



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

Tesis Doctoral

**Dendrímeros Antigénicos fijados sobre
nanopartículas para diagnóstico *in vitro* de alergia
a fármacos**

Programa de Doctorado: Química y Tecnologías Químicas. Materiales y Nanotecnología.

Directores: Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y Dra. Yolanda Vida

Violeta Isabel Gil Ocaña


2022





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Violeta Isabel Gil Ocaña

 <https://orcid.org/0000-0003-0979-2406>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Violeta Gil Ocaña

Estudiante del programa de doctorado QUÍMICA Y TECNOLOGÍAS QUÍMICAS. MATERIALES Y NANOTECNOLOGÍA de la Universidad de Málaga, autora de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: DENDRÍMEROS ANTIGÉNICOS FIJADOS SOBRE NANOPARTÍCULAS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO DE ALERGIA A FÁRMACOS

Realizada bajo la tutorización de la Dra Yolanda Vida Pol y dirección del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y la Dra. Yolanda Vida Pol.

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 29 de 03 de 2022

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Fdo.: Doctorando/a | Fdo.: Tutor/a |
| Fdo.: Director/es de tesis | |



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dicen que todas las experiencias suman aprendizajes, y que estos te cambian. Esto ha sido para mí la tesis Doctoral, una experiencia y un gran aprendizaje. Es por eso que quiero empezar agradeciendo al Dr. Ezequiel Pérez de Inestrosa y a la Dra. Yolanda Vida Pol por darme la oportunidad de realizarla y por guiarme y aconsejarme en todos los momentos en los que he necesitado su ayuda.

En segundo lugar, pero no menos importante, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio de LDBF por las horas y los momentos vividos. En especial a Noemí, Desi y Anjara que han sido manos, oídos y ojos cuando a mí me fallaban, de corazón gracias. Gracias también a Esther e Irene, que, aunque llegaron tarde, tiene un hueco en mi corazón.

Este trabajo no se podría haber realizado sin la ayuda y colaboración del laboratorio de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga. Gracias Lina, Pepa y Maribel, muchas son las horas que hemos discutido y comentado experimentos. Me llevo un gran aprendizaje de todas vosotras, en especial de Maribel con la que he podido compartir mucho más tiempo.

Agradecer también a la financiación del instituto de salud Carlos III y a la red ARADyAL (red de Asma, Reacciones Adversas a Fármacos y Alergia) por hacer posible la realización de este trabajo de tesis doctoral.

Agradecer también a mis compañeros de laboratorio de alergias. Gracias Jose por los RAST, el cine y el pique continuo, la Bioquímica nunca será Química. Gracias JuanLu por ser mi fiel compañero de nanopartículas, en cuanto llegaste me sentí comprendida en este solitario mundo. Por último, GRACIAS Patri, por los momentos en el Ultra-Violeta y por tú apoyo constante e incondicional.

Gracias a Bionand, a sus infraestructuras, imprescindibles en el desarrollo del trabajo y a todos cada uno de los técnicos y personal de BIONAND, todos realizáis un trabajo impecable, si Bionand es un centro de excelencia es gracias a que todos sois excelentes. En especial a Roberto, Diana y María, muchas son las conversaciones y los desayunos que hemos compartido juntos.

Al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga y a sus profesores, por las enseñanzas y la curiosidad transmitida todos estos años por la Química Orgánica. Agradecer también al personal de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga, en particular a la unidad de Espectroscopía XPS y a la unidad de radioisótopos de la UMA, Eli, Sergio y Gabi, muchas han sido las despedidas que no eran ciertas, pero ahora si ha llegado el momento.

Gracias también a mis amigos, Johan, Ale, Mari Ángeles y Leti, por los cafés, las comidas y los “necesito hablar” cuando las cosas no iban del todo bien, sois una constante y un gran apoyo en mi vida. Mención especial a Sagrario, que tiene siempre la frase correcta en el momento perfecto. Gracias también a María, que con sus manos y el realfooding ha quitado todas las tensiones generadas. Y como olvidar a Javi y Rafa, que lo que Riviera unió no lo separe nadie

A mi pilar, mi familia, mis padres y mi hermano. Ellos siempre han creído en mí, me han apoyado y me han ayudado. Gracias por enseñarme a ser quien soy, por darme la oportunidad de elegir mi camino y por no juzgar ninguna de mis decisiones. Si he llegado hasta aquí ha sido por vosotros, os quiero.

A mis tías Gabi y Mari, y a mis abuelas María e Isabel por las risas, y por tener la gran fortuna de que seáis como mis segundas madres.

A mi familia política, por apoyarme, escucharme y aguantarme cuando ni yo lo hacía, si he tenido fuerzas es por los fideos guisados de los sábados en Sanlúcar. En especial a Marina, por sus clases de Biología y su apoyo

Por último, gracias a Juan, mi compañero, amor y mi mejor amigo. Sólo tú sabes todo lo que ha significado tenerte a mi lado en esta experiencia. Amor con churros por y para siempre.

