simple representado en la **Figura 21**, donde el elemento de fase constante (CPE_{dl}) corresponde a la capacidad de doble capa y la resistencia (R_s) y el capacitor (C_s) están relacionadas con la conductividad y la permitividad de la solución, respectivamente. La capacidad de la doble capa surge del hecho de que hay dos materiales conductores (la solución y los electrodos) que no intercambian cargas entre ellos y se comportan como placas paralelas. El hecho de que esta capacidad se vea como un elemento de fase constante está asociado a la rugosidad de la superficie de los electrodos, como se apuntaba anteriormente. En estas graficas se puede observar que la parte plana de las curvas esta dominada por la conductividad de la solución. La medición de la parte real de la impedancia en una sola frecuencia en esta región deben dar valores directamente proporcionales a la resistencia de la solución entre los electrodos e inversamente proporcionales a su conductividad.

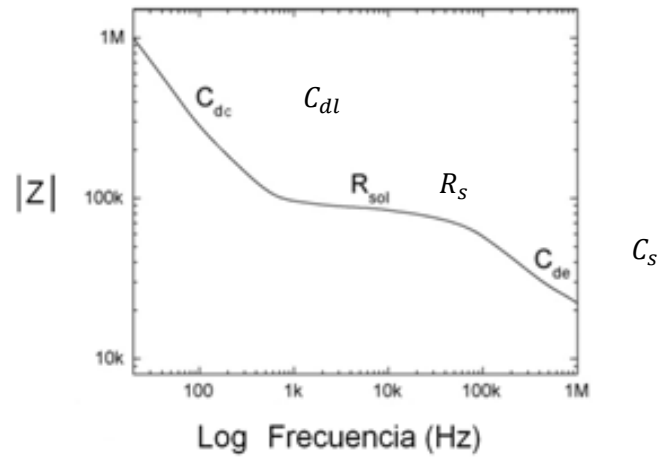


Figura 20. Gráfica de Bode del espectro de impedancias correspondiente a la medida de un IDE inmerso en una solución de KCl. Se muestran 3 regiones que tienen su correspondencia en el circuito equivalente. (C_{dl}) capacidad de doble capa de los electrodos, (R_s) resistencia de la solución y (C_s) la capacidad dieléctrica de la solución [43].

El circuito equivalente que mejor se adapta al comportamiento de este sistema de electrodos cuando se sumerge en una disolución electrolítica se encuentra descrito en la literatura [43], y se puede observar en la Figura 21.

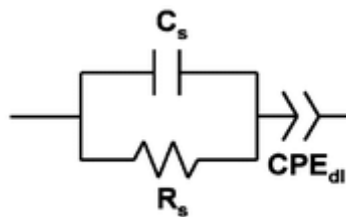


Figura 21. Modelo del circuito equivalente.

Como se aprecia, este sistema es muy versátil y permite realizar tanto medidas en la interfase electrodos disolución (C_{dl}) como medidas de la solución (R_s y C_s).

MEDIDAS EN LA INTERFASE

Las medidas realizadas en la interface se pueden hacer de dos maneras: midiendo a bajas frecuencias para obtener la capacidad de la doble capa o midiendo la transferencia electrónica entre los electrodos.

Medidas de la capacidad de la doble capa

Estas medidas se realizan para evaluar un evento de bioreconocimiento, que tiene lugar sobre los electrodos. La interacción del analito con la biomolécula de bioreconocimiento hace que cambie el área activa de los electrodos, lo que da lugar a un cambio en la capacidad de doble capa. La capacidad de doble capa de los electrodos es muy sensible a cualquier partícula que se deposite sobre ellos. Esta característica es aprovechada para hacer medidas en tiempo real de la concentración de analito y el tiempo de interacción. Sin embargo, también adolece de una importante limitación, como son las adsorciones inespecíficas, las cuales provocarían cambios en la señal analítica registrada, no debidos a la detección del analito.

Se ha empleado este tipo de medidas para detectar bacterias, inmovilizando anticuerpos específicos en la superficie de un transductor adecuado. Las bacterias cargadas, al interactuar con los anticuerpos modifican las propiedades dieléctricas de los electrodos y producen un cambio en la capacidad de la doble capa medida [44].

Medidas de la transferencia de carga

En este caso la medida de impedancia se realiza en un medio que contiene alguna especie electroactiva. En este caso, la interacción del analito con la biomolécula de reconocimiento, inmovilizada sobre la superficie del transductor, produce un cambio en la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) de la especie electroactiva en la interfase, la cual es directamente proporcional a la concentración del analito. Como ejemplo, se ha reportado un sistema para detectar secuencias en cadenas de ADN, en el cual la primera hebra que se inmoviliza sobre electrodos de oro. Cuando tiene lugar la hibridación con la hebra complementaria se produce un aumento en la R_{ct} , que es medido [45].

MEDIDAS EN EL VOLUMEN DE LA SOLUCION

Las medidas realizadas en el volumen de la solución se pueden hacer de dos maneras: midiendo la parte real de la zona plana en el diagrama de Bode, donde se obtiene la información de la resistencia de la solución, o midiendo la parte imaginaria de la cola que aparece a frecuencias más altas, que da información sobre la capacidad de la solución. Estas son medidas mucho más robustas que la realizadas en la interfase electrodo disolución ya que no se ven afectadas por procesos de adsorción no específicos sobre la superficie del electrodo.

Medidas de la capacidad de la solución

Este tipo de medidas es útil para monitorizar la interacción de partículas que se inmovilizan sobre la superficie de electrodos interdigitados a través de una interacción biológica específica, como pueden ser células.

Un ejemplo es la detección impedimétrica de bacterias, donde se inmovilizan anticuerpos específicos para la bacteria sobre la superficie del transductor. La bacteria se puede considerar como una partícula dieléctrica a unas determinadas frecuencias de trabajo. Cuando se une a los anticuerpos, provoca una perturbación en la distribución de las líneas de campo eléctrico, que se traduce en un cambio aparente en la capacidad de la solución [46]. Jugando con la penetración del campo eléctrico (la geometría de los IDEs) se pueden conseguir medidas sensibles. Una de las principales ventajas de este tipo de medidas es que no requieren del uso de marcas.

Medidas de la resistencia de la solución

Las medidas en la resistencia de la solución se pueden llevar a cabo cuando tiene lugar un aumento o disminución de especies iónicas en la misma, el cual se puede relacionar con la concentración del analito. En muchos casos, dicho cambio tiene lugar mediante el empleo de reactivos marcados con enzimas, los cuales, cuando tiene lugar la reacción enzimática correspondiente producen especies iónicas. Este tipo de medidas se ha aplicado en el desarrollo de un sistema para medir secuencias específicas de DNA [47].

Referencias

- [1] Chen, G.Y., et al., Array-Based Technologies and their Applications in Proteomics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003. 3(6): p. 705-724.
- [2] BRENNAN, D.J., et al., Contribution of DNA and Tissue Microarray Technology to the Identification and Validation of Biomarkers and Personalised Medicine in Breast Cancer. *Cancer Genomics - Proteomics*, 2007. 4(3): p. 121-134.
- [3] Wilhelm J, A., Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 2009. 25(4): p. 195-203.
- [4] Hartmann, M., et al., Protein microarrays for diagnostic assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. 393(5): p. 1407-1416.
- [5] Sobek, J., et al., Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2006. 9(5): p. 365-380.
- [6] Sassolas, A., B.D. Leca-Bouvier, and L.J. Blum, DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews*, 2007. 108(1): p. 109-139.
- [7] Satoshi, N., Profiling cancer stem cells using protein array technology. *European Journal of Cancer*, 2006. 42(9): p. 1273-1282.
- [8] Rusling, J.F., et al., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst*, 2010. 135(10): p. 2496-2511.
- [9] J.M, L., Microarrays: Molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (I). *Allergologia et Immunopathologia*. 38(3): p. 153-161.
- [10] Khnouf, R., et al., Cell-Free Expression of Soluble and Membrane Proteins in an Array Device for Drug Screening. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(16): p. 7021-7026.
- [11] Stoughton, R.B., APPLICATIONS OF DNA MICROARRAYS IN BIOLOGY. *Annual Review of Biochemistry*, 2005. 74(1): p. 53-82.
- [12] Jain, K.K., Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2005. 6(9): p. 1463-1476.
- [13] Baeumner, A.J., Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. 377(3): p. 434-445.
- [14] Abbas, A.K. and C.A. Janeway Jr, Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*, 2000. 100(1): p. 129-138.
- [15] Giljohann, D.A. and C.A. Mirkin, Drivers of biodiagnostic development. *Nature*, 2009. 462(7272): p. 461-464.
- [16] Johnsson, N. and K. Johnsson, Chemical Tools for Biomolecular Imaging. *ACS Chemical Biology*, 2007. 2(1): p. 31-38.

- [17] White, N.S. and R.J. Errington, Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. 57(1): p. 17-42.
- [18] Conchello, J.A. and J.W. Lichtman, Optical sectioning microscopy. *Nature Methods*, 2005. 2(12): p. 920-931.
- [19] Porakishvili, N., et al., A low budget luminometer for sensitive chemiluminescent immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 2000. 234(1-2): p. 35-42.
- [20] Alexandre, I., et al., Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, 2001. 295(1): p. 1-8.
- [21] Aguilar, M.R., et al., Modulation of proteins adsorption onto the surface of chitosan complexed with anionic copolymers. Real time analysis by surface plasmon resonance. *Macromolecular Bioscience*, 2004. 4(7): p. 631-638.
- [22] Lee, H.J., A.W. Wark, and R.M. Corn, Creating Advanced Multifunctional Biosensors with Surface Enzymatic Transformations. *Langmuir*, 2006. 22(12): p. 5241-5250.
- [23] Gaster, R.S., et al., Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays. *Nat Nano*, 2011. 6(5): p. 314-320.
- [24] Baselt, D.R., et al., A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998. 13(7-8): p. 731-739.
- [25] Boisen, A. and T. Thundat, Design & fabrication of cantilever array biosensors. *Materials Today*, 2009. 12(9): p. 32-38.
- [26] Arruda, D.L., et al., Microelectrical sensors as emerging platforms for protein biomarker detection in point-of-care diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2009. 9(7): p. 749-755.
- [27] Mitsakakis, K. and E. Gizeli, Multi-sample acoustic biosensing microsystem for protein interaction analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 26(11): p. 4579-4584.
- [28] Marchand, G., et al., Electrical Detection of DNA Hybridization Based on Enzymatic Accumulation Confined in Nanodroplets. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(16): p. 5189-5195.
- [29] Roth, K.M., et al., Electrochemical Detection of Short DNA Oligomer Hybridization Using the CombiMatrix ElectraSense Microarray Reader. *Electroanalysis*, 2006. 18(19-20): p. 1982-1988.
- [30] Zheng, G., et al., Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology*, 2005. 23(10): p. 1294-1301.
- [31] Chen, X., et al., Electrical Sensor Array for Polymerase Chain Reaction-Free Messenger RNA Expression Profiling. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(14): p. 5958-5964.
- [32] Drummond, T.G., M.G. Hill, and J.K. Barton, Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotech*, 2003. 21(10): p. 1192-1199.

- [33] Sadik, O.A., A.O. Aluoch, and A. Zhou, Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. 24(9): p. 2749-2765.
- [34] Ghindilis, A.L., et al., CombiMatrix oligonucleotide arrays: Genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. 22(9-10): p. 1853-1860.
- [35] Lin, Z., et al., An Addressable Microelectrode Array for Electrochemical Detection. *Analytical Chemistry*, 2008. 80(17): p. 6830-6833.
- [36] Nebling, E., et al., Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays. *Analytical Chemistry*, 2003. 76(3): p. 689-696.
- [37] Muñoz-Berbel, X., et al., Impedance-Based Biosensors for Pathogen Detection Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, M. Zourob, S. Elwary, and A. Turner, Editors. 2008, Springer New York. p. 341-376.
- [38] Lillie, G., P. Payne, and P. Vadgama, Electrochemical impedance spectroscopy as a platform for reagentless bioaffinity sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. 78(1-3): p. 249-256.
- [39] Barsoukov, E. and J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications (Hardcover)*. Second Edition ed. 2005: John Wiley & Sons, Inc. 616.
- [40] Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. 2001: John Wiley & Sons. 856.
- [41] MacDonal, J.R., *Impedance spectroscopy*. 1987.
- [42] Van Gerwen, P., et al., Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1998. 49(1-2): p. 73-80.
- [43] Zou, Z., et al., Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2007. 136(2): p. 518-526.
- [44] Muñoz-Berbel, X., et al., Impedimetric characterization of the changes produced in the electrode-solution interface by bacterial attachment. *Electrochemistry Communications*, 2007. 9(11): p. 2654-2660.
- [45] Witte, C. and F. Lisdat, Direct Detection of DNA and DNA-Ligand Interaction by Impedance Spectroscopy. *Electroanalysis*, 2011. 23(2): p. 339-346.
- [46] de la Rica, R., et al., Selective Detection of Live Pathogens via Surface-Confined Electric Field Perturbation on Interdigitated Silicon Transducers. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(10): p. 3830-3835.
- [47] Berdat, D., et al., DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006. 118(1-2): p. 53-59.

CAPITULO II

El objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral es el desarrollo de un sistema de lectura eléctrico para bioarrays que combine las ventajas de los sistemas de lectura fluorescente basados en el empleo de escáneres y comúnmente empleados en laboratorios de análisis, con las de los sistemas eléctricos reportados y comercializados hasta la fecha. Entre las ventajas de los primeros se destaca su sensibilidad y el empleo de sustratos de vidrio muy baratos para la realización del bioarray. Su desventaja principal es el elevado coste de la instrumentación requerida así como su tamaño que impide su uso fuera de laboratorios centralizados. Los sistemas eléctricos requieren de una instrumentación compacta y barata, pero sin embargo, los bioarrays se realizan sobre sustratos donde se han fabricado previamente los transductores eléctricos requeridos para su lectura. Teniendo en cuenta que estos sustratos son de un único uso, el coste por análisis se encarece significativamente.

Teniendo en cuenta estas características, se propone el desarrollo de un sistema de lectura de bioarrays basados en un array de transductores impedimétricos, así como la instrumentación asociada necesaria para la lectura simultánea de todos los puntos del bioarray. El sistema deber permitir la lectura de bioarrays realizados sobre sustratos de vidrio convencionales utilizando igualmente una instrumentación compacta y barata, sin que todo ello limite la sensibilidad de la lectura.

De esta forma se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollo de una matriz de transductores impedimétricos compuestos por dos electrodos interdigitados, que permitan la medida de las propiedades eléctricas de una disolución. En este caso, se ha pensado en realizar medidas de cambios de conductividad de la disolución que se puedan asociar a la concentración de las sustancias que se quieren medir en el bioarray.

2. Diseño y fabricación de una instrumentación con la cual realizar la lectura conductimétrica del bioarray. Se diseñará y fabricará el circuito de medida necesario, al igual que el programa necesario para el control de la misma, empleando Labview.
3. Automatización de la medida con el sistema de lectura desarrollado empleando componentes microfluídicos diseñados y fabricados para facilitar la lectura de un bioarray y la limpieza posterior del sistema y, de esta forma, minimizar la intervención del usuario en el mismo.

CAPÍTULO III

LECTURA ELECTRICA DE MICROARRAYS DE PROTEINAS REALIZADOS EN PORTAOBJETOS DE VIDRIO

En este capítulo se describe el desarrollo inicial realizado para la fabricación de un sistema de lectura eléctrica de microarrays de proteínas basado en un array de electrodos interdigitados de oro y media de cambios en la conductividad de la solución empleando la ureasa como marca enzimática.