A mis abuelos,
allá donde estén
gracias.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------|--|
| ACF | Administración Controlada de Fármacos |
| ADN | Ácido dexosirribonucleico |
| AFM | Microscopía de Fuerza Atómica (<i>Atomic Force Microscope</i>) |
| APTES | 3-(AminoPropil)TriEtoxiSilano |
| AuNP | Nanopartículas de Oro (<i>Gold Nanoparticles</i>) |
| AX | Amoxicilina |
| AXO | Amoxiciloilo |
| AXO-IgE | IgE selectiva de Amoxicilina |
| BAT | Test de Activación de Basófilos (<i>Basophil Activation Test</i>) |
| BLs | Betalactámicos |
| BP | Bencilpenicilina |
| BPO | Bencilpeniciloilo |
| BPO-IgE | IgE selectiva de Bencilpenicilina |
| Bu-AXO | Conjugado Amoxicilina-Butilamina |
| Bu-BPO | Conjugado Bencilpenicilina-Butilamina |
| CLV | Ácido Clavulánico |
| CPC | Contador de Condensación de Partículas (<i>Condensation Particle Counter</i>) |
| Curva ROC | Curva Característica Operativa del Receptor (<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>) |
| CVD | Deposición de Vapor Químico (<i>Chemical Vapor Deposition</i>) |

| | |
|-------------------------|--|
| DeAns | Dendrímero Antigénico (<i>Antigens Dendrimers</i>) |
| DHR | Reacciones de Hipersensibilidad a Fármacos (<i>Drugs Hypersensitivity Reactions</i>) |
| DLS | Dispersión de Luz Dinámica (<i>Dynamic Light Scattering</i>) |
| DMA | Analizador de Movilidad Diferencial (<i>Differential Mobility Analyzer</i>) |
| DMF | Dimetil-formamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DRX | Difracción de Rayos X |
| EAACI | Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (<i>European Academy Of Allergy And Clinical Immunology</i>) |
| EDCI | (1-(3-dimetilamino) propil)3- etilcarbodiimida hidrocloreuro |
| EG | Etilenglicol |
| FDA | Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drugs Administration</i>) |
| FTIR | Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>) |
| ¹HRMN | Resonancia Magnética Nuclear de Protón |
| HSA | Albumina de Suero Humano (<i>Human Serum Albumin</i>) |
| IgE | Inmunoglobulina E (<i>Inmunoglobulin E</i>) |
| IgG | Inmunoglobulina G (<i>Inmunoglobulin G</i>) |
| IgM | Inmunoglobulina M (<i>Inmunoglobulin M</i>) |
| LSPR | Resonancia de Plasmón de Superficie (<i>Surface Plasmon Resonance</i>) |
| MRI | Imagen por Resonancia Magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>) |
| NHS | N-Hidroxisuccinimida |

| | |
|----------------|--|
| NNI | Iniciativa Nacional de Nanotecnología (<i>National Nanotechnology Initiative</i>) |
| NPs | Nanopartículas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAMAM | Dendrímeros de Poliaminoamida |
| PBS | Tampón Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>) |
| PC | Prueba cutánea |
| PEG | PoliEtilenGlicol |
| PLL | Poli-L-Lisina |
| QD | Puntos Cuánticos (<i>Quantum Dots</i>) |
| RAF | Reacciones adversas a Fármacos |
| RAST | Test de Radio Alergo Absorbencia (<i>Radio Alergo Sorbent Test</i>) |
| RIA | RadiolInmunoEnsayo (<i>RadiolInmunoAssay</i>) |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>) |
| SI | Sistema Internacional de Unidades |
| SMPS | Escáner de Movilidad de Tamaño de Partícula (<i>Scanning Mobility Particle Sizer</i>) |
| STM | Microscopía de Efecto Túnel (<i>Scanning Tunneling Microscope</i>) |
| TEA | TriEtilAmina |
| TEM | Microscopía de Transmisión Electrónica (<i>Transmission Electron Microscopy</i>) |
| TEM/EDX | Microscopía Electrónica de Barrido con Energía dispersiva de Rayos X (<i>Transmission Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Analysis</i>) |

| | |
|-------------|---|
| TEOS | TetraEtilOrtoSíliceto |
| UV | Ultra-Violeta |
| WAO | Organización Mundial de la Alergia (<i>World Allergy Organization</i>) |
| XPS | Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>) |

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE..... | 13 |
| CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN | 17 |
| I.1. Nanotecnología y nanomedicina..... | 19 |
| I.2. Nanomateriales..... | 24 |
| I.2.1. Nanopartículas..... | 26 |
| I.3. Nanopartículas para diagnóstico <i>in vitro</i>..... | 28 |
| I.4 Diagnóstico <i>in vitro</i> de alergias..... | 30 |
| I.4.1. Alergias..... | 30 |
| I.4.2. Alergias a fármacos:..... | 32 |
| I.4.3. Test de detección <i>in vitro</i> de alergias a fármacos..... | 34 |
| CAPÍTULO II OBJETIVOS..... | 39 |
| CAPÍTULO III PARTÍCULAS PARA RAST..... | 43 |
| III.1 Introducción..... | 45 |
| III.2. Partículas de sílice con determinante antigénico mixto DeAn@SiO₂..... | 51 |
| III.2.1. Síntesis de partículas de Sílice..... | 51 |
| III.2.2. Modificación química de la superficie de las partículas..... | 54 |
| III.2.3. Funcionalización de las partículas con el fármaco a evaluar..... | 56 |
| III.2.4. Caracterización de las partículas obtenidas..... | 58 |
| III.2.6. Ensayos RAST con 500 nm DeAn@SiO ₂ | 65 |
| III.3. Partículas de núcleo magnético..... | 77 |
| III.3.1. Introducción..... | 77 |
| III.3.2. Síntesis de partículas magnéticas (Fe ₃ O ₄)..... | 78 |
| III.3.3. Recubrimiento de sílice..... | 83 |
| III.3.4. Modificación química de la superficie de las nanopartículas..... | 87 |
| III.3.5. Funcionalización de las partículas con el determinante antigénico..... | 88 |
| III.3.6. Caracterización..... | 89 |
| III.3.7. Ensayos RAST con DeAn@Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ | 99 |
| CAPÍTULO IV NANOPARTÍCULAS DE SILICE PARA BAT | 121 |
| IV.1. Introducción..... | 123 |
| IV.2. Síntesis de nanopartículas de sílice 50nm y 20nm SiO₂..... | 125 |
| IV.3. Modificación química de la superficie de las partículas de sílice de 50 y 20 nm, SiO₂-De..... | 131 |
| IV.4. Funcionalización de las partículas de sílice de 50 y 20nm con el determinante antigénico, DeAn@SiO₂..... | 131 |

| | |
|--|------------|
| CAPITULO V CONCLUSIONES..... | 141 |
| CAPÍTULO VI EXPERIMENTAL | 145 |
| VI.1. Reactivos, disolventes y técnicas analíticas..... | 147 |
| VI.2. Procedimientos generales. | 149 |
| VI.2.1. Test de Ninhidrina: cuantificación de los grupos aminos primarios..... | 149 |
| VI.2.2. Protocolo RAST con partículas. | 149 |
| VI.2.3. Protocolo Inhibición de RAST con partículas..... | 149 |
| VI.2.4. Protocolo de marcaje del anticuerpo I ¹²⁵ | 150 |
| VI.3. Síntesis de partículas de sílice y óxido de hierro funcionalizadas con determinantes antigénicos..... | 150 |
| VI.4. Cálculos. | 157 |
| CAPITULO VII REFERENCIAS..... | 165 |
| APÉNDICE TABLAS..... | 179 |
| RESUMEN..... | 197 |

CAPÍTULO I ***INTRODUCCIÓN***



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I.1. Nanotecnología y nanomedicina.

El ser humano ha mostrado a lo largo de toda la historia una gran habilidad a la hora de modificar la naturaleza a gran escala para lograr beneficiarse de esta. Ejemplo de ello son algunas construcciones como las pirámides de Egipto, la gran muralla China o el *Empire State*. Sin embargo, no queda muy bien definido el momento exacto en el cual se empezaron a aprovechar las ventajas de las dimensiones nanométricas de los materiales.

Los primeros registros constan en el siglo IV a.C., con los vidrieros romanos y la fabricación de cristales coloreados que contenían nanopartículas de metales, como las que se encuentran vidrieras de ciertas catedrales (Catedral de Notre Dame en París) o la copa de Licurgo (museo británico en Londres), compuesta de vidrio de sosa y cal, conteniendo nanopartículas de oro y plata. Estas nanopartículas le confiere ese cambio de color de verde a rojo cuando se le introduce una fuente luminosa en su interior (Figura 1).¹

No fue hasta tiempos más recientes donde se empezó a poner un mayor interés en esta fascinante área. En 1959 Richard Feynman con su famosa conferencia titulada “*There is plenty of room at the bottom*”, proporcionó un despertar en su desarrollo gracias a la proposición de manipular los átomos individualmente para poder construir pequeñas estructuras que poseyeran la mayor variedad de propiedades posibles.

No obstante, no sería hasta 1974 cuando se crearía el concepto “Nanotecnología” por el profesor japonés Taniguchi Norio de la Universidad de Ciencias de Tokio, el cual decía: ^{2,3}

“La nanotecnología consiste en el procedimiento de separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo o molécula por molécula”