3.1 Resumen

En este trabajo se presenta un nuevo enfoque para la lectura eléctrica de microarrays preparados en portaobjetos de vidrio convencionales, utilizando una matriz de transductores impedimétricos (electrodos interdigitados, IDE). La detección de la impedancia se basa en el uso de un formato de inmunoensayo marcado ureasa. La ureasa es capaz de producir un aumento en la conductividad por la hidrólisis del sustrato de urea, que se mide a través de un IDE y está directamente relacionado con la cantidad de analito. A diferencia de sistemas anteriores para lectura eléctrica de microarrays, el ensayo no tiene lugar sobre los transductores, y se realiza sobre portaobjetos de vidrio convencionales, lo que podría permitir el desarrollo de sistemas de análisis multiplexado compactos con un menor coste por ensayo. Sobre cada transductor de la matriz se deposita una gota de solución del sustrato enzimático. El microarray se coloca a una distancia corta (300 micras) de manera que cada gota moja un transductor y un punto del microarray al mismo tiempo. Este procedimiento permite la reutilización de la matriz de transductores para la lectura de un número virtualmente ilimitado de microarrays. Con el fin de evaluar este concepto de lectura eléctrica, se fabricó un microarray basado en un inmunoensayo para la detección de una proteína genérica ratón en un rango de concentraciones de 0,03 a 30 mg mL⁻¹. Se obtuvo una respuesta sigmoideal con un límite de detección de 0,1 mg mL⁻¹ y un rango dinámico de 1 orden de magnitud. También se realizó estudio comparativo con dos procedimientos analíticos tradicionales. En primer lugar, el inmunoensayo marcado con ureasa se puso a prueba en una placa de 96 pocillos (tipo ELISA) usando el indicador de pH rojo fenol,

con detección de absorbancia. En segundo lugar, el microarray se llevó a cabo utilizando el mismo intervalo de concentraciones de analito, marcado con la molécula fluorescente Cy3, con detección de fluorescencia. Ambos ensayos permitieron la validación de los resultados del sistema de lectura eléctrica presentado.

3.2 Introducción

Las plataformas de microarrays con diferentes componentes biológicos (DNA, proteínas, anticuerpos, péptidos, carbohidratos, células o tejidos) están empezando a desarrollarse y comercializarse como una poderosa herramienta analítica de alto rendimiento para aplicaciones en genómica[1], proteómica[2], descubrimiento de drogas[3], o diagnóstico clínico[4]. Generalmente, la concentración de analito en cada punto del array se mide empleando marcas unidas a una de las moléculas involucradas en el evento de bioreconocimiento.

El sistema de lectura de los microarrays está, por lo tanto, adaptado para detectar (y algunas veces cuantificar) el tipo de marca usado en el ensayo. Las marcas usadas más frecuentemente generan fluorescencia[5], quimioluminiscencia[6], o señales colorimétricas[7], las cuales son detectadas por equipos ópticos más o menos voluminosos y costosos, tal y como se ha descrito en la introducción general de este trabajo. Recientemente, los sistemas basados en la lectura eléctrica han sido también propuestos como una alternativa que podría dar lugar a equipos más baratos y compactos para aplicaciones como el diagnóstico tipo "Point-of-care" (PoC)[8] o estudios descentralizados de monitorización de biomarcadores[9]. Estos sistemas de microarrays también podrían ser ventajosos en aplicaciones donde actualmente se emplean sistemas analíticos tradicionales, como por ejemplo, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) realizado en placas, de tal forma que se consiga una reducción en el tiempo de ensayo y volumen de reactivos[10].

La lectura eléctrica de microarrays se basa en el empleo un array de transductores (dos o más electrodos por cada punto del array), cada uno de los cuales detectan la concentración de un analito en un punto del microarray a través de una marca adecuada y la traduce en una señal eléctrica de tipo corriente o impedimétrica. Por ejemplo, se ha registrado la variación de la conductancia entre dos electrodos interdigitados (IDEs)

después de un evento de hibridación de ADN empleando como marca nanopartículas de oro y una posterior amplificación mediante reducción de plata sobre dichas nanopartículas[11]. En otro sistema conductimétrico se midió el cambio de resistencia al generar puentes de plata en nanogaps entre dos electrodos una vez que había tenido lugar la hibridación de hebras de RNA[12]. Los eventos de bioreconocimiento en microarrays también se han detectado mediante corrientes faradaicas registradas a través de marcas electroactivas[13] o marcas enzimáticas que generan productos electroactivos[14-16]. Todas estas plataformas de microarrays eléctricos son realmente arrays de biosensores, ya que los elementos de bioreconocimiento se encuentran inmovilizados sobre la superficie de los transductores[17,18]. En estos casos, los sustratos donde se realizan los microarrays son los mismos que contienen el array de transductores, lo que implica un procesamiento de los mismos en salas blancas. Teniendo en cuenta que los microarrays son normalmente de un único uso, su fabricación implica un aumento de su coste y, por lo tanto, en el coste por ensayo, lo cual puede impedir su aplicación generalizada.

En este trabajo, se presentan los resultados iniciales que demuestran un nuevo concepto de sistema de lectura eléctrico de microarrays. Se ha desarrollado un array de transductores impedimétricos de oro sobre un sustrato de vidrio, con la particularidad de que este sustrato es diferente al sustrato donde se realiza el microarray. Esta configuración permite la lectura de un número virtualmente infinito de microarrays realizados sobre sustratos de vidrio bajo coste, comúnmente empleados para su realización, de una manera similar a los sistemas de lectura ópticos, pero con la ventaja añadida de ser más compacto y rentable. Una descripción detallada del mismo se muestra a continuación.

3.3 Sección Experimental

3.3.1 Principio del sistema de lectura eléctrica:

El microarray de proteínas, preparado en un portaobjetos de vidrio, se alinea en la parte superior del array de transductores con la ayuda de cinco estructuras de alineamiento (Figura 3.1) de manera que la posición de cada spot del microarray coincide con la posición de cada transductor del lector. En el momento de posicionar el microarray, cada transductor está cubierto con una gota de solución de medida. El microarray se apoya en dos soportes que lo mantienen fijo a 300 μm de separación del array

de transductores. Una vez posicionado el microarray, cada gota moja un transductor y un punto del microarray. Esta gota de solución contiene un sustrato enzimático para la marca empleada en el desarrollo del microarray, la cual permite llevar a cabo la lectura conductimétrica del mismo (Figura 3.2).

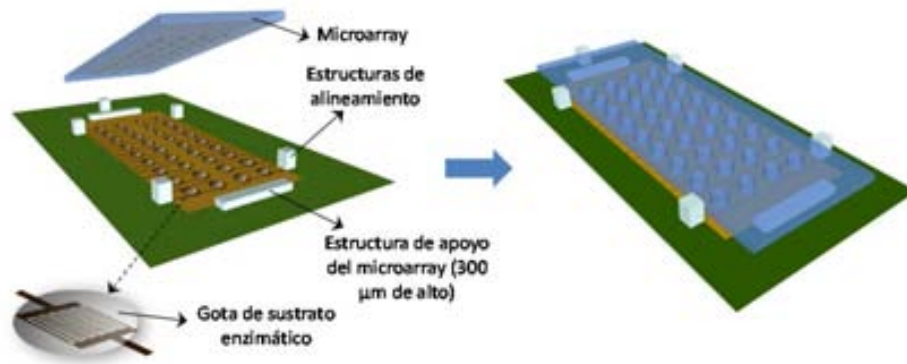


Figura 3.1. Sistema de lectura eléctrica de microarrays preparados en portaobjetos de vidrio, utilizando transductores impedimétricos con electrodos interdigitados, (IDE).

Este concepto general se ha puesto en práctica empleando ureasa como marca enzimática[19]. La ureasa cataliza la hidrólisis de urea para generar bicarbonato y amonio en solución, especies que aumentan la conductividad eléctrica de la misma a la vez que aumentan su pH. El lector contiene pares de electrodos interdigitados (IDEs), con los cuales medir dicho cambio de conductividad. Concretamente, convierten el aumento de la conductividad en un aumento de la conductancia, a una frecuencia determinada.

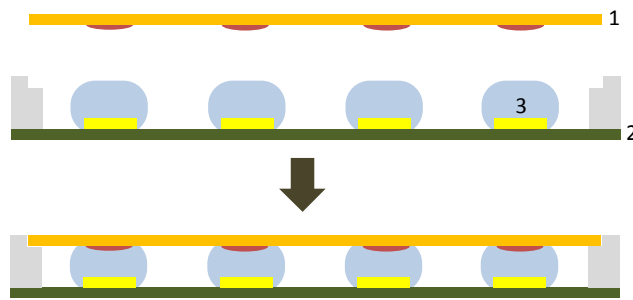


Figura 3.2. Esquema del corte transversal del sistema de lectura de microarrays (1, spots en rojo), array de transductores (2, IDEs en amarillo, estructuras de alineamiento en gris) y gotas de urea (3) para realizar la lectura eléctrica.

La ureasa es un marcador enzimático que ofrece varias ventajas sobre otras marcas más comunes como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina[20]. Es un enzima estable que muestra una actividad más elevada que los marcadores enzimáticos mencionadas anteriormente, cuando trabaja en condiciones optimas de pH y temperatura. Asimismo la solución de sustrato de urea es estable por largos periodos de tiempo y es inocua para el usuario y el medio ambiente.

3.3.2 Diseño y Fabricación del Array de Transductores

El array de transductores consta de 36 pares de electrodos interdigitados de oro (IDE). Cada par de IDEs tiene 13 dedos (siete en un electrodo y seis en el otro) de 20 μm de ancho, separados 20 μm y con una longitud de 500 μm . Los IDE están distribuidos en una matriz rectangular de 4 x 9 elementos y están separados 6 mm en vertical y en horizontal como lo muestra la Figura 3.3. El dispositivo se fabricó mediante procesos de fotolitografía estándar dentro de la sala blanca del Instituto de Microelectrónica de Barcelona.

La tecnología de Sala Blanca del IMB, permite trabajar con obleas de Silicio o vidrio tipo Pyrex.

La fabricación de la matriz que contiene los IDEs se realizó a partir de obleas de vidrio tipo Pyrex de 100 mm de diámetro. En cada una de las

obleas se fabricaron dos arrays de IDEs, cada uno de los cuales ocupa un área de 29 mm de ancho x 54 mm de longitud.

Se eligió el Pyrex en lugar del silicio para eliminar la capacidad parásita que aparece entre los electrodos a través del sustrato. Las dimensiones de la matriz de IDEs exigían pistas lo suficientemente anchas y largas para poder llevar la señal a la PCB con una baja resistencia serie. Si se hubiera empleado silicio como sustrato, se habría creado una capacidad parásita tan grande que no permitiría medir las propiedades eléctricas de la solución.

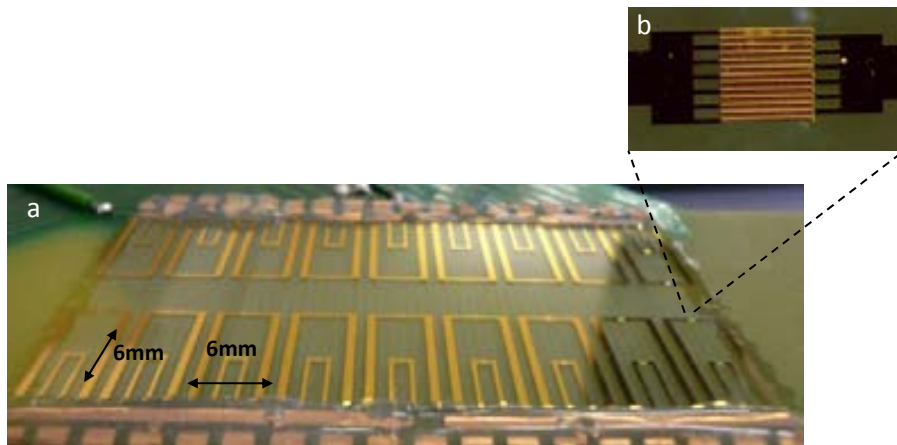


Figura 3.3. a. Matriz de 4x9 IDE. b. Detalle de un IDE.

El proceso de fabricación empezó con la deposición de una tricapa metálica de titanio, níquel y oro (el titanio se depositó sobre el Pyrex con un grosor de 20 nm, el níquel sobre el titanio con un grosor de 50 nm y el oro sobre el níquel con un grosor de 50 nm). Los tres metales se depositaron por pulverización catódica. El níquel y el titanio son necesarios para mejorar la adhesión de la capa de oro y evitar su difusión en el sustrato. El oro al ser un metal noble, permite realizar medidas en solución sufriendo un proceso de corrosión mínimo que no lo deterioran.

Después del proceso de deposición de la tricapa, se realizó un proceso de fotolitografía estándar con una máscara que contenía los motivos para definir una matriz de IDEs. A continuación se llevó a cabo el ataque químico de los metales en diferentes soluciones de ataque. Este es un

proceso más sencillo y fácil de controlar que la definición por lift-off, y da resultados satisfactorios para dimensiones grandes ($\sim 20 \mu\text{m}$) como las utilizadas en el diseño de los presentes electrodos. Para el ataque del oro se utilizó una mezcla de 5700 ml de H_2O , 435 g de KI y 250 g de I_2 . Para el níquel se utilizó una mezcla 1:4 de HNO_3 al 70%: H_2O . Para el titanio se utilizó una mezcla 1:10:33 de HF 49%: H_2O : 1,2-Propanodiol.

Finalmente se depositó capa de pasivación consistente en 300 nm de óxido de silicio y 700 nm de nitruro de silicio mediante un proceso plasma PECVD (plasma enhanced chemical vapor deposition). Se realizó un segundo proceso de fotolitografía estándar y se abrió la pasivación mediante un proceso de ataque con iones reactivos (RIE). Finalmente se eliminó la resina definida por fotolitografía, dejando así expuestas las estructuras interdigitadas y los pads de conexión en el borde del chip.

La oblea se cortó con la ayuda de una sierra mecánica para separar las dos matrices de IDEs. Cada matriz se pegó a un circuito impreso (PCB), en el que se había definido las áreas necesarias para la conexión mediante soldadura por hilo y también un conector para conectar eléctricamente los electrodos a la instrumentación. Finalmente las conexiones se protegieron con una silicona de Dow Corning.

Para completar la fabricación del lector, se colocaron las cinco estructuras de alineamiento de polimetilmetacrilato (PMMA) y las dos estructuras de apoyo sobre la PCB, siguiendo el modelo de la Figura 3.1..

3.3.3 Instrumentación

La instrumentación de medida consiste en fuentes de excitación de tensión alterna y circuitos medidores de corriente alterna, que combinados son capaces de medir la impedancia en las terminales de los IDEs. La conexión de dichas fuentes y circuitos con los electrodos se puede ver en la Figura 3.4. Como se puede apreciar en la figura, los transductores impedimétricos permiten un conexionado tipo fila-columna. Esto hace que sea práctica la realización de matrices de gran número de elementos. Por ejemplo, para una matriz de 1024 elementos bastaría con 32 fuentes de excitación alterna y 32 circuitos de medida de la corriente.

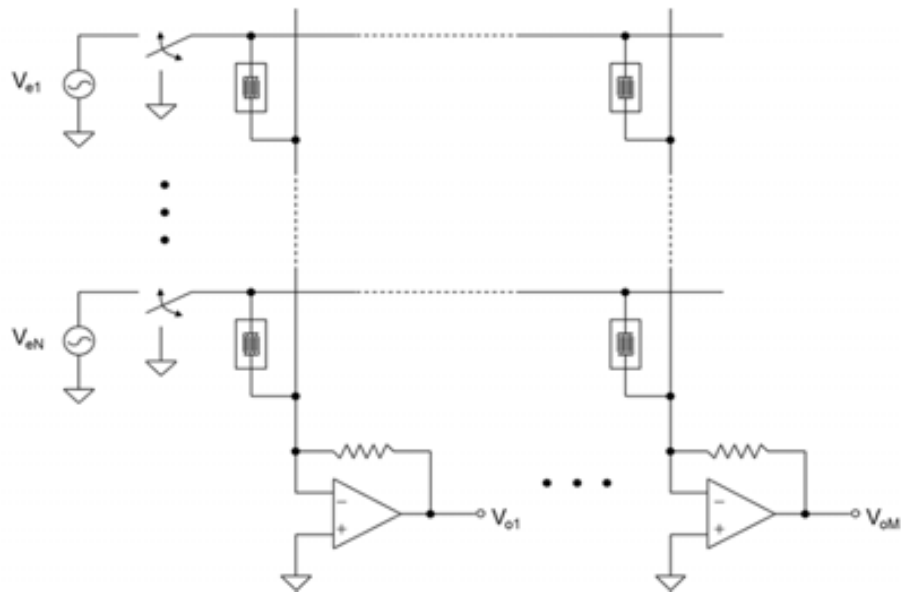


Figura 3.4. La instrumentación de lectura consiste en: un conjunto de fuentes de excitación alterna y un conjunto de circuitos de medida de corriente. En el dibujo sólo se muestran la primera y la última fuente, así como el primer y el último circuito de medida de corriente.