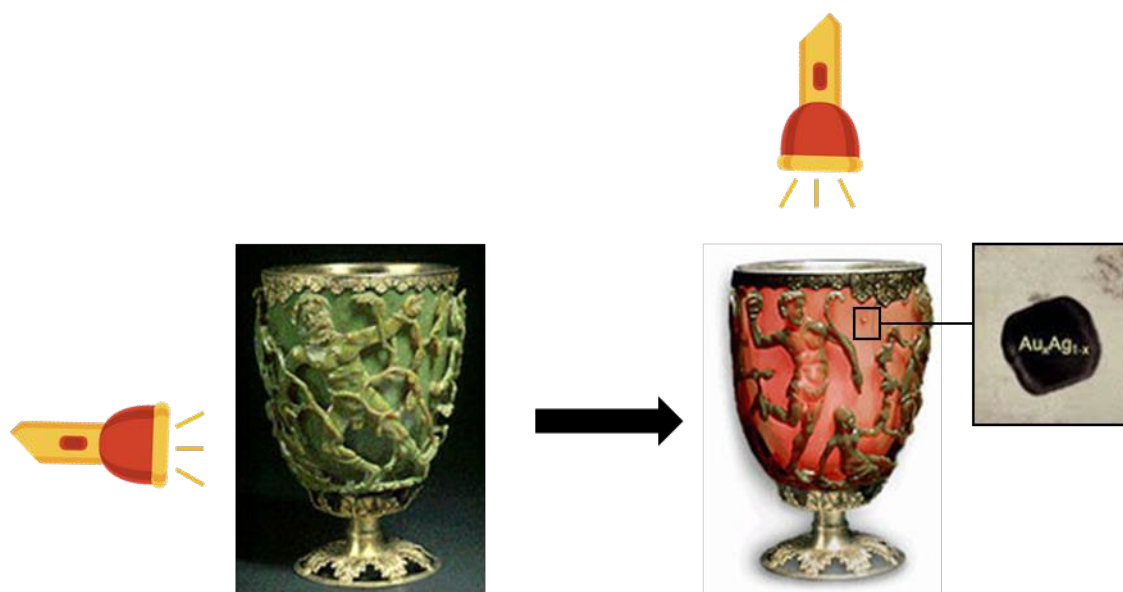


Figura 1. Color cambiante de la copa de Licurgo debido a la introducción de una fuente luminosa.

Sin embargo, el verdadero desarrollo de la nanotecnología sucedió en los años 80, con la aparición y el avance de nuevas técnicas más apropiadas para el estudio y fabricación de nanoestructuras, como el microscopio de efecto túnel (*Sanning Tunneling Microscope*, STM),⁴ el microscopio de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope*, AFM),⁵ la difracción de rayos X (DRX)⁶ o el microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM).⁷ Gracias a ello, se fueron descubriendo nuevos materiales con propiedades únicas, de los cuales surgían multitud de aplicaciones en diferentes campos como la óptica, la medicina, la cosmética, la construcción o la industria alimentaria.

El término “Nanotecnología” se refiere al desarrollo de la investigación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a una escala nanométrica. Un nanómetro (nm) supone la mil millonésima parte de un metro y actualmente tiene la aceptación en el Sistema Internacional de Unidades (SI). Esta escala está muy cercana al tamaño de átomos y moléculas, un nanómetro sería aproximadamente diez veces la longitud de un enlace simple C-C o el grosor de una doble hélice de ADN (2,2-2,6 nm) (Figura 2).^{8,9}

Esta nueva rama de la ciencia involucra áreas fundamentales como son, los minerales y la agroindustria, los dispositivos médicos y salud, la energía y medio ambiente, los materiales y su fabricación, la electrónica y la información y comunicaciones.

Sin embargo, las áreas donde más se han aplicado estos avances han sido la informática, la biología y la construcción.¹⁰

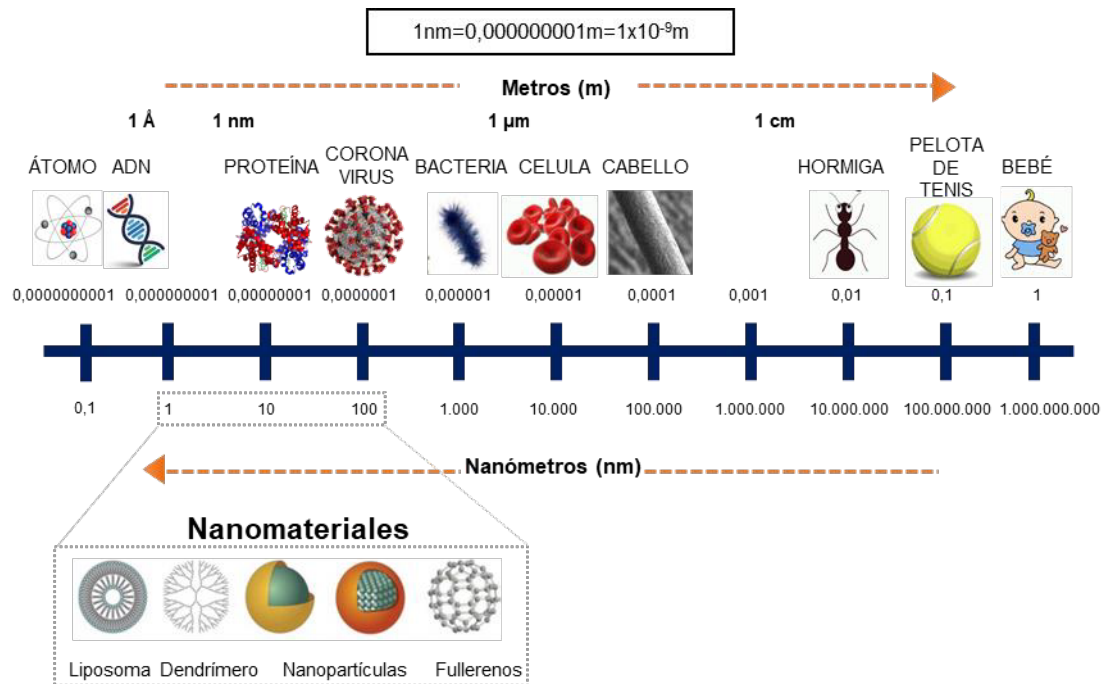


Figura 2. Representación gráfica de la escala de dimensiones.

La nanotecnología trabaja generalmente con dispositivos en una escala entre 0,1 y 100 nm, aunque dependiendo de la aplicación, puede cambiar esta denominación. Según Agencia Estatal Americana de Investigación y Nanotecnología, la *US National Nanotechnology Initiative* (NNI): “ la nanotecnología tiene interés por los materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas significativamente mejoradas, así como los fenómenos y procesos debidos a su escala nanométrica”.¹¹

Una definición general para acuñar este término debe de implicar los siguientes constituyentes interrelacionados entre sí:

- ◆ Dimensiones a nanoescala de todo el sistema o de los componentes principales.
- ◆ Uso de materiales sintéticos y con características únicas que surgen debido a su tamaño nanoscópico.¹²

La irrupción de la nanotecnología con aplicación en el campo de la medicina, tanto en terapia como diagnóstico, ha dado lugar a una nueva disciplina denominada nanomedicina. El objetivo principal de esta, se centra en el desarrollo de nuevas herramientas que permitan diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades y traumatismos, aliviar el dolor, preservar y mejorar la salud humana.¹³

Literalmente, nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología a la medicina, y aunque bien es cierto que está relacionado en ciertos aspectos con la nanobiotecnología, estas se diferencian en que la primera se centra en las aplicaciones de los conceptos de la nanotecnología a la medicina, mientras que la segunda abarca toda la investigación básica a nivel nanoscópico sobre sistemas biológicos.

Capítulo I

La medicina molecular, sin embargo, parte de un enfoque bioquímico más convencional donde el enfoque básico es eliminar las células enfermas más rápido que las células sanas. La nanomedicina intenta utilizar enfoques más sofisticados para matar células específicas o repararlas mediante el uso de biosensores.

Por lo tanto la nanomedicina no solo necesita aplicar y adoptar conceptos de nanotecnología, si no que al mismo tiempo necesita aportar información a la nanotecnología de manera que ambos campos se desarrollen paralela y conjuntamente.¹⁴

Los primeros datos de aplicación de la nanotecnología en medicina se describieron por primera vez en la década de los 60, con el desarrollo de los primeros sistemas de administración controlada de fármacos (ACF), basados en la encapsulación de fármacos en liposomas. En la actualidad ya se han descrito y aprobado una serie de nuevas nanoestructuras de diferente naturaleza para su aplicación en medicina.¹⁵⁻¹⁷ Entre ellos cabe destacar nanosistemas inorgánicos como nanopartículas (NPs) de sílice o metálicas, orgánicos como polimerosomas, nanopartículas poliméricas o hidrogeles y materiales híbridos. Algunos ejemplos de estas nanoestructuras comerciales aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) con aplicación en medicina se pueden observar en la tabla 1.

Las áreas de trabajo principales de la nanomedicina son:

- ◆ El nanodiagnóstico, que consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles tanto *in vivo* como *in vitro*.
- ◆ La nanoterapia, que pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios.
- ◆ La medicina regenerativa, que tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas.¹⁸⁻²⁰

Tabla 1. Nanoestructuras comerciales aprobadas por la FDA.

| NANOESTRUCTURAS COMERCIALES | | | |
|------------------------------------|-------------------------|--|---|
| Material empleado | Nombre comercial | Estructura química | Efecto terapéutico |
| NPs poliméricas | Copaxone® | Acetato de glatirámero | Inmunomodulador contra la esclerosis múltiple |
| | Neulasta® | ADN recombinante de E. Coli con polietilenglicol | Neutropenia producida por la quimioterapia |
| | Plegridy® | Interferón gamma beta-1° PEGilado | Esclerosis múltiple |
| | Adynovate® | Factor VIII antihemofílico PEGilado | Hemofilia A |
| | Eligard® | Ácido poliláctico-co-glicólico | Cáncer de próstata |
| Micelas poliméricas | Estrasorb® | Emulsión de estradiol | Síntomas vasomotores de la menopausia |
| NPs liposomales | Onivyde® | Irinotecán liposomal | Cáncer de páncreas |
| | Doxil® | Doxorrubicina liposomal PEGilada | Sarcoma de Kaposi |
| | Ambisome® | Anfotericina B liposomal | Antifúngico |
| | Visudyne® | Verteporfina liposomal | Degeneración macular asociada a la edad |
| NPs proteicas | Abraxane® | Paclitaxel ligado a albúmina | Cáncer de mama, páncreas y pulmón |
| | Ontak® | Denileukin difititox | Antagonista del receptor de IL-2 |
| NPs inorgánicas | Feraheme® | Ferumoxytol | Tratamiento de la anemia en pacientes que tienen enfermedad renal o pacientes que no pueden tomar hierro vía oral |
| | Feridex® | Ferumóxidos | |
| | Venofer® | Hierro sacarosa | |
| | Ferrlecit® | Gluconato férrico | |
| | Dexferrum® | Hierro Dextrán | |
| NPs cristalinas | Rapamune® | Sirolimus | Inmunosupresor |
| | Tricor® | Fenofibrate | Reducir el colesterol y triglicéridos |
| | Emend® | Aprepitant | Antagonista del receptor de la neurocinina 1 |