El circuito eléctrico diseñado para este sistema de lectura consiste en cuatro fuentes de tensión AC (una por fila) y nueve bloques de circuitos medidores de corriente a tensión (uno por columna), los cuales se unen para medir la impedancia en las terminales de los 36 IDEs. La lectura se realiza fila por fila, de tal manera que, mientras que una fila es excitada con una fuente de tensión, las otras filas están a tierra. La impedancia que sale del circuito medidor de corriente es virtualmente cero y esta conectado a tierra. Por lo tanto, los IDEs no comienzan a excitarse en una columna mientras tenga ambos terminales a un potencial de 0 V, de modo que la corriente que fluye a través del IDE excitado va totalmente al circuito de medición de corriente a tensión. Este análisis es válido para los componentes electrónicos ideales. En el análisis real aparece un efecto de cross-talk, que se ha de evaluar.

Para evaluar el corss-talk en una columna particular, se tiene la situación que se observa en la Figura 3.5, donde al hacer la medida de un IDE, los 3 restantes están conectados a tierra y por tanto su resistencia esta en paralelo con la resistencia de entrada al circuito de medida de corriente.

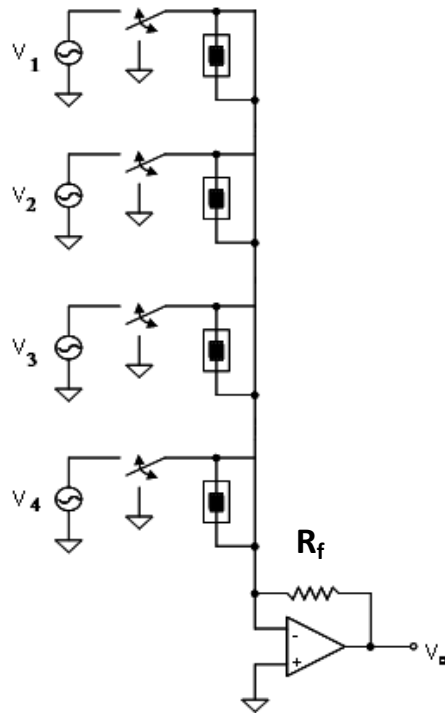


Figura 3.5. Columna de interconexiones

La corriente que fluye a través de los IDEs (ver Figura 3.6) no se convierte en tensión. Los IDEs que están conectados a tierra se comportan como una resistencia (R_i) mientras que el IDE que se está midiendo se comporta como una resistencia (R_m).

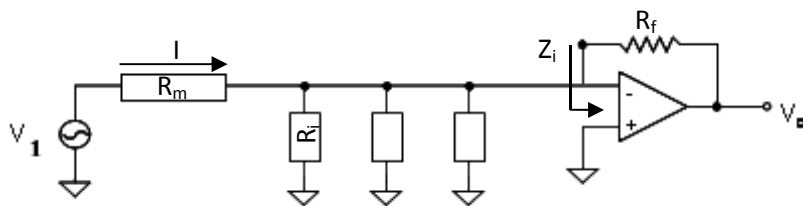


Figura 3.6. Esquema del flujo de la corriente a través de los IDEs

$Z_i \cong \frac{R_f}{A}$ donde A es la Ganancia del Amplificador.

Se debe tener en cuenta que dependiendo de la frecuencia a la que se trabaje la ganancia de amplificador no es el 100%, ya que depende del ancho de banda del mismo.

La máxima interferencia cuando se está midiendo R_m ocurrirá cuando R_i tenga el valor más bajo posible. Esta situación se corresponde con la mayor conductividad alcanzada en la solución de lectura durante la reacción de la ureasa con la urea, y se da cuando se lee la concentración más alta de mIgG donde la resistencia medida es de 10 k Ω .

El error relativo en la medida debido al cross-talk se puede calcular de la siguiente manera:

$$\eta = \frac{R_m - R_{sol}}{R_{sol}} = \frac{(N - 1)R_i}{R_l}$$

Donde N es el numero de filas del Array.

Por lo tanto, con la actual instrumentación (N=4, $R_f=100$ k Ω y A=350 a 40 kHz) el error debido al cross talk esperado seria de 8.6%. El cross-talk se midió experimentalmente mediante resistencias discretas. En lugar de los IDEs se conectaron 4 resistencias de 10 k Ω para una columna. Luego se desconectaron 3 resistencias y se midió la cuarta resistencia conectada, la cual presentó un cambio del 3.1%. Este valor es menor de lo esperado, probablemente debido a una mayor ganancia de lazo abierto de la que se especifica en la hoja de datos del amplificador operacional.

Este error de cross-talk podría ser demasiado alto para alguna aplicación determinada, pero se puede reducir fácilmente disminuyendo la impedancia de entrada (Z_i). Esto se puede conseguir usando un amplificador operacional con una banda más ancha (mayor ganancia a 40 kHz) o mediante el uso de dos etapas del circuito de medida de corriente, poniendo en la primera etapa una R_f menor.

En este trabajo, los generadores fueron las salidas analógicas de una tarjeta NI USB-6259 de National Instruments. Los circuitos de medida de corriente se implementaron con amplificadores operacionales, con una resistencia de realimentación de precisión. El registro de los valores de

tensión a la salida de los amplificadores operacionales se realizó a través de las entradas analógicas de la misma tarjeta.

3.3.4 Reactivos químicos y materiales

La ureasa de Jack Bean (tipo C-3, $\geq 600\ 000$ unidades/g sólido), la urea, las tabletas de solución salina de fosfato (10 mM fosfato, pH 7.4 que contiene 140 mM NaCl, PBS), el suero bovino de albumina (BSA), el Tween 20, la inmunoglobulina G de ratón (mIgG), el anticuerpo de ratón IgG (molécula conjugada)-biotina, y la estreptavidina-Cy3 fueron suministrados por Sigma-Aldrich (España). El kit de conjugación Lightning-link Estreptavidina (Innova Biosciences Ltd.) fue suministrado por Antibody BCN (España) y se utilizó para obtener el conjugado estreptavidina-ureasa. Los portaobjetos de vidrio Nexterion AL (Schott AG) fueron suministrados por Isogen Life Science, S.L. (España). Todos los demás productos fueron de grado analítico.

3.3.5 Fabricación del microarray de proteínas marcado con ureasa

Se evaluó la utilidad del dispositivo mediante la lectura de un microarray de proteínas. Este microarray se fabricó empleando un formato de inmunoensayo tipo "Reversed-phase" (Figura 3.7)[21]. Para este ensayo se utilizó como sustrato un porta-objetos de vidrio modificado con grupos aldehído, que permite la unión covalente de la biomolécula a través de grupos amino primarios de la misma. Como analito se utilizaron diferentes concentraciones de mIgG disueltas en PBS. Finalmente se utilizó una biomolécula de unión específica marcada para realizar la lectura. Esta biomolécula es la anti-Inmunoglobulina G de ratón (anti-mIgG) unida a una biotina. Como la biotina se une específicamente a la estreptavidina, entonces, se utilizó una ureasa unida a una estreptavidina que se unirá a la biotina del anti-mIgG y de esta forma se pudo marcar la anti-mIgG con la ureasa.

Las concentraciones de mIgG se variaron en un rango entre $30\ \text{ng mL}^{-1}$ y $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Se depositaron alícuotas de $0.2\ \mu\text{L}$ de cada disolución por cuadruplicados en cada porta-objetos de vidrio. Para ello se utilizó un microdispensador de gotas (spotter, modelo iTWO de M2-Automation, Berlín). El microarray se incubó en una cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se continuó con un lavado en PBS que contiene Tween 20 0.1% (PBS-T), y a continuación se realizó un bloqueo

en PBS que contiene 1% de BSA (PBS-BSA) durante toda la noche a 4°C. Las siguientes incubaciones del microarray se llevaron a cabo en una cámara de incubación casera fabricada usando un portaobjetos de vidrio del mismo tamaño del microarray al que se unió un marco de PDMS de 0.5 mm de espesor. En primer lugar, se colocó 1 mL de una solución de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-mIgG-biotina disuelto en PBS dentro de esta cámara de incubación, la cual se cubrió con el microarray, sellando completamente la cavidad para evitar la evaporación. Esta cámara se volteó de tal forma que el microarray pasaba a ser el sustrato de la misma y entraba en contacto con la disolución de incubación. La solución se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, el microarray se lavó tres veces con PBS-T y se volvió a incubar en 1 mL de una disolución de 1/10 del stock del conjugado estreptavidina-ureasa realizada en PBS, durante una hora de la misma manera que se hizo la incubación anterior. Finalmente el microarray se lava tres veces en PBS-T y se guarda en PBS hasta el momento de las medidas de lectura (no más de 1 hora). Justo antes de realizar la lectura, el microarray, se lava en una solución de glicina 250mM y se seca cuidadosamente en corriente de nitrógeno.

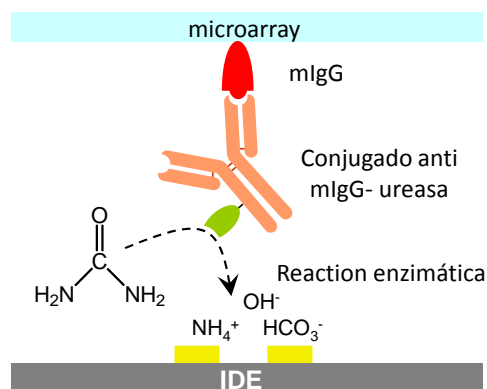


Figura 3.7. Esquema de las reacciones que tienen lugar en cada punto del microarray de proteínas desarrollado.

3.3.6 Proceso de lectura

Con la ayuda del microdispensador, se coloca una gota de 1.7 μL de solución de urea 0.1 M preparada en glicina 250 mM, sobre cada IDE. Se

posiciona el microarray sobre el array de transductores haciendo coincidir cada gota con un punto del microarray correspondiente. Alrededor del sistema se genera un ambiente húmedo colocando pequeños trozos de papel humedecido, con el fin de evitar la evaporación de las gotas de solución de medida. La reacción enzimática de la ureasa tiene lugar durante 30 minutos, y la impedancia se va registrando cada 10 segundos. Antes de empezar cada lectura de un nuevo microarray, los transductores se limpian con agua desionizada, con el fin de eliminar los posibles residuos que hayan quedado de la reacción de lectura anterior.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Caracterización de los transductores y la instrumentación de lectura

Para la caracterización del sistema en conductividad, se prepararon soluciones de KCl con diferentes conductividades en un rango de 10 a 120 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preparadas y medidas con un conductímetro (μCM 2202, CRISON). Se depositaron gotas de 1.7 μL de solución sobre los transductores y se midió su espectro de impedancia con un analizador de impedancias comercial (SI 1260 SOLARTRON), realizando un barrido en un rango de frecuencias entre 10 kHz a 1 MHz, a un potencial de 0 V DC y una amplitud de 50 mV. En la Figura 3.8 se puede observar el diagrama de Bode de los espectros de impedancias de las diferentes soluciones de KCl. Estos muestran la forma esperada para un par de IDEs inmersos en una solución donde no tiene lugar fenómeno alguno de transferencia de carga. Este espectro puede estar asociado al circuito equivalente simple, incluido en la Figura 3.8, donde el elemento de fase constante (CPE_{dl}) corresponde a la capacidad de la doble capa y la resistencia (R_{sol}) y capacidad (C_{sol}) están relacionados con la conductividad y la permitividad de la solución, respectivamente.

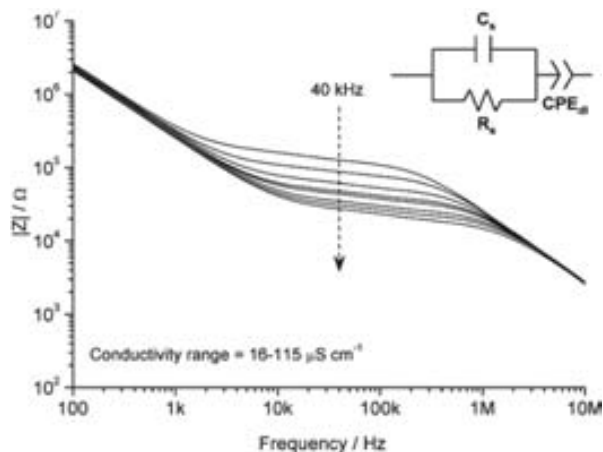


Figura 3.8. Diagrama de Bode del espectro de impedancia para un solo IDE medido con un analizador de impedancias cubierto por una gota de solución de KCl a diferentes conductividades (la curva de arriba corresponde a $16 \mu\text{S cm}^{-1}$ y la curva de abajo corresponde a $115 \mu\text{S cm}^{-1}$). Se muestra igualmente el circuito equivalente que mejor se ajusta a los datos experimentales y describe el experimento realizado.

Estos resultados muestran que la porción plana de las curvas está dominada por la conductividad de la solución. La medida de la parte real de la impedancia a una frecuencia única en esta región podría dar valores directamente proporcionales a la resistencia de la solución entre los electrodos e inversamente proporcional a su conductancia. De esta forma se eligió una frecuencia fija de 40 kHz para realizar la lectura de los microarrays.

En la Figura 3.9 se puede observar el promedio de la conductancia (G , calculado como la inversa de la parte real de la impedancia) de los 36 IDEs del array para diferentes conductividades (σ) medidas a 40 kHz con la instrumentación desarrollada en este trabajo.

La desviación estándar de los valores de G es menor a un 6.3% para todas las conductividades medidas, la cual hace evidente la buena reproducibilidad en los electrodos fabricados. Se muestra la comparación con los valores de conductancia obtenidos con el analizador de impedancias para un solo IDE.

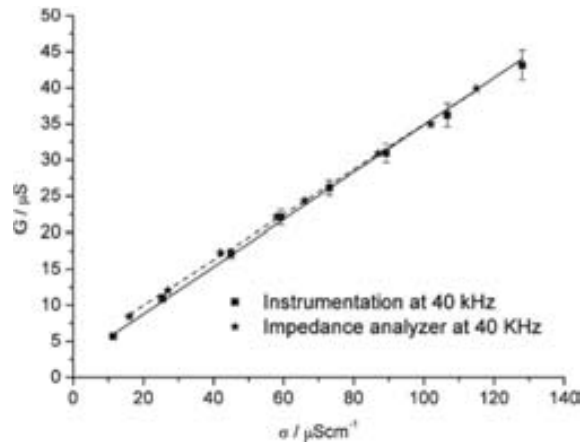


Figura 3.9. Promedio de la respuesta de los 36 IDEs medida con la instrumentación basada en la tarjeta DAQ y comparación con la respuesta obtenida con el analizador de impedancias comercial.

Como se esperaba, la respuesta para la conductividad es lineal y los valores obtenidos con la instrumentación desarrollada en este trabajo son acordes con los obtenidos con el analizador de impedancias.

A partir de estos datos, se ha calculado la constante de celda de los IDEs, definida como $k=\Delta\sigma/\Delta G$, donde ΔG es el incremento en conductancia esperado para un incremento $\Delta\sigma$ en la conductividad de una solución. Según esta ecuación la k se puede extraer directamente de la gráfica anterior y es la inversa de la pendiente de la regresión lineal de los datos mostrados en la Figura 3.8. Se obtuvo un valor de 3.07 cm^{-1} (dato obtenido de la instrumentación).

Igualmente se estimó el valor del cross-talk esperado en el rango de conductividades medido, siendo este de un 3.1 %, valor que concuerda con el valor teórico estimado en la sección 3.3.3.

3.4.2 Lectura eléctrica del microarray de proteínas

Para probar la capacidad del sistema para realizar la lectura de microarrays, se escogió como analito, la proteína genérica mIgG. Se hicieron 7 diluciones diferentes desde $0,03 \mu\text{g ml}^{-1}$ hasta $30 \mu\text{g ml}^{-1}$, las cuales se midieron por cuatuplicado (una dilución por columna del

array). En las otras dos columnas del mismo, se midió la señal del blanco, generado incubando solución salina tamponada con fosfato (PBS). En la Figura 3.10 se puede observar la distribución de cada una de las diferentes diluciones de mIgG dentro del microarray.