I.2.Nanomateriales.

Los materiales de tamaño nanométrico presentan propiedades morfológicas más pequeñas que un micrómetro en al menos una de las tres dimensiones, a pesar del hecho de que no hay consenso sobre el tamaño mínimo o máximo de un nanomaterial.²¹

En la actualidad existen varios criterios para establecer una categorización dentro de los nanomateriales. Una de estas se basa en la clasificación según sus dimensiones o la de alguno de sus componentes. De tal forma que se establecen cuatro categorías: 0D, 1D, 2D y 3D, indicándose con esta nomenclatura el número de dimensiones de la nanoestructura que superan el rango de la nanoescala.

De este modo, y según la definición inicial de nanomaterial no deberían incluirse en la categoría de nanoestructura/nanomaterial los materiales clasificados como 3D, ya que todas sus dimensiones serán mayores de la nanoescala. Sin embargo, se consideran materiales nanoestructurados 3D a aquellos en los que se utilizan nanoestructuras 0D, 1D o 2D como “bloques de construcción” para crear la nanoestructura 3D. En este caso, los “bloques de construcción” deben de replicarse en las 3 direcciones del espacio de forma ordenada (Figura 3).^{19,22}

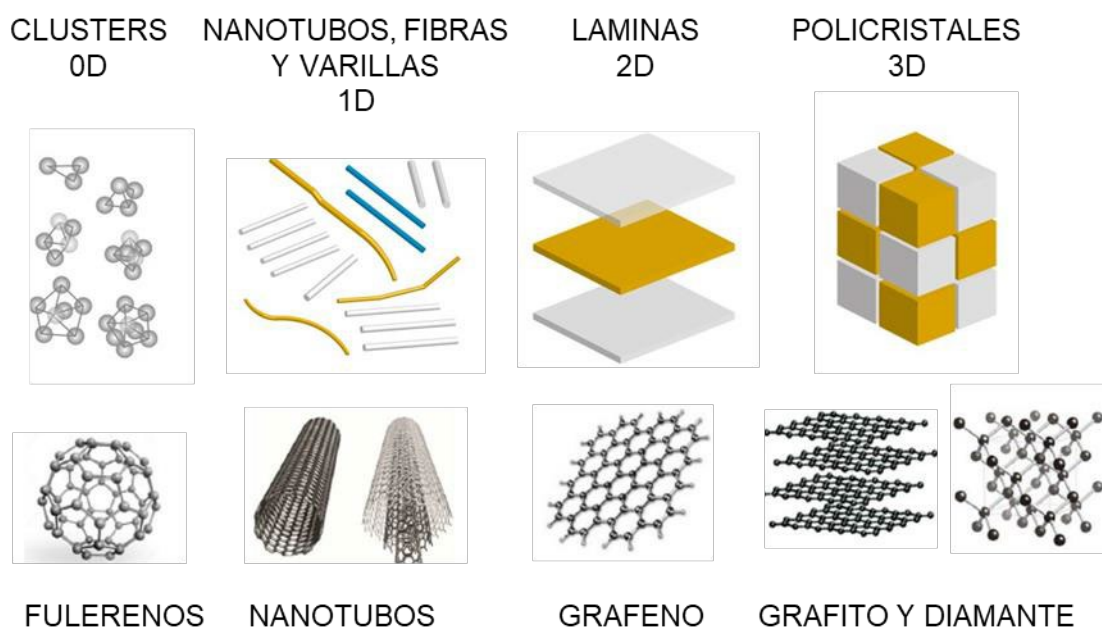


Figura 3. Clasificación de nanomateriales de acuerdo con sus dimensiones.

La síntesis o fabricación de estos materiales nanométricos se puede llevar a cabo mediante dos estrategias que no difieren excesivamente de las técnicas tradicionales en la fabricación de dispositivos a tamaño microscópico. Ambas aproximaciones son diametralmente opuestas, por un lado, tenemos las técnicas descendentes “*top-down*” y por otro las técnicas ascendentes o “*bottom-up*”.