Las columnas de blancos se pusieron una al lado de los puntos de mayor concentración (blanco-1) y la otra al lado de los puntos con menor concentración (blanco-2). Con esta disposición de los blancos se evaluó una posible contaminación por migración de productos de la reacción de un punto a otro adyacente. Como se ha comentado anteriormente, la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa genera amonio y bicarbonato en disolución. Estas dos especies presentan un equilibrio ácido-base con las especies gaseosas, amoniaco y dióxido de carbono, respectivamente. Ambas especies pueden migrar de una gota de disolución a las gotas adyacentes dando lugar al fenómeno denominado “*cross-talk químico*”, el cual debe ser evaluado ya que afecta negativamente a la sensibilidad de la lectura del array, como se comenta más abajo.

En la Figura 3.10 se puede observar la respuesta en conductancia obtenida para los puntos de una fila. Como era de esperar, en los puntos de mayor concentración de mIgG se produjo un mayor aumento en la conductancia. A mayor concentración de analito mayor la concentración de la marca enzimática sobre el punto del microarray será mayor, y esta dará lugar a un mayor aumento en la conductividad de la disolución.

La concentración de urea utilizada (0,1 M) es lo suficientemente alta para que la reacción siga el comportamiento del modelo de cinética de Michaelis-Menten, donde la velocidad de reacción enzimática no depende de la concentración del sustrato y es proporcional a la concentración del enzima presente.

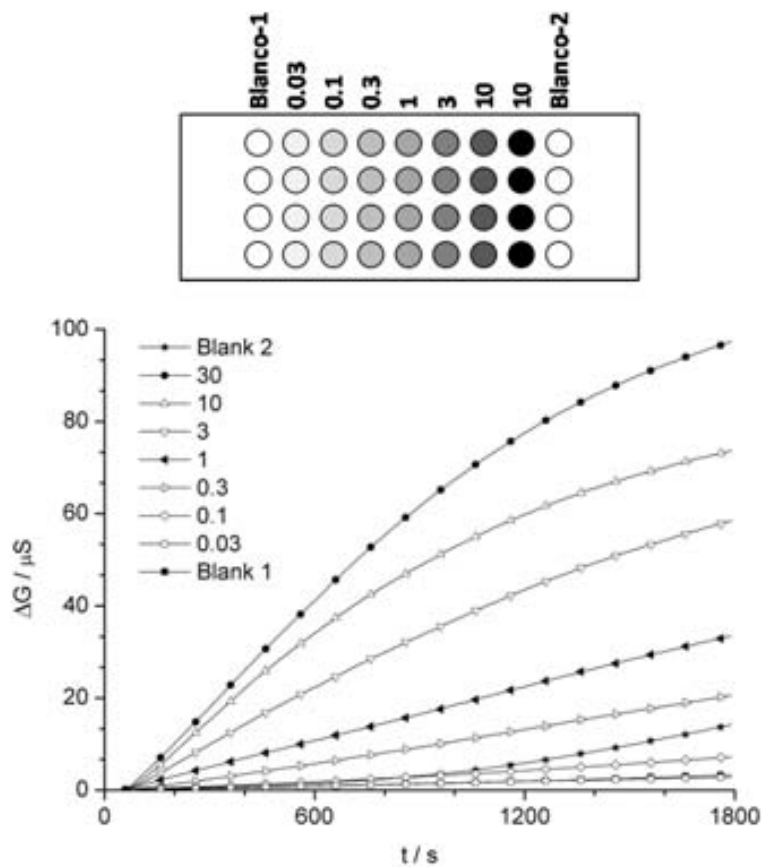


Figura 3.10. Disposición de las concentraciones de mIgG (en $\mu\text{g ml}^{-1}$) en el microarray y perfil de respuesta para las diferentes disoluciones ensayadas. A los valores de conductancia registrados se les restaron el valor de conductancia inicial con el fin de que los perfiles de respuesta partiesen todos de cero, y así poder compararlos fácilmente.

Dado que la conductividad es proporcional a la concentración de especies cargadas, la tasa de aumento de la conductancia medida debe ser proporcional a la cantidad de marca en cada punto. Por lo tanto, es posible utilizar la pendiente de la curva de conductancia frente al tiempo como señal analítica. A partir de este análisis se esperaría que las curvas tuvieran una única pendiente, pero para algunas medidas esto no es del todo cierto (Figura 3.11).

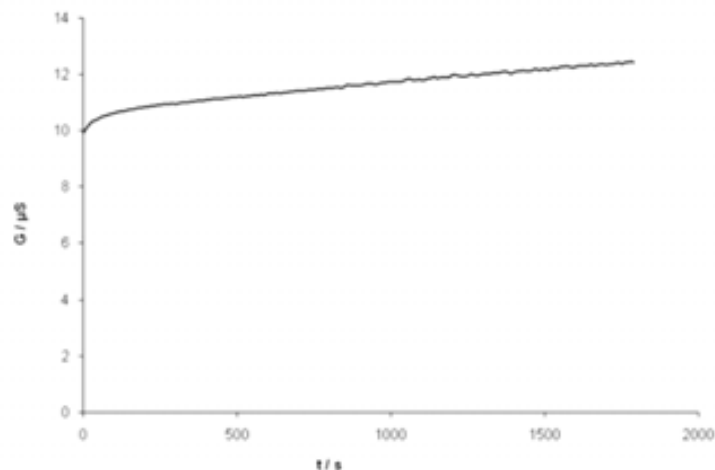


Figura 3.11. Conductancia en función del tiempo. Señal de un punto incubado con una concentración baja de mIgG ($0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Durante los primeros segundos de la medida, la señal presenta un pequeño *step-like*, debido a un aumento en la conductividad no debido a la reacción enzimática. Posiblemente dicho aumento se deba a especies iónicas que se fueron acumulando en cada punto del microarray durante el desarrollo del inmunoensayo y que no se eliminaron totalmente durante las etapas de lavado. Sin embargo, pasado un corto periodo de tiempo la pendiente de la curva se hace constante. Este tiempo es el necesario para que los productos de la reacción se difundan y alcancen la zona de penetración del campo eléctrico en la proximidad de los electrodos. Como estos fenómenos iniciales no tienen ningún significado analítico, la señal se empezó a registrar en el momento en que todas las señales aumentaban de forma constante.

Se detectaron otros dos efectos asociados, los cuales son visibles en la Figura 3.10. El primero se observa en aquellos puntos donde la concentración de mIgG era más alta. En esto, la señal después de 10 minutos de medida comienza a saturar. El segundo efecto se observa en los blancos, donde pasados 15 minutos la señal del blanco que está al lado de los puntos de mayor concentración de analito (blanco-2), comienza a dar un valor distinto de 0. Sin embargo, en los blancos adyacentes a los puntos de menor concentración de analito (blanco-1), este fenómeno no se produce.

El aumento de la conductancia observado en el blanco-2 puede ser debido al efecto del “*cross-talk químico*”, definido anteriormente, al cual se le puede sumar un fenómeno de evaporación, el cual podría ser más acusado en las gotas de los blancos por encontrarse en el borde del microarray. Este, como se ha comentado, se ha intentado minimizar llevando a cabo la medida en atmósfera húmeda, de tal forma que se espera que la contribución del mismo a la señal sea mínima.

Con el fin de minimizar los efectos negativos descritos, se tomó como señal analítica la pendiente del perfil de respuesta en el intervalo de tiempo entre los 100 y 600 segundos, donde el cambio en conductividad depende mayoritariamente de la actividad enzimática. La pendiente se calcula en este intervalo como la pendiente de la regresión lineal estimada con el método de mínimos cuadrados. En el capítulo IV se explican ciertas mejoras tecnológicas que se crearon para evitar algunos de estos problemas.

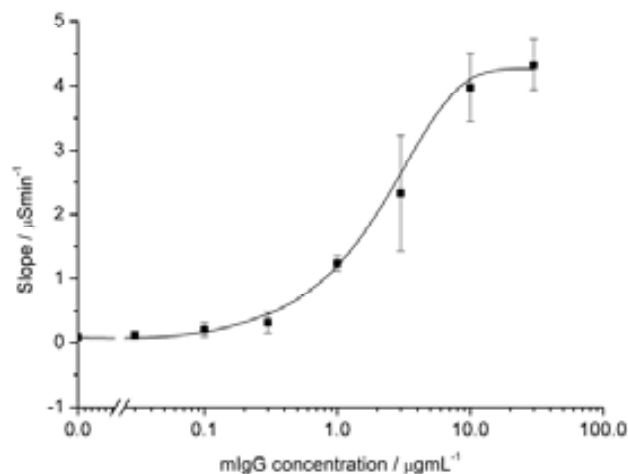


Figura 3.12. Resultado de la lectura eléctrica que muestra promedio de la pendiente para las señales de diferente concentración de mIgG en el intervalo de 0,03-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$

En la Figura 3.12 se muestra la curva de calibración obtenida en el intervalo de concentraciones de mIgG medido. La curva de calibrado muestra un perfil sigmoideal en la escala semilogarítmica, típica de

Inmunoensayos. Cada punto de la curva de calibrado se corresponde con el valor medio de las 4 puntos del microarray, realizados para cada concentración, y las barras de error representan la desviación estándar de dichas medidas. El límite de detección, calculado como la concentración mínima medida con el sistema cuya correspondiente señal es igual o mayor que el valor medio medido de la señal del blanco más tres veces su desviación estándar, fue de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. El intervalo dinámico es de aproximadamente un orden de magnitud.

Los resultados se validaron realizando dos estudios comparativos basados en procedimientos analíticos estándar (Figura 3.13). En primer lugar, se realizó un ensayo colorimétrico en placas de ELISA utilizando la misma marca enzimática (ureasa) y añadiendo a la disolución de medida el indicador de pH rojo fenol. Este indicador presenta un intervalo de viraje entre 6.8 y 8.2, cambiando su color de amarillo (forma ácida) a rojo (forma básica). Así, cuando tiene lugar la reacción enzimática, los productos de la reacción hacen aumentar el pH de la disolución, tal y como se comentó anteriormente, produciendo un cambio en el color del indicador y su intensidad, que se puede medir.

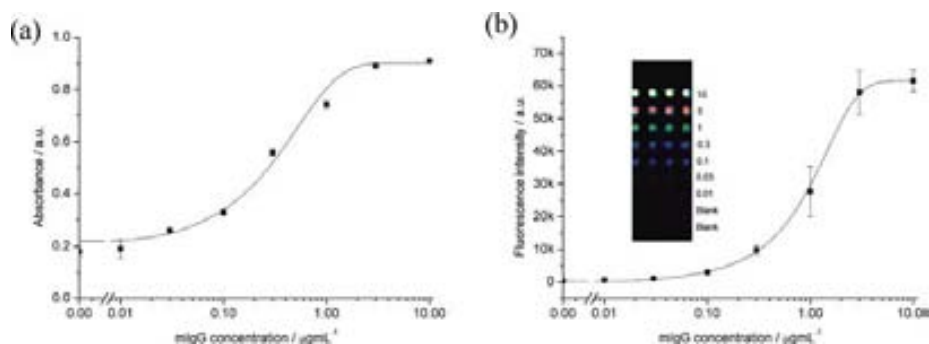


Figura 3.13. Los resultados de los estudios comparativos. (a) diagrama de calibración para ELISA realizado en placas de 96 pocillos usando la marca enzimática ureasa y rojo fenol como un indicador de pH. Cada punto es el valor medio de la absorbancia de las medidas llevadas a cabo para cada concentración de analito, y las barras de error representan la desviación estándar correspondiente. (b) diagrama de calibración para inmunoensayo realizado en microarrays usando la marca fluorescente Cy3 y leída con un escáner de fluorescencia. Cada punto es el valor medio de la intensidad de fluorescencia de las cuatro medidas llevadas a cabo para cada concentración de analito, y las barras de error representan la desviación estándar correspondiente. El recuadro muestra una imagen escaneada del microarrays (las concentraciones de mIgG están en $\mu\text{g mL}^{-1}$).

La curva de calibración correspondiente a este ensayo de validación mostró el comportamiento sigmoidal típico de los inmunoensayos (Figura 3.13(a)). Mostró límites de detección similares a los obtenidos con el sistema de lectura eléctrico. A pesar del buen rendimiento de los inmunoensayos marcados con ureasa, su uso ha sido bastante limitado debido probablemente al hecho de que las reacciones enzimáticas de los inmunoensayos se realizan en soluciones a PH lejos del pH óptimo de ureasa, y el problema de los falsos positivos debido a la migración de los productos enzimáticos [22-23]. Estos inconvenientes se minimizan en nuestro sistema utilizando un pH más adecuado y un tiempo más corto de reacción enzimática.

En segundo lugar, se fabricó un microarray con la misma proteína genérica de ratón como analito y en el mismo rango de concentraciones, pero en este caso se utilizó una marca para la detección por fluorescencia (Cy3). También se observó una tendencia similar a la curva de calibración sigmoidal (Figura 3.13(b)). El rango dinámico también fue de 1 orden de magnitud, y el límite de detección estimado utilizando el mismo criterio que anteriormente fue de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Es 1 orden de magnitud por debajo del obtenido con nuestro sistema. Sin embargo, se podría mejorar su límite de detección mediante la optimización del conjugado ureasa-estreptavidina, así como por la disminución del volumen de las gotas de solución de urea utilizadas en el proceso de lectura. Además, es importante notar que este inmunoensayo genérico se ha utilizado como prueba de concepto para la lectura eléctrica de microarrays de proteínas y para compararlo con dos procedimientos inmunoanalíticos multiplexados ya establecidos. Los límites reales de detección dependerán de la aplicación específica y el formato de ensayo de microarrays seleccionado.

3.5 Conclusiones

Se demostró la lectura eléctrica de microarrays de proteínas en portaobjetos de vidrio. Para este propósito se desarrolló un dispositivo de lectura basado en un array de transductores interdigitados y una instrumentación de medida tipo fila-columna. Este dispositivo se utilizó para leer los microarrays de proteínas basados en el uso de la etiqueta de la ureasa y se probó en un inmunoensayo para la detección de una

proteína genérico inmunoglobulinas-globulina de ratón. La respuesta fue similar a la obtenida con un escáner de fluorescencia siguiendo el mismo formato de microarray, pero el uso de una etiqueta Cy3.

En este primer prototipo, el espaciado de los puntos fue diseñado para ser lo suficientemente grande como para facilitar la alineación entre el lector y el microrarray sin una sofisticada sujeción mecánica. El aumento de densidad de puntos en los diseños futuros implicará trabajar con volúmenes de gotas más pequeñas y un espacio menor entre el lector y los sustratos de microarrays. En este sentido, la integración de sistemas microfluídicos para la rápida formación de las gotas de la solución de lectura en cada spot podría ayudar a que el procedimiento de lectura sea más sencillo[16]. Estos sistemas microfluídicos también se podrían utilizar para la automatización de la fabricación del inmunoensayo[24], lo cual es necesario para el desarrollo de plataformas de microarrays compactas y de bajo coste, que pueden ser utilizados fuera de los laboratorios y en aplicaciones PoC.

Referencias

- [1] Lockhart, D. J.; Winzler, E. A. *Nature* 2000, 405, 827–836.
- [2] Chen, G.Y.; Uttamchandani, M.; Lue, R.Y.; Lesaicherre, M.L.; Yao, S. Q. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, 3, 705–724.
- [3] Khnouf, R.; Olivero, D.; Jin, S.; Coleman, M.A.; Fan, Z.H. *Anal. Chem.* 2010, 82, 7021–7026.
- [4] Hartmann, M.; Sjöodahl, J.; Stjernström, M.; Redeby, J.; Joos, T.; Roeraade, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 591–598.
- [5] Shalon, D.; Smith, S.J.; Brown, P.O. *Genome Res.* 1996, 6, 639–645.
- [6] Zhou, D.; Qiao, W.; Yang, L.; Lu, Z. *Anal. Biochem.* 2006, 351, 26–35.
- [7] Kristensen, R.; Gauthier, G.; Berdal, K.G.; Hamels, S.; Remacle, J.; Holst-Jensen, A. D. L. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102, 1060–1070.
- [8] Arruda, D.L.; Wilson, W.C.; Nguyen, C.; Yao, Q.W.; Caiazza, R. J.; Talpasanu, I.; Dow, D. E.; Liu, B. C-S. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009, 9, 749–755.
- [9] Lalvani, A.; Pareek, M. *Brit. Med. Bull.* 2010, 93, 69–84.
- [10] Bellevillea, E.; Dufvaa, M.; Aamandb, J.; Bruunc, L.; Clausend, L.; Christensen, C. B. V. *J. Immunol. Methods* 2004, 286, 219–229.
- [11] Park, S.-J.; Taton, T.A.; Mirkin, C.A. *Science* 2002, 295, 1503–1506.
- [12] Chen, X.; Roy, S.; Peng, Y.; Gao, Z. *Anal. Chem.* 2010, 82, 5958–5964.

- [13] Dill, K., Liu, R. H., Grodzinski, P., Eds. In *Microarrays: Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*; SpringerLink: New York, 2009, pp 247-260.
- [14] Kojima, K.; Hiratsuka, A.; Suzuki, H.; Yano, K.; Ikebukuro, K.; Karube, I. *Anal. Chem.* 2003, 75, 1116–1122.
- [15] Roth, K. M.; Peyvan, K.; Schwarzkopf, K. R.; Ghindilis, A. *Electroanalysis* 2006, 18, 1982–1988.
- [16] Marchand, G.; Delattre, C.; Campagnolo, R.; Pouteau, P.; Ginot, F. *Anal. Chem.* 2005, 77, 5189–5195.
- [17] Schienle, M.; Paulus, C.; Frey, A.; Hofmann, F.; Holzapfl, B.; Schindler-Bauer, P.; Thewes, R. *IEEE J. Solid-St. Circ.* 2004, 39, 2438–2445.
- [18] Lin, Z.; Takahashi, Y.; Kitagawa, Y.; Umemura, T.; Shiku, H.; Matsue, T. *Anal. Chem.* 2008, 80, 6830–6833.
- [19] delaRica, R.; Baldi, A.; Fernandez-Sanchez, C. *App. Phys. Lett.* 2007, 90, 074102.
- [20] Lo, C. Y.; Notenboom, R. H.; Kajioka, R. J. *Immunol. Methods* 1988, 114, 127–137.
- [21] Van Gerwen, P.; Laureyn, W.; Laureys, W.; Huyberegts, G.; De Beeck, M.-O.; Baert, K.; Suls, J.; Sansen, W.; Jacobs, P.; Hermans, L.; Mertens, R. *Sens. Actuators, B: Chem.* 1998, 49, 73–80.
- [22] Pirnia, F.; Pawlak, M.; Thallinger, G. G.; Gierke, B.; Templin, M. F.; Kappeler, A.; Betticher, D. C.; Gloor, B.; Borner, M. M. *Proteomics* 2009, 9, 3535–3548.
- [23] Blakeley, R. L.; Zerner, B. J. *Mol. Catal.* 1984, 23, 263–292.
- [24] Echevarría, M. G.; Nosetto, E. O.; Etcheverrigaray, M. E. J. *Vet. Diagn. Invest.* 2000, 12, 266–268.
- [25] Seidel, M.; Niessner, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 1521–1544.

CAPÍTULO IV

IMPLEMENTACIÓN DE UN ARRAY DE MICROPOCILLOS EN EL SISTEMA DE LECTURA ELÉCTRICA. APLICACIÓN A LA DETECCIÓN DE BOLDENONA

En esta capítulo se describe la implementación de un array de micropocillos fabricados por litografía blanda en polidimetilsiloxano (PDMS) en el sistema de lectura eléctrica, el cual aporta unas mejoras al funcionamiento del mismo, que se describen y demuestran a continuación.

4.1 Resumen

Se ha fabricado una matriz de 36 micropocillos de PDMS empleando técnicas de litografía blanda (del inglés soft lithography), el cual se posiciona sobre el array de transductores, y con el que se pretende evitar y eliminar los problemas de funcionamiento que tenía el sistema de lectura eléctrico descrito en el capítulo anterior. Dicha matriz de micropocillos permite posicionar las gotas de la disolución de medida de forma manual, evitando de esta forma el empleo de instrumentos como el microdispensador, empleado anteriormente. A su vez, cada micropocillo aísla cada uno de los puntos de medida de los adyacentes y del medio que les rodea, de tal forma que se evita la evaporación de la disolución durante la medida del microarray, así como el cross-talk químico que tenía lugar entre puntos de medida adyacentes. Igualmente, se modificó la instrumentación desarrollada con el fin de minimizar el cross-talk eléctrico que la empleada inicialmente mostraba.

Gracias a la introducción de esta matriz de pocillos y a la nueva instrumentación, se ha conseguido mejorar la sensibilidad y el límite de detección conseguido en la lectura eléctrica de un microarray, obteniéndose valores muy similares a los registrados empleando un método de lectura fluorescente convencional, realizado usando un escáner. Esta mejora tan significativa se demuestra para un microarray desarrollado para la medida de la hormona boldenona.

4.2 Introducción

El empleo de técnicas de litografía blanda para la fabricación de microestructuras poliméricas está muy extendido. Desde que el grupo de Whitesides hace ya casi dos décadas [1], describiese por primera vez la técnica de microtransferencia de motivos en un elastómero, en concreto, el polidimetilsiloxano (PDMS), son muchas las técnicas incluidas en la llamada litografía blanda que se han descrito en la literatura e infinitas y muy variadas sus aplicaciones [2]. De todas ellas, es quizás el modelado (molding) la más empleada, siendo igualmente el PDMS el material más demandado en este caso. En la técnica de modelado se emplea un máster que contiene el negativo de los motivos deseados, fabricado por otras técnicas litográficas. Si los motivos están todos en el rango de las micras, las técnicas fotolitográficas empleando fotoresinas son las más extendidas. De todas las fotoresinas, es quizás la conocida como SU-8, comercializada por Dow Corning la más aplicada.

Si nos centramos en la fabricación de micropocillos, estos se han propuesto para realizar cultivos celulares principalmente. Por ejemplo, se ha descrito la fabricación de micropocillos de PDMS para el cultivo de células epiteliales humanas y su potencial aplicación en ingeniería de tejidos [3]. Más recientemente, se ha descrito la fabricación de un dispositivo que incluye un array de micropocillos en PDMS que incluye estructuras complejas 3D donde poder crecer embriones [4]. De forma similar, en este trabajo de tesis se fabricó un array de micropocillos de 1.2 μL de volumen a partir de un máster de SU-8 y mediante el replicado del mismo en PDMS. Como se muestra a continuación, dicho array permitió eliminar varios de los problemas existentes en el primer prototipo del sistema de lectura eléctrico mostrado en el capítulo anterior.

Para demostrar la efectividad del nuevo sistema de lectura, se realizó la lectura eléctrica de una microarray para la hormona boldenona, basado en un formato de inmunoensayo competitivo indirecto y el empleo de la marca enzimática ureasa. La boldenona es un esteroide anabólico androgénico (AAS). Los AASs son usados ilegalmente para mejorar el

rendimiento de los atletas y también para aumentar la producción de carne en el campo agroalimentario [5]. Dichos esteroides están completamente prohibidos en la agencia mundial antidoping (WADA) y la Unión Europea [6].

4.3 Sección experimental

4.3.1. Diseño y fabricación del sistema de lectura eléctrico

La fabricación de IDEs de oro se hizo de forma análoga a la descrita en el capítulo 3 de este trabajo, con una única diferencia. En este caso se eliminaron las estructuras de apoyo de 300 μm de altura, que se empleaban en el diseño inicial para posicionar el microarray a una distancia fija del lector.

El diseño del array de micropocillos incluye una estructura de agujeros de 2 mm de diámetro y 200 μm de altura, sobre la cual se definió una junta de otras 200 μm de altura. De esta forma se definió un micropocillo de 2 mm de diámetro y 400 μm de altura, con un volumen total de 1.2 μL . Un esquema de los mismos se muestra en la Figura 4.1.

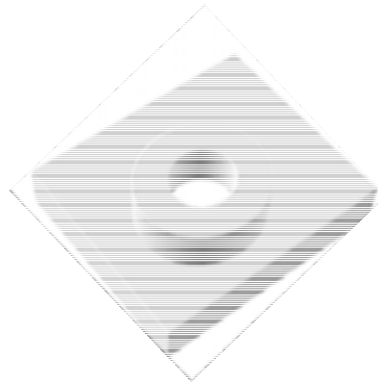


Figura 4.1. Esquema del diseño de un micropocillo.

El array de micropocillos de PDMS se fabricó por la técnica de modelado empleando un máster fabricado a dos niveles con la fotoresina SU-8 sobre sustratos de silicio, por un proceso de fotolitografía estándar. Dicho máster contenía el negativo de las estructuras de los pocillos. Para su replicado, se empleó el precursor del elastomero PDMS Sylgard 184, el cual se mezcló con el agente curante (mezcla comercial de Dow Corning) en una proporción 10:1 (v/v). Se desgasificó la mezcla e inmediatamente se vertió sobre el máster de SU-8. Seguidamente, el PDMS se cubrió con una lámina de poliéster, sobre la cual se realizó una presión constante posicionando una pieza pesada de metal encima. El PDMS se curó durante 48 horas a temperatura ambiente. La lámina de poliéster se empleó para prevenir que el PDMS se pegase a la lámina metálica. La aplicación de presión fue necesaria para retirar el PDMS de la cara superior del máster y así conseguir las estructuras abiertas que constituyen los micropocillos en el array. La estructura final del array se muestra en la Figura 4.2, junto con su implementación sobre el array de transductores. Como se puede observar, la definición de las juntas de PDMS que forman parte de la estructura de los pocillos crea un espacio vacío entre las mismas que tiene una función importante en el funcionamiento del sistema, el cual se describe más adelante.

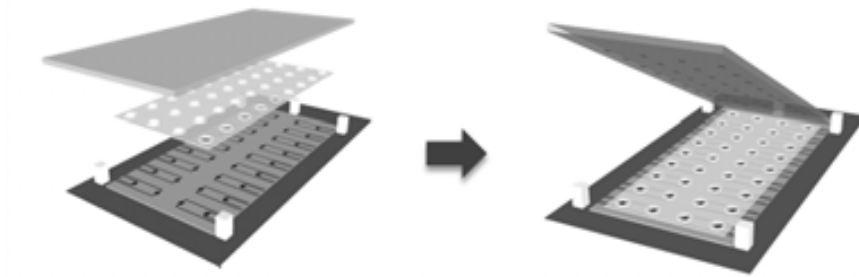


Figura 4.2. Esquema del sistema de lectura que incluye el array de transductores, de micropocillos y las estructuras de alineamiento para posicionar el microarray.

El sistema se completó con la instrumentación descrita en el capítulo 3, con la que realizar la lectura eléctrica. Esta incluye dos etapas de amplificación donde se mantiene la misma ganancia pero se minimiza el cross-talk eléctrico, tal y como se describe más abajo.

Una imagen del sistema de lectura y otra más detallada de un micropocillo alineado sobre un IDE se muestra en la Figura 4.3.

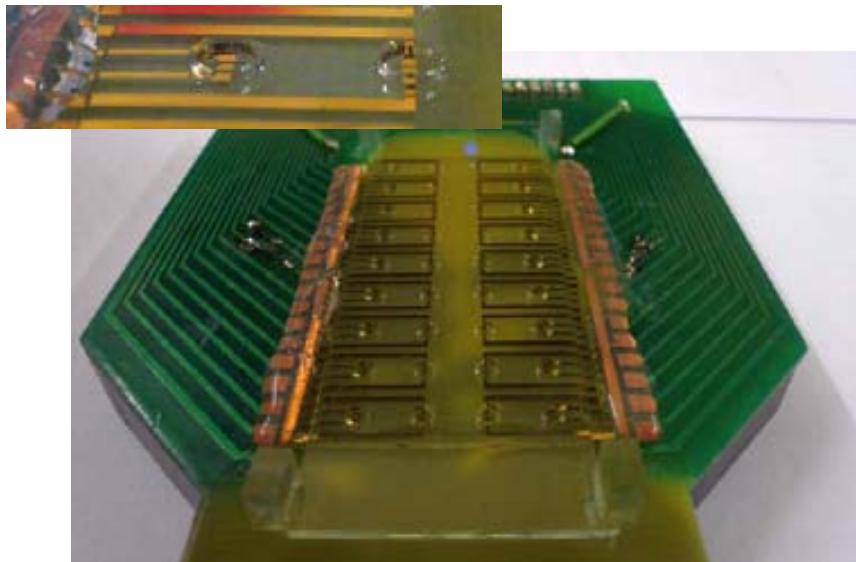


Figura 4.3. Imágenes del array de IDEs encapsulado con el array de micropocillos alineado sobre el mismo.

4.3.2. Reactivos químicos y materiales

Bicarbonato de amonio, hidróxido de amonio, glicina, ureasa de Jack Bean (tipo III, 15000-50000 unidades/ g sólido), urea, tampón de fosfato en pastillas (PBS), Tween 20, 3-glicidoxipropilmetildietoxisilano (GPTMS) y estreptavidina-Cy3 fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Boldenona fue suministrado por Sequoia Research Products, Ltd. (Oxford, UK). Los portaobjetos de vidrio son de Corning (Pozuelo de Alarcón). El conjugado seroalbúmina bovina- boldenona (BSA-B) y el antisuero anti-boldenona biotinilado (anti-B-biot) fueron preparados en el laboratorio del grupo Grupo de Nanobiotecnología por Diagnóstico (Nb4D) del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (iQAC), CSIC. Ambos reactivos fueron testados previamente para la detección de boldenona en placas de ELISA [7]. El kit de conjugación Lightning-Link para estreptavidina de Innova Biosciences Ltd fue suministrado por Antibody BCN (Barcelona) y usado para producir el conjugado estreptavidina-ureasa. El resto de los reactivos químicos fueron de grado analítico.

Se preparó un tampón de glicina 250 mM (Gli), el cual tiene un pH de 6.1. Se preparó una solución madre emulando urea hidrolizada mediante la mezcla de 0.1 M NH_4HCO_3 y 0.1 M NH_4OH en tampón Gli. PBS contenía 10 mM fosfato pH 7.5 en una disolución salina al 0.8 % (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl). PBST se preparó añadiendo a PBS 0.05 % v Tween 20. PBST-I se prepare añadiendo a PBS 0.005% v Tween 20. Se prepare una disolución de urea 0.1 M en tampón Gli.

4.3.3. Funcionamiento del sistema de lectura eléctrica

La lectura eléctrica del microarray se llevó a cabo llenando manualmente los micropocillos de PDMS en el sistema de lectura con un exceso de la disolución de urea, empleando una pipeta Pasteur. Se alineó el microarray en el sistema con la ayuda de las estructuras de alineamiento, de tal manera que el mismo se apoyaba sobre los micropocillos de PDMS. Al hacer esto, el exceso de solución de urea en cada pocillos se desplazó a la espacio vacío alrededor de las juntas de cada pocillo, y permaneció en este espacio durante la medida. De esta manera se garantizó el aislamiento del líquido en un pocillo de los adyacentes además del llenado total de cada uno de los pocillos. Un esquema de este principio de funcionamiento se muestra en la Figura 4.4.

Las medidas de impedancia se registraron cada 15 s durante un máximo de 1800 s, a una frecuencia fija de 40 kHz, potencial DC de 0 V y amplitud de 50 mV. La pendiente de la curva medida en un intervalo de tiempo fijo se ha tomado como señal analítica, de forma análoga a como se hizo en el trabajo del capítulo 3.

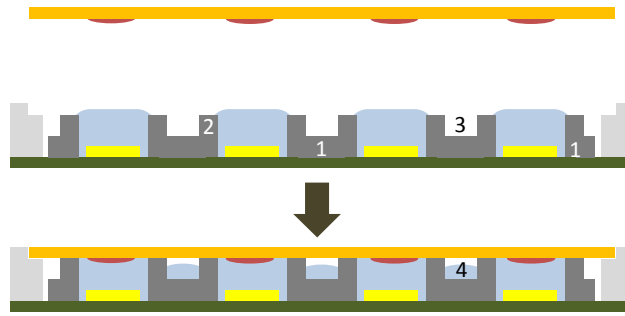


Figura 4.4. Esquema de una sección transversal del sistema de lectura eléctrica incluido el array de transductores, los micropocillos de PDMS (1), los cuales incluyen la junta (2) y el espacio vacío (3) donde alojar el exceso de solución de urea (4).

El sistema de lectura requiere de un mínimo mantenimiento por parte del usuario. Los IDEs y micropocillos se lavan con agua desionizada y se secan en corriente de N_2 después de cada uso. Cuando no se usa, se guarda en un contenedor tapado en condiciones ambientales.