La técnica “*top-down*” utiliza medios físicos o químicos para moldear y/o esculpir el dispositivo deseado partiendo de una pieza mayor. Es un método muy exigente, pero a su vez muy eficaz para la fabricación de dispositivos de este tamaño y requiere el uso de técnicas con precisiones nanométricas. Este tipo de técnicas de fabricación se originaron como una continuación de las técnicas de microfabricación utilizadas en la industria de semiconductores, y se basan principalmente en métodos ópticos o fotolitográficos. Esta técnica permite hacer grabados mediante radiación UV o láser o bien imprimir patrones de apenas nanómetros de anchura de diferentes materiales sobre una lámina fina de otro material mediante el uso de puntas de AFM. Sin embargo, presenta una limitación a la hora de construir los dispositivos ya que depende de la longitud de onda que se aplique al material.

La técnica “*bottom-up*” parte de unidades básicas que se ensamblan entre ellas para construir un dispositivo mayor. Esta es la técnica que utiliza la naturaleza para ensamblar pequeñas unidades estructurales como nucleótidos o aminoácidos con un control estructural, construyendo así nanomateriales con formas, propiedades y funciones muy definidas. Esta metodología tiene el potencial de generar dispositivos funcionales multicomponentes mediante el ensamblaje controlado de átomos y moléculas, sin desperdicio ni necesidad de fabricar o eliminar partes del sistema.

Sin embargo, a pesar de que la técnica *top-down* es prometedora, a la hora de sintetizar nanomateriales aún hay algunas limitaciones por resolver como la preparación de la superficie y el acondicionamiento para la deposición controlada de moléculas, el control de las impurezas y la uniformidad del sitio o la calidad de los reactivos.

Normalmente, se combinan ambas técnicas para la síntesis de dispositivos nanométricos. Primero con la aproximación “*top-down*” se crean los materiales nanoestructurados en dos dimensiones para construir mediante la aproximación “*bottom-up*” la tercera dimensión (Figura 4).²³⁻²⁵

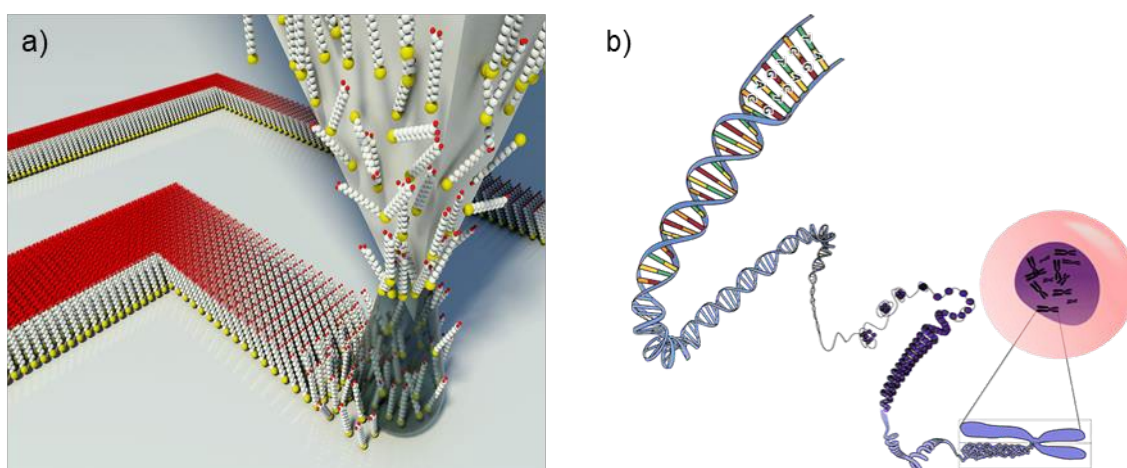


Figura 4. a) Representación de la técnica DPN donde moléculas son depositadas desde la punta del AFM a una superficie a través del menisco de agua (síntesis “*Top-down*”) y b) Estructura y niveles de empaquetamiento del ADN (Síntesis “*Bottom-up*”).

I.2.1. Nanopartículas.

Las nanopartículas se definen como dispersiones particuladas o partículas sólidas con tamaño en el rango nanométrico, pudiendo presentar diferentes formas y composiciones. Además, presentan propiedades físicas, químicas y biológicas muy diferentes a las del material que las compone a tamaño macroscópico.²⁶⁻²⁹

Tienen la característica de poseer una estructura robusta y capacidad de adaptar sus propiedades físicas y químicas mediante la variación del tamaño, la forma y la composición de las mismas. Gracias a todas estas propiedades las nanopartículas presentan un alto potencial para su uso en aplicaciones médicas, particularmente en diagnóstico *in vitro*, donde prometen una mayor sensibilidad, velocidad de diagnóstico y rentabilidad de los ensayos.³⁰⁻³²

Generalmente, las nanopartículas se clasifican en tres grupos, dependiendo de la naturaleza del material que las componen.

- ◆ **Nanopartículas orgánicas:** dendrímeros, micelas, liposomas.
- ◆ **Nanopartículas inorgánicas:** formadas por metales u óxidos metálicos.
- ◆ **Nanopartículas basadas en el carbono:** formadas únicamente por átomos de carbono enlazados.