4.3.4. Estudios de cross-talk químico y evaporación

Con el fin de estudiar el efecto del array de micropocillos de PDMS en la prevención del cross-talk químico y la evaporación, se hicieron diluciones sucesivas de la disolución madre que simula la hidrólisis de urea, tal y como se menciona en la sección 4.3.2., en un intervalo de concentraciones entre 10^{-5} M y 3×10^{-2} M de urea hidrolizada. Estas se midieron en el sistema de lectura con y sin el array de micropocillos, esta última con y sin control de la humedad (recordatorio: para mantener la humedad durante la medida se usaron tiras de papel absorbente mojadas dispuestas alrededor del array de IDEs, tal y como se menciona en el capítulo 3).

Para llevar a cabo el análisis, se añadió la dilución correspondiente de urea hidrolizada en 8 pocillos (dos columnas en el centro del array) mientras que en las otras sólo se puso el tampón de Gli. Los pocillos se

taparon con un portaobjetos de vidrio, tal y como se hace para la lectura de un microarray. Para aquellas medidas realizadas sin los pocillos, gotas de 1.5 μL se posicionaron sobre los IDEs empleando el microdispensador.

4.3.5. Formato de inmunoensayo para boldenona

Se empleó un formato de inmunoensayo competitivo indirecto para la detección de esta hormona. Inicialmente, los portaobjetos de vidrio se silanizaron con GPTMS. Seguidamente, gotas de 0.2 μL de PBS que contenían 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del conjugado BSA-B se depositaron sobre el sustrato con la ayuda del microdispensador. Estas se dejaron secar a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante una noche. A continuación, los sustratos ya modificados se lavaron cuatro veces con PBST. Diluciones sucesivas de una disolución madre de boldenona se prepararon en PBST-I en un intervalo de concentraciones de 0.3 nM a 3000 nM, y 50 μL de cada disolución se mezclaron con 50 μL de una disolución del anti-B-biot 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en PBST-I. Cada una de las disoluciones resultantes se incubó 30 min a temperatura ambiente sobre el sustrato de vidrio empleando una plantilla de PMMA fabricada por un proceso de mecanizado, que contenía 9 pocillos, cada uno de los cuales incluía 4 puntos del microarray. 50 μL de cada una de estas disoluciones se añadieron a cada pocillo. A continuación, el sustrato se lavó de nuevo como anteriormente y seguidamente se incubó cada uno de los pocillos con 100 μL de una dilución 1/400 de la disolución madre del conjugado estreptavidina-ureasa realizada en PBST-I durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. En el caso de los sustratos preparados para realizar la lectura fluorescente, esta última incubación se llevó a cabo con 100 μL en cada pocillo de una disolución del conjugado estreptavidina-Cy3, preparada en PBST-I. Se realizó una tercera etapa de lavado, como los anteriores y, finalmente, realizó otra etapa de lavado con el tampón de Gli para el microarray para la lectura eléctrica y con agua desionizada para el fluorescente. Los sustratos se secaron en una corriente de N_2 antes de realizar las medidas. Un esquema del inmunoensayo y la lectura eléctrica del array se muestra en la Figura 4.5.

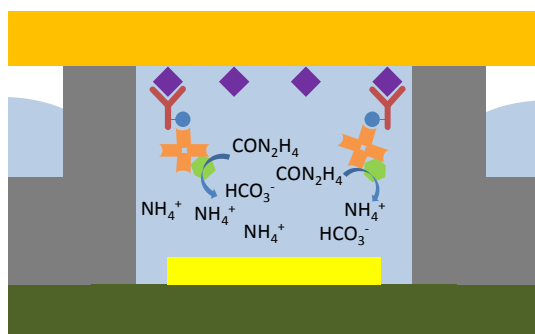


Figura 4.5. Esquema del formato de inmunoensayo de Boldenona. En violeta: Conjugado BSA-B; en rojo/azul – Anti-B-biot; en naranja / verde – estreptavidina-ureasa. El resto de los colores son los mismos que los mostrados en la Figura 4.4.

La lectura fluorescente se realizó con un ScanArray Gx PLUS (Perkin Elmer, USA) usando el filtro óptico para Cy3, con una resolución de 5 μm . La intensidad de fluorescencia en cada spot se midió con el F543_Mean-B543 (media de la intensidad del Cy3 menos la media de la intensidad del fondo).

Tanto las medidas fluorescentes como las eléctricas se analizaron empleando una ecuación lógica a cuatro parámetros mediante el software [SoftmaxPro v4.7 (Molecular Devices) and GraphPad Prism v 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)]. Para realizar la comparativa entre ambas medidas, los valores analíticos se normalizaron tomando la media y la desviación estándar de cuatro replicados. Las curvas de calibrado correspondientes se ajustaron a una la formula siguiente: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)^D] + B$, donde A es la señal máxima, B es la señal mínima, C es la concentración que genera el 50 % de la señal entre A y B (IC_{50}), y D es la pendiente del punto de inflexión de la curva sigmoideal. El límite de detección (LOD) se definió como la concentración que genera una señal igual al 90 % de la señal maxima (IC_{90}).

4.4 Resultados y Discusión

El principio de funcionamiento del sistema de lectura se ha descrito en el capítulo 3. Sin embargo, este sistema presentaba varios defectos que limitaban su funcionamiento en términos de sensibilidad con respecto a los sistemas de lectura fluorescente. En este capítulo se trató de mejorar el funcionamiento del mismo mediante la mejora de la instrumentación y la implementación del array de micropillos de PDMS.

4.4.1. Cross-talk eléctrico y calibración del sistema

Se ha mejorado la instrumentación desarrollada, incluyendo dos etapas de medida en vez de una que tenía la original. Se recoge un esquema en la Figura 4.6. Cada uno de las etapas incluye un amplificador operacional de impedancia muy baja. De esta forma, el cross-talk eléctrico se reduce unas 10 veces (del 3.1 % que mostraba la anterior al 0.3 % que mostraba la nueva instrumentación). Este valor de cross-talk garantizó que el efecto en las medidas de conductancia con los IDEs fuesen despreciables.

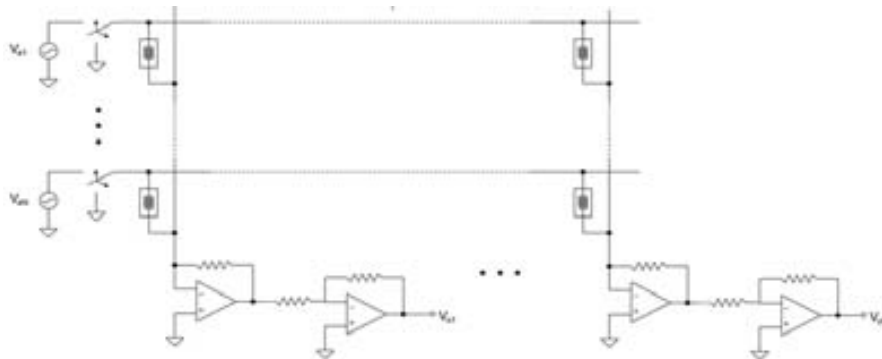


Figura 4.6. Esquema de la nueva instrumentación desarrollada para la lectura eléctrica de un microarray.

Con esta instrumentación, se calibró el array de IDEs con soluciones de KCl de conductividad conocida (σ) en el rango entre 20 to 140 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en las condiciones descritas en la sección 4.3.3 y de forma análoga a la calibración realizada en el capítulo 3. Así, los resultados se compararon con los obtenidos utilizando un analizador de impedancias comercial. Estos se muestran en la Figura 4.7.

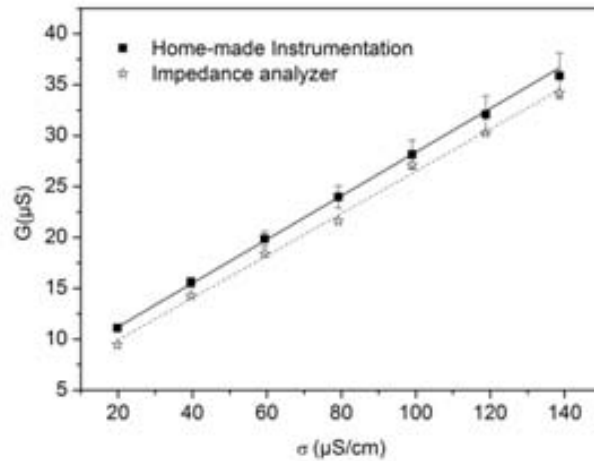


Figura 4.7. Rectas de calibración del array de IDEs usando la instrumentación y el analizador de impedancias comercial. Los valores de conductancia representados son la media de los obtenidos con los 36 IDEs del array, y la barra de error describe la desviación estándar de las medidas. Las medidas con el analizador se registraron usando sólo un IDE del array.

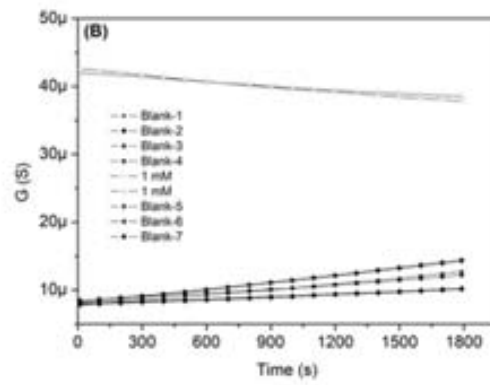
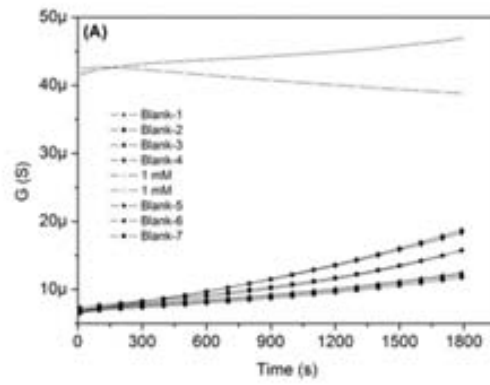
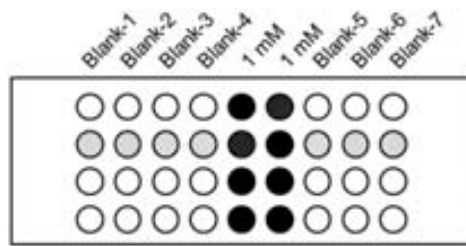
La respuesta de los IDEs es lineal en el rango de conductividades medido, y la desviación estándar relativa de los valores de conductancia (G) medidos está por debajo del 6 % en todos los casos. Igualmente, los resultados de calibración son muy similares a los obtenidos con el analizador comercial si tenemos en cuenta la pendiente de las correspondientes rectas de calibrado. Como se describió en el capítulo 3, dicha pendiente representa la inversa de la constante de celda (k) del IDE. Los valores de K fueron de 4.76 cm^{-1} y 4.83 cm^{-1} , para la instrumentación y el analizador, respectivamente, siendo el error menor del 1.5 %.

4.4.2. Estudios de cross-talk químico y evaporación

La aplicación de los micropocillos de PDMS garantiza el aislamiento de la disolución de medida de cada pocillo de los adyacentes. Para demostrarlo se realizaron los experimentos descritos en la sección 4.3.4 de la parte experimental para diferentes concentraciones de urea hidrolizada en solución. Se eligió como concentración máxima 1 mM de urea hidrolizada, teniendo en cuenta que la conductancia de esta solución está alrededor de 40 μ S, siendo este valor muy cercano al valor máximo de conductancia donde la respuesta del IDE es aún lineal (ver Figura 4.6.).

La Figura 4.8. muestra un esquema de la distribución de los puntos de análisis en el microarray y los valores de respuesta registrados con el sistema de lectura sin y con el array de micropocillos de PDMS. Por claridad en la presentación sólo se muestra la señal obtenida en dos puntos de 1 mM y en siete puntos donde sólo se midió Gli (blancos). La posición exacta de esos nueve puntos se muestra también en el esquema de la Figura 4.8.

Las medidas con el sistema eléctrico **sin el array de micropocillos y sin humedad pocillos** (Figura 4.8(A)) muestran una dispersión bastante grande y una señal claramente diferente de 0 registrada en aquellos puntos que contenían blancos. Se observan dos fenómenos mezclados. Por un lado el efecto del cross-talk químico hace que, en aquellos blancos más cercanos a los puntos de 1 mM urea hidrolizada, la G aumente debido a la migración de las especies CO_2 y NH_3 , es decir, al cross-talk químico. A medida que los puntos están más alejados de los de 1 mM urea hidrolizada, este efecto se va diluyendo y el aumento de G sea menos acusado, tal y como se esperaba. A su vez, en las señales de urea se registró claramente el efecto de la evaporación, que hace que la G aumente a partir de su valor inicial en la gota situada en el borde del array, debido a la pérdida de volumen de la gota, y por tanto, al aumento de la concentración de las especies iónicas presentes en la disolución. Igualmente se observa el efecto de migración de especies iónicas en estas señales. La señal de aquella gota de urea no situada en el borde muestra una disminución de su G, debido probablemente a dicha, mientras que en la situada al borde, el efecto de la evaporación es más acusado de ahí que se registre el mencionado aumento de G.



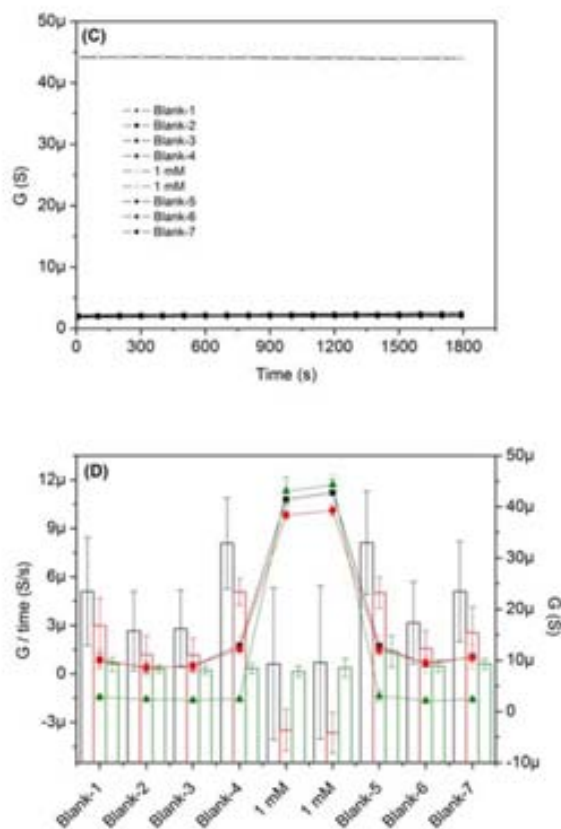


Figura 4.8. Estudio de cross-talk químico. Esquema de distribución de los puntos. Las medidas mostradas en las gráficas se corresponden con los puntos que aparecen mallados. Las medidas se corresponden a: (A) sin el array de pocillos y sin humedad; (B) sin el array de pocillos y con humedad; (C) con el array de pocillos. (D) Gráfico de barras mostrando las pendientes de las respuestas (entre 100 y 400 s) y gráfico de puntos de los valores registrados a los 1500 s. En verde – señales correspondientes al sistema con pocillos; en rojo – sin pocillos con humedad; en negro- sin pocillos y sin humedad. Las barras de error muestran la desviación estándar de los valores registrados con todos los puntos que contenían la misma disolución.

Las medidas registradas **sin el array de pocillos pero con humedad pocillos** (Figura 4.8(B)) muestran una dispersión menor que en el caso anterior, pero aún se ven diferencias entre los blancos, de tal forma que los que están más cerca de los puntos que contienen 1 mM de urea hidrolizada muestran los cambios en G mayores y estos cambios van disminuyendo a medida que nos alejamos de dichos puntos. Las señales

registradas en los puntos con urea son en este caso muy similares debido a que al poner humedad el efecto de la evaporación es prácticamente nulo, mostrándose solamente el efecto del cross-talk químico en ambos puntos.

Por último, las medidas registradas **con el array de pocillos** (Figura 4.8(C)) muestran señales muy estables tanto para los blancos como para los puntos con urea, lo que demuestra que estas estructuras evitan tanto la evaporación como el cross-talk. En ambos casos, las pendientes de las respuestas son cero, demostrando que no hay variación alguna de G con el tiempo.