Dentro de esta clasificación existe otra segunda dependiente de dos parámetros, como son la morfología y el tamaño.³³⁻³⁵

La síntesis de nanopartículas se puede llevar a cabo mediante varios métodos clasificados dentro de los métodos descritos anteriormente para síntesis de nanomateriales “*top-down*” o “*bottom-up*”. La metodología sintética elegida dependerá de factores como el rendimiento de la reacción, el bajo coste y el uso de las nanopartículas a sintetizar (Figura 5).

Por un lado, dentro del método sintético “*top-down*” se encuentran los siguientes tipos de síntesis:

- ◆ **Fresado mecánico:** Se realiza mediante una molienda de diferentes elementos en una atmósfera inerte. De este grupo es el método más utilizado.³⁶
- ◆ **Nanolitografía:** Se realiza mediante un proceso de impresión de una forma o estructura en un material sensible a la luz que elimina selectivamente una porción de material para crear la forma y estructura deseadas.³⁷
- ◆ **Ablación láser:** Se realiza mediante erradicación de un metal sumergido en un líquido. Es un método común para la producción de nanopartículas a partir de varios disolventes.³⁸
- ◆ **“Sputtering”:** Se lleva a cabo mediante la deposición de nanopartículas en una superficie mediante la expulsión de partículas al chocar con iones.³⁹
- ◆ **Descomposición térmica:** Se lleva a cabo mediante una descomposición química endotérmica producida por el calor que rompe los enlaces químicos en el compuesto.⁴⁰

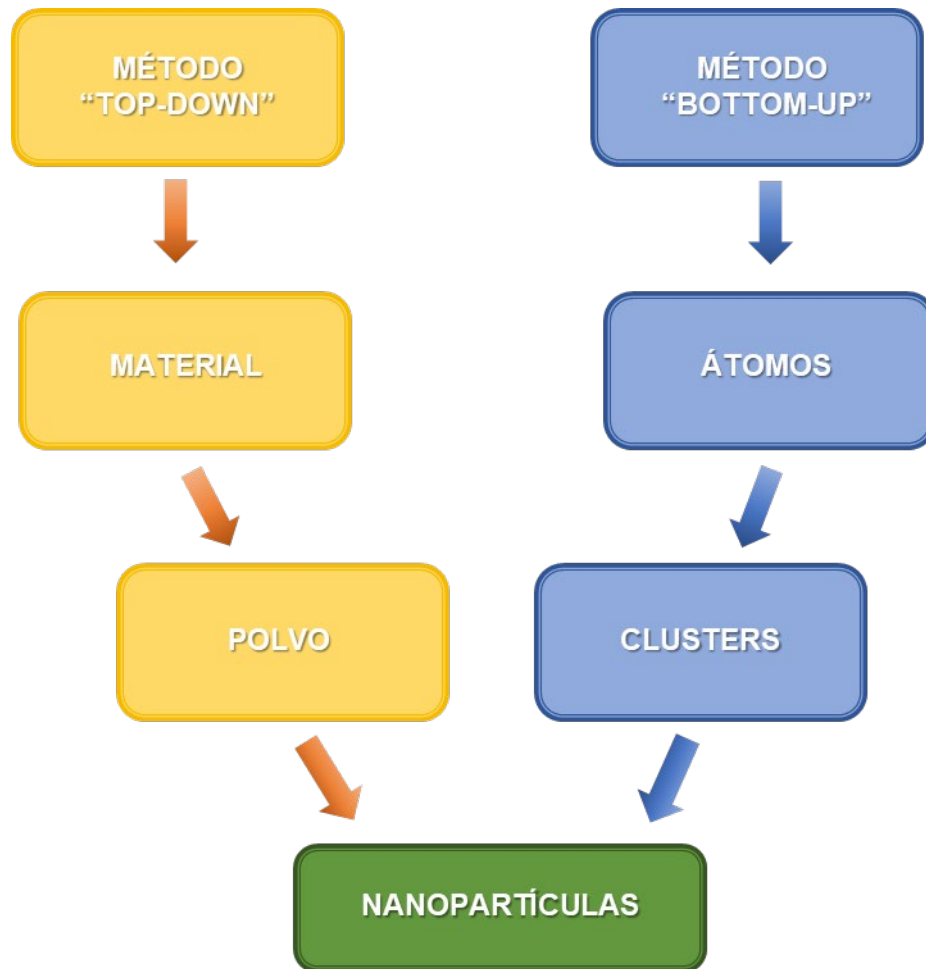


Figura 5. Proceso de síntesis de nanopartículas.

Por otro lado, dentro del método sintético “*bottom-up*” se engloban los siguientes tipos de síntesis:

- ◆ **Sol-gel:** Se lleva cabo mediante un proceso químico que contiene una solución química que actúa como precursor de un sistema integrado de partículas discretas. Es el método más utilizado dentro de esta clasificación debido a su facilidad y buen rendimiento.⁴¹
- ◆ **“Spinning”:** La síntesis se realiza mediante un reactor de disco giratorio (SDR, spinning disc reactor).⁴²
- ◆ **Deposición de vapor químico (CVD, Chemical Vapour Deposition):** La síntesis