La Figura 4.8(D) muestra las pendientes de los perfiles de respuesta así como los valores absolutos de G tomados a 1500 s. Se representa la media y la desviación estándar de todos los puntos del mismo tipo. Se muestra como los valores registrados usando el array de pocillos de PDMS muestra los valores más estables y las dispersiones más bajas. Estos datos ponen de manifiesto la utilidad del array de pocillos y la mejora significativa que ha supuesto su implementación en el sistema de lectura eléctrica.

Con el fin de evaluar si se podrían medir concentraciones aún más altas de urea hidrolizada sin el efecto del cross-talk, se multiplicó por 10 dicha concentración y se repitió el experimento anterior. La Figura 4.9 muestra los resultados.

Se aprecia cómo los perfiles de respuesta cuando no se empleó el array de micropocillos son aún más dispares mientras que los registrados cuando se usaron los pocillos aparece un cambio apreciable de G para los blancos más próximos a los puntos de urea hidrolizada 10 mM. En el resto de los casos la señal es estable y la pendiente de la respuesta es cercana a 0. Este estudio pone de manifiesto que, en el caso de obtener concentraciones de urea hidrolizada más altas de 1 mM, se debería poner especial cuidado en situar los blancos en puntos alejados a aquellos que contienen las concentraciones más altas de analito. Sin embargo cabe recordar que los valores de conductancia registrados para estas concentraciones están fuera del rango lineal de respuesta del sistema de lectura, que como se indicó anteriormente, tiene un límite superior alrededor de 40 μS .

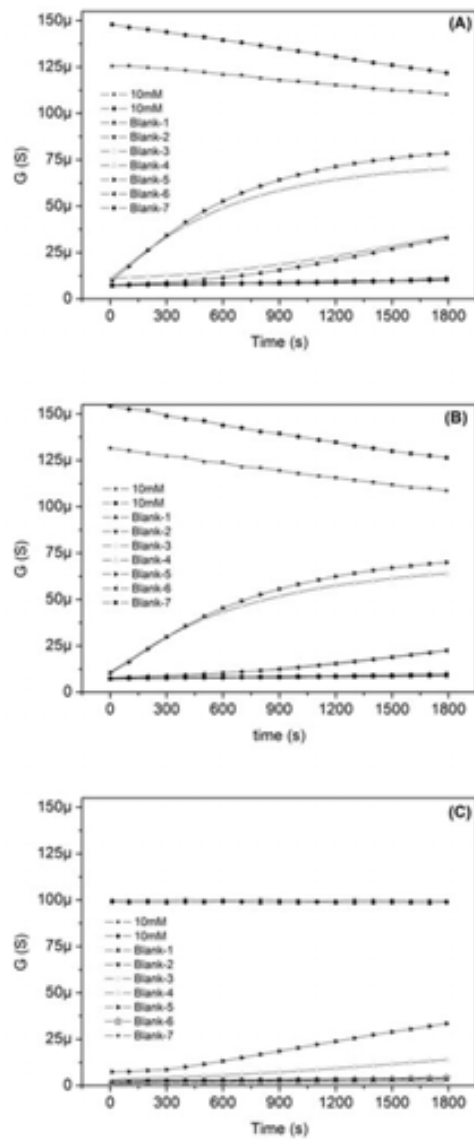


Figura 4.9. Estudio de cross-talk químico con una disolución de urea hidrolizada 10 mM. Condiciones como en la Figura 4.7.

4.4.3. Lectura eléctrica y fluorescente del array para boldenona.

Se realizó la lectura eléctrica de un microarray empleando el conjugado estreptavidina- ureasa y la lectura fluorescente de otro que incluye el conjugado estreptavidina- Cy4. Los resultados se muestran en la Figura 4.10. En ambos casos se observa el perfil sigmoidal típico en la escala semilogarítmica.

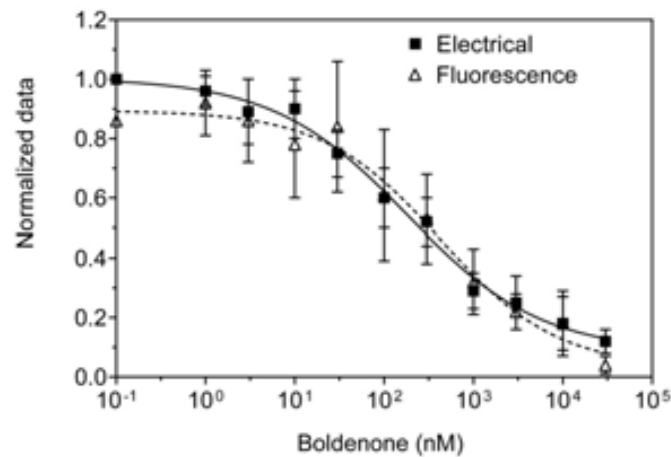


Figura 4.10. Curvas de calibrado del microarray de boldenona obtenidas con el sistema de lectura eléctrico y mediante un escáner de fluorescencia. Para las medidas eléctricas se tomaron las pendientes de los perfiles de respuesta entre 10 y 400 s. Los puntos muestran los valores medios de cuatro medidas realizadas para cada concentración y las barras de error representan la desviación estándar de dichas medidas.

La concentración máxima admitida por la WADA es de 10 ngmL⁻¹. Con el array eléctrico se obtuvo un valor de IC₅₀ de 180.4 ng mL⁻¹ y un límite de detección de 4.0 ng mL⁻¹, mientras que con el array fluorescente el valor de IC₅₀ fue de 425.2 ng mL⁻¹ y el límite de detección de 15.2 ng mL⁻¹. En el caso del array eléctrico se obtuvo un valor claramente por debajo de la concentración máxima permitida, mientras que en el fluorescente es ligeramente más alto. Además, los valores obtenidos con el sistema de lectura eléctrica son ligeramente mejores que los obtenidos con la medida fluorescente, lo que pone de manifiesto la mejora conseguida en nuestro sistema al implementar el array de micropocillos de PDMS.

4.5 Conclusiones

Se llevó a cabo la implementación de un array de micropocillos de PDMS fabricado por litografía blanda en el sistema de lectura de microarray, con el que se evitó los problemas de cross-talk químico y evaporación de los que adolecía el primer sistema desarrollado, mostrado en el capítulo anterior. Igualmente se mejoró la instrumentación asociada y se logró reducir el ruido eléctrico hasta 10 veces, haciéndolo despreciable. El potencial del array de micropocillos se demostró mediante la lectura de una microarray para boldenona, donde se consiguieron límites de detección muy inferiores a los valores máximos permitidos por la WADA además de conseguir sensibilidades muy similares con el sistema de lectura eléctrica a las obtenidas mediante la lectura fluorescente. Estos datos demuestran el importante avance que la integración de los pocillos de PDMS ha supuesto en el funcionamiento del sistema de lectura eléctrica de microarrays desarrollado.

Referencias

- [1] Xia Y, Whitesides GM. *Angew Chem, Int Ed* 1998; 37: 550–75.
- [2] Qin D, Xia Y, Whitesides GM. *Nat. Prot.* 2010; 5: 491-502.
- [3] Mi Y, Chan Y, Trau D, Huang P, Chen E. *Polymer* 2006; 47: 5124–5130.
- [4] Xu Y, Xie F, Qiu T, Xie L, Xing W, Cheng J. *Biomicrofluidics* 2012; 6: 016504.
- [5] World Anti-Doping Agency (WADA), 2004: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Archives/WADA_TD2009MRPL_Minimum_Required_Performance_Levels_V2.0_EN.pdf
- [6] European Commission, Directive 2003/74/EC, *Off. J. Eur. Commun. L*, 262, vol. 46, pp. 17-21, 2003.
- [7] Tort N, Salvador JP, Marco MP. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 403: 1361-1371.

CAPÍTULO V

FABRICACIÓN DE UN DISPOSITIVO FLUIDICO PARA EL LLENADO AUTOMÁTICO DEL ARRAY DE MICROPOCILLOS: AUTOMATIZACIÓN DEL SISTEMA DE LECTURA

A partir de los resultados alcanzados con el array de micropocillos de PDMS, se pensó en mejorar el proceso de lectura mediante la automatización del proceso de llenado de los pocillos y la limpieza posterior de los mismos una vez realizada la lectura de un microarray. Para ello se diseñó y fabricó un dispositivo microfluídico de PDMS. Este capítulo recoge la descripción de dicho dispositivo, su funcionamiento y la aplicación del sistema de lectura eléctrica para la medida de dos pesticidas.

5.1 Resumen

En este trabajo se desarrolló un dispositivo microfluídico que integra el array de micropocillos de PDMS descrito en el capítulo IV, junto con los componentes microfluídicos necesarios para realizar el llenado de los mismos con la disolución de medida así como llevar a cabo su vaciado y limpieza una vez realizada la lectura de un microarray. El dispositivo consta de canales de entrada individuales a cada uno de los pocillos del array para su llenado, al igual que pequeños orificios conectados a canales de salida en el área vacía existente alrededor de las juntas de los pocillos, que actúan a modo de sumideros para el vaciado de los pocillos y su lavado. El dispositivo microfluídico se puede posicionar sobre el array de IDEs, de manera análoga al array de micropocillos del capítulo anterior. Se evaluó su funcionamiento y se demostró el funcionamiento del sistema de lectura final mediante la lectura de los pesticidas atrazina y simazina, obteniéndose valores analíticos muy similares a los obtenidos

mediante lectura fluorescente y muy por debajo de los valores umbral admitidos en aguas.

5.2 Introducción

Durante los últimos años la tendencia a la miniaturización de los dispositivos en general es muy clara y el área de los equipos analíticos no es la excepción, donde el rápido desarrollo en esta área ha dado a lugar al concepto de laboratorio en un chip o microsistemas de análisis total (μ TAS). Estos sistemas de ensayo miniaturizados se han venido aplicando en diferentes áreas de la biología, incluyendo la genómica, la proteómica y los ensayos multianalito entre otros. Con respecto al campo de los inmunoensayos, se han venido desarrollando diferentes dispositivos microfluídicos para adaptar los convencionales ensayos ELISA a la microescala [1]. Los sistemas microfluídicos por su versatilidad, son herramientas que permiten la automatización de sistemas de lectura de microarrays, adaptándolos a los sistemas analíticos ya desarrollados como es el caso de nuestro sistema de lectura eléctrica de microarrays.

La atrazina y la simazina son herbicidas de la familia de las triazinas utilizados durante años para el control de malezas en la industria agrícola. La toxicidad de estas triazinas y su elevada persistencia en el medio ambiente derivó en la prohibición de su uso en la Unión Europea en 2005 y su inclusión en la lista de sustancias contaminantes prioritarias, cuya monitorización será de obligado cumplimiento en un futuro próximo [3, 4]. A pesar de estar prohibidos, debido a la utilización masiva de estos pesticidas en el pasado, es necesario llevar a cabo un riguroso control de la presencia de dichos compuestos triazínicos en aguas, suelos, etc.

La legislación europea establece una concentración máxima admisible en aguas de 2 ppb para atrazina y 4 ppb para simazina [4]. Esto niveles son similares a los establecidos por la EPA (*Agencia de Protección del Medio*

Ambiente) en Estados Unidos (3 ppb atrazina y 77 ppb simazina), donde el uso de atrazina y simazina, aunque restringido, aún está permitido [5].

Las técnicas más empleadas para la determinación de estos pesticidas en aguas son la cromatografía de líquidos (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), acopladas a espectrometría de masas (MS) [6]. En la búsqueda de alternativas más sencillas, rápidas y económicas, la EPA ha verificado en los últimos años, la utilización de diversos kits de análisis basados en inmunoensayos (<http://nepis.epa.gov>). Además de las ventajas citadas con anterioridad, los inmunoensayos presentan una gran sensibilidad y selectividad, basada en la elevada afinidad de la unión antígeno-anticuerpo. Dichos inmunoensayos pueden ser aplicados en formato microarray [7].

5.3 Sección Experimental

5.3.1 Diseño y fabricación del sistema microfluídico

Se diseñó un dispositivo en PDMS que incluye la plantilla con los micropocillos que confinan las gotas en cada punto.

Los motivos de la plantilla se dibujaron con CADENCE. Se dibujaron tres niveles de máscara, el primero contenía los pozos de 2mm de diámetro y 400 micras de profundidad, donde va cada IDE. El segundo nivel contenía los anillos que rodea cada pozo y el tercer nivel corresponde a los microcanales que distribuyen la solución de lectura dentro y fuera del sistema. Se fabricó la máscara y se realizó un master en SU-8, de forma análoga a la fabricación descrita en el capítulo 4. Igualmente, las microestructuras definidas en el máster se replicaron en PDMS siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 4, con la única variación que el porcentaje de polímero y agente entrecruzante fue de 1:5, en vez del 1:10 empleado anteriormente.

Se fabricaron las dos piezas de PDMS que forman el dispositivo flúidico. Estas se pegaron activando las superficies en un plasma de oxígeno y alineándolas empleando una estructura de autoalineamiento desarrollada en el grupo.

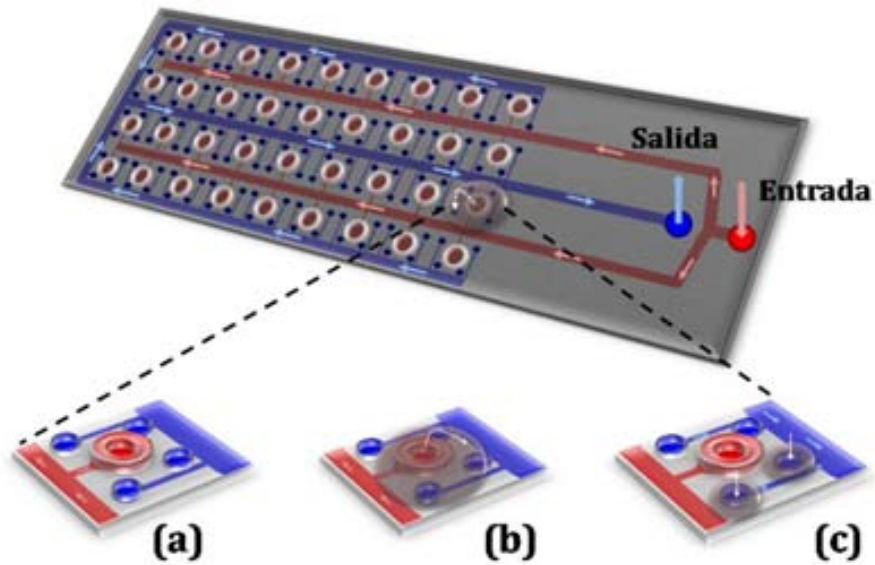


Figura 5.1. Esquema de la distribución de los canales de la microfluídica. El Canal rojo es el de llenado y el canal azul es el de vaciado. En uno de los puntos de medida se esquematiza el funcionamiento del sistema. a) El líquido es empujado desde el canal de entrada a cada punto de medida. b) El líquido sale del pocillo y cubre los cuatro desagües que rodean cada punto. c) Simultáneamente este líquido es aspirado hasta el canal de salida.

En la Figura 5.1 se puede ver esquematizado el sistema de microfluídica. Este sistema está formado por 2 microcanales principales, uno para distribuir la solución de medida en cada punto (el canal de entrada rojo) y el otro para recoger la solución después de cada medida (el canal salida azul). Del canal de entrada parten canales a cada pocillo. Además, cada pocillo está rodeado por cuatro orificios que hacen de desagüe. Por estos

agujeros de desagüe se recoge la solución de medida y la solución de limpieza después de cada medida.

5.3.2 Reactivos y materiales

Todos los reactivos empleados a excepción de los requeridos para realizar el inmunoensayo fueron los mismos que los empleados en el capítulo 4. Portaobjetos de vidrio (25x75 mm) modificados con polilisina fueron suministrados por Thermo y filtros centrífugos Amicon Ultra 0.5 mL, 100 kDa fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

5.3.3 Pesticidas y Haptenos

La atrazina, la simazina, los haptenos 2a, 2b y los *bioconjugados* 2a-BSA y 2b-BSA (BSA-albúmina de suero bovino) fueron facilitados por el Grupo de Nanotecnología y Diagnóstico (Instituto de Química Avanzada de Cataluña, IQAC-CSIC). Los *bioconjugados* de los haptenos 2a y 2b con BSA son utilizados para el tapizado de los sustratos de vidrio.

Ambos pesticidas son estructuralmente muy similares y su estructura química se muestra en la Figura 5.2.

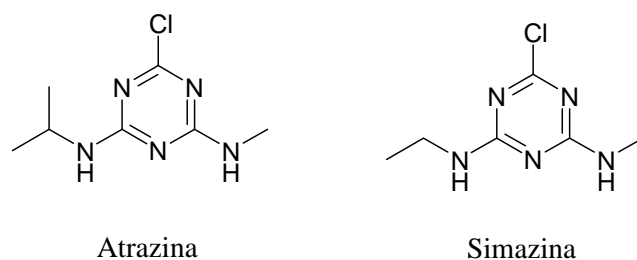


Figura 5.2. Estructura química de la atrazina y la simazina

5.3.4 Inmunoreactivos

Los antisueros policlonales de conejo As8 y As12 obtenidos utilizando mediante la inmunización de los conjugados 2c-KLH y 2d-KLH (KLH-hemocianina) respectivamente, también fueron facilitados por el *Grupo de Nanotecnología y Diagnóstico*.

El anticuerpo de ratón anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de tetrametilrrodamina (TRICT), empleado para los ensayos con lectura fluorescente y el anticuerpo biotinilado de ratón anti-IgG de conejo necesario para la medida eléctrica se compraron a Sigma-Aldrich.

Para realizar la lectura se empleó el conjugado estreptavidina- ureasa obtenida siguiendo el kit de conjugación descrito en el capítulo anterior.

5.3.5 Inmunoensayo enzimático competitivo indirecto

En un inmunoensayo competitivo de tipo indirecto el conjugado hapteno-proteína se encuentra inmovilizado, y el analito y el anticuerpo se añaden en disolución.

En nuestro caso, los bioconjugados hapteno-proteína (*2a-BSA* y *2b-BSA*) se inmovilizan sobre un sustrato de vidrio modificado con polilisina toda la noche a 4°C. A continuación, se añade la muestra incorporando un anticuerpo 2a-BSA 10 µg/mL en PBS pH 7.5 (As8) y 2b-BSA 5 µg/mL en PBS pH 7.5 (As12) capaz de interactuar selectivamente con el analito. Durante esta etapa, el analito presente en la muestra compite con el inmovilizado por el anticuerpo específico en disolución. La concentración de analito se mide de forma indirecta mediante la adición de un anticuerpo secundario (anti-IgG) unido covalentemente a la enzima marcadora.

En el conjugado de tapizado se utiliza una proteína diferente a la usada para inmunizar, con el fin de evitar que el anticuerpo reconozca tanto al analito como a la proteína de tapizado. Por ello, los sueros As8 y As12 obtenidos al inmunizar con KLH se ensayaron frente a conjugados de BSA.

Las concentraciones y tiempos de incubación de todas las etapas, excepto la reacción biotina-estreptavidina, exclusiva de la lectura eléctrica, fueron previamente optimizadas mediante lectura fluorescente. Los lavados

entre cada paso se realizaron con PBST. El bloqueo de la superficie con BSA 1% en PBS durante media hora. Las incubaciones se hicieron en PBST durante 30 min, con distintas concentraciones de pesticida libre ($10\mu\text{M}$ - 0.01 nM) y una dilución 1/500 del As8 y 1/2000 del As12. Después, la incubación con el anticuerpo anti-IgG de ratón (1/250 en PBST) marcado con biotina, se hizo durante media hora. Paralelamente, en el ensayo con lectura fluorescente se incubaba con un anticuerpo marcado con TRICT, la lectura del ensayo fluorescente (543 nm). Se etiquetó el ensayo incubándolo con ureasa marcada con estreptavidina en PBS a una disolución de 1/5000 durante media hora. Se hicieron los dos últimos lavados protocolizados con PBST y finalmente glicina. Y se procedió a la lectura eléctrica en 0.1 M urea en 250 mM glicina durante 30 min.

En la Figura 5.3 se puede observar un esquema del bioensayo desarrollado para esta aplicación.



Figura 5.3. Esquema de un bioensayo para detectar pesticidas

5.4 Resultados

En la Figura 5.4 se muestra el dispositivo microfluídico fabricado con los pocillos llenos con una disolución coloreada. Estos pocillos se han llenado inyectando la disolución a través del canal de entrada y se puso de manifiesto que se podían llenar los 36 pocillos del array de forma simultánea en pocos segundos. La Figura 5.4 muestra un detalle de seis pocillos, donde se aprecian los canales de acceso a los mismos así como los 4 orificios alrededor de cada uno de ellos conectados a sus

correspondientes microcanales y al canal de desagüe, empleados para realizar el vaciado y lavado posterior del dispositivo.

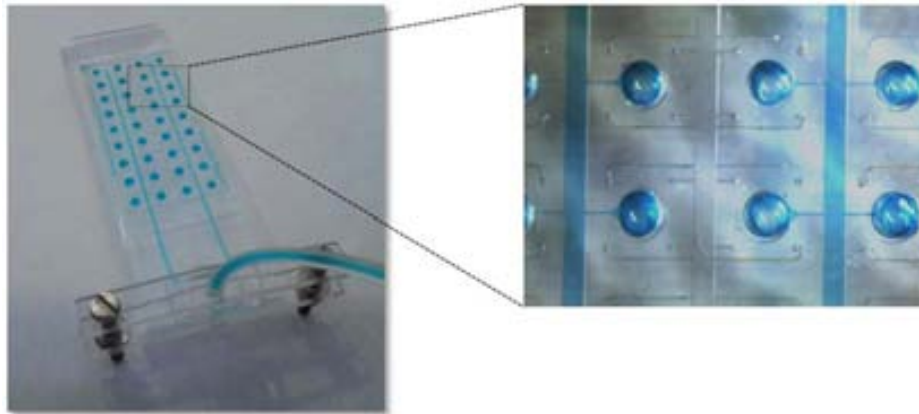


Figura 5.4 Imágenes del dispositivo fluídico fabricado

En las Figuras 5.5 y 5.6 se puede observar las curvas de calibrado obtenidas en la lectura eléctrica de los microarrays realizados siguiendo los protocolos de inmunoensayo descritos en la sección anterior. Para realizar las curvas se tomó como respuesta analítica del lector eléctrico, la pendiente del perfil de respuesta entre 400 y 600 s. Como se puede observar, el As 8 responde de manera similar a ambos pesticidas, mientras que el As12 presenta una mayor sensibilidad para la atrazina.

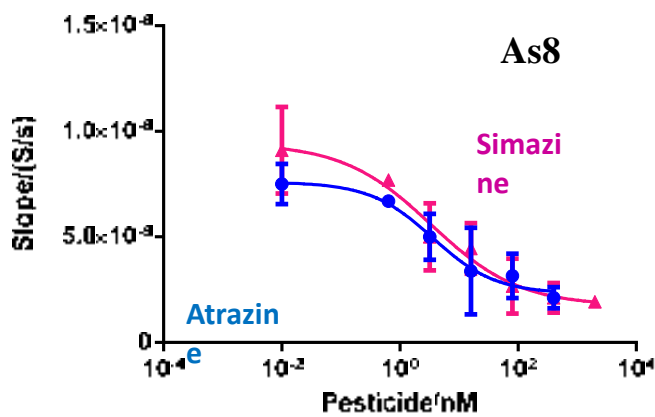


Figura 5.5. Resultados de la lectura eléctrica de array de proteínas As8. Los valores son la media de las medidas de cuatro puntos del array, siendo las barras de error, la desviación estándar de dichas medidas.

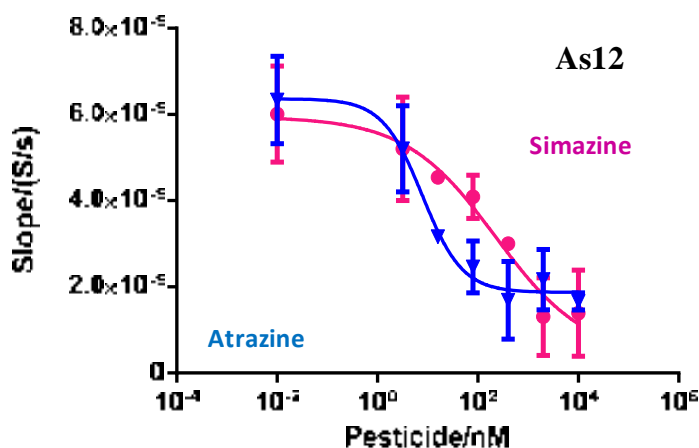


Figura 5.6. Resultados de la lectura eléctrica de array de proteínas As12. Otros datos como en la Figura 5.5.

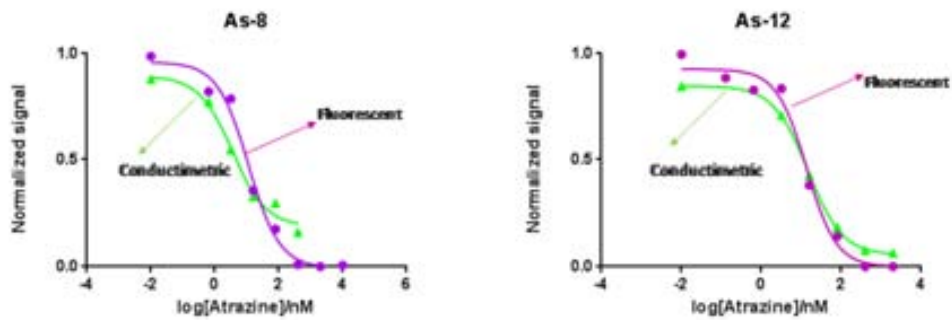
Los límites de detección, calculados como la concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco del 10% están por debajo de los valores máximos permitidos por la legislación, tal y como se puede observar en las tablas de la figura 5.6. El IC_{50} es la concentración que provoca un 50% de disminución de la señal máxima y se corresponde con el punto de inflexión de la curva.

ATRAZINE	IC_{50} (nM)	IC_{50} (ppb)	LD (nM)	LD (ppb)
As8	3,59	0.77	0,24	0.05
As12	7,84	1.69	1,04	0.22

SIMAZINE	IC_{50} (nM)	IC_{50} (ppb)	LD (nM)	LD (ppb)
As8	3.38	0.68	0.07	0.01
As12	225	45	2.4	0.48

Figura 5.7. Tablas con los parámetros analíticos extraídos de las curvas de calibrado mostrados en las Figuras 5.5. y 5.6.

La sensibilidad obtenida empleando el sistema de lectura eléctrico es muy similar a la registrada mediante la lectura fluorescente, tal y como se aprecia en la Figura 5.8.



As8	IC ₅₀ (ppb)	LD(ppb)
Fluorescent	2.55	0.12
Conductimetric	0.77	0.05

As12	IC ₅₀ (ppb)	LD(ppb)
Fluorescent	1.69	0.40
Conductimetric	2.28	0.22

Figura 5.8. Resultados comparativos de los dos estudios realizados en paralelo con el sistema de lectura eléctrica y el fluorescente.

5.5 Conclusiones

Se desarrolló un dispositivo microfluídico con el que llevar a cabo la automatización del sistema de lectura eléctrico, que incluye el array de micropocillos y los componentes fluídicos necesarios para su llenado simultáneo y su lavado posterior una vez realizada la lectura de un microarray.

Par demostrar el sistema de lectura una vez implementado el dispositivo microfluídico, se llevó a cabo la lectura eléctrica de un microarray para la medida de atrazina y simazina, obteniéndose límites de detección más bajos que los valores umbral permitidos por la Unión Europea en aguas. Igualmente se consiguieron valores analíticos similares a los obtenidos con el array fluorescente, con lo que podemos concluir que el sistema de lectura eléctrico desarrollado en este trabajo es una alternativa real a los sistemas fluorescentes tan estudiados y comercializados [8].

Referencias

- [1] Yakovleva, J. Et al. *Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection*. Biosensors and Bioelectronics 19 (2003) 21-34.
- [2] Bonilla, D. Et al. *Electrical Readout of Protein Microarrays on Regular Glass Slides*. Anal. Chem. 2011, 83, 1726–1731
- [3] Regulación del Parlamento Europeo y del Consejo (EC) 689/2008 (Anexo I).
- [4] Directiva de Parlamento Europeo y del Consejo 2008/105/CE.
- [5] EPA 822-S-12-001. 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories
- [6] Islam, DFK. Et al. *Fast detection of triazine herbicides on a microfluidic chip using capillary electrophoresis pulse amperometric detection*. Microelectronic Engineering 97 (2012) 391–395.
- [7] Morales, S. Et al. *Multiplexed Microimmunoassays on a Digital Versatile Disk*. Anal. Chem. 2009, 81, 5646–5654
- [8] Nagl, S. Et al. *Fluorescence Analysis in Microarray Technology*. Microchim Acta 151, 1-21 (2005)

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema de lectura eléctrica de microarrays que incluye un array de transductores interdigitados, con los cuales poder detectar cambios en la conductividad de una solución. Con el fin de acoplar el sistema de lectura a los microarrays se empleó la ureasa como marca en los inmunoensayos aplicados, teniendo en cuenta el cambio en conductividad que tiene lugar cuando la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y genera las especies iónicas bicarbonato y amonio en disolución.

La particularidad que tiene este sistema de lectura es que permite trabajar con microarrays desarrollados sobre sustratos de vidrio convencionales y es reutilizable, siendo este el primer sistema eléctrico de estas características reportado hasta la fecha. El sistema permite alinear un microarray de tal forma que cada punto del mismo coincida con un transductor del sistema. Ambos se ponen en contacto mediante la disolución de medida. Así, durante la lectura, los cambios de conductividad que tienen lugar en la misma, directamente relacionados con la concentración del analito a través del uso de la marca ureasa, pueden ser medidos con el transductor.

Para realizar dicha lectura se diseñó y fabricó una instrumentación de medida tipo fila-columna capaz de analizar una gran cantidad de puntos en muy poco tiempo.

El trabajo fue incremental de tal forma que se consiguieron los siguientes avances:

1. Inicialmente como prueba de concepto se demostró la lectura eléctrica de microarrays de proteínas en sustratos de vidrio convencionales. Se realizó la lectura de un microarray para un analito modelo, una inmunoglobulina de ratón, donde se puso de manifiesto la viabilidad del sistema de lectura propuesto y su buen funcionamiento. La sensibilidad y los límites de detección fueron sensiblemente más elevados que los obtenidos mediante lectura fluorescente. Se planteó que tales resultados se debían a problemas de cross-talk eléctrico y químico así como efectos debidos a la evaporación de las gotas de solución de medida.
2. En un segundo trabajo se demostró la mejora en el funcionamiento del sistema de lectura eléctrica para microarrays basada en la implementación de un array de micropocillos de PDMS. Se evaluó su funcionamiento mediante la lectura de un microarray para la hormona boldenona. Se obtuvieron resultados con límites de detección y sensibilidad similares a los obtenidos con el sistema de lectura fluorescente, con la ventaja de que solo se requirió nuestra instrumentación compacta y de precio óptimo. Los resultados de este enfoque pueden contribuir al desarrollo de esta plataforma analítica y sus aplicaciones para descentralizar diagnósticos PoC.
3. Finalmente en un tercer trabajo se logró automatizar el proceso de medida del sistema de lectura mediante la implementación de un array de micropocillos de PDMS que incluían los componentes microfluídicos necesarios para el llenado automático de los mismos y su lavado posterior tras cada medida. Se demostró el buen funcionamiento del sistema mediante la lectura de un microarray para la medida de los pesticidas atrazina y simazina, obteniéndose resultados muy similares a los registrados mediante la lectura fluorescente.

A partir de estos resultados podemos decir que el sistema de lectura eléctrico propuesto puede ser una alternativa real a los sistemas de lectura fluorescentes usados de forma habitual en laboratorios de ensayo, con la ventaja añadida de ser un sistema mucho más barato, compacto y que permitiría descentralizar este tipo de ensayos y, con ello, aplicarlo a la detección de una mayor variedad de analitos de interés en los campos del diagnóstico y el medioambiente.

Como trabajo futuro se abre la puerta a la miniaturización del dispositivo y el aumento de la densidad de puntos de lectura, con el fin de mejorar el rendimiento del sistema de lectura y acercarse un poco más a los microarrays de fluorescencia actualmente en uso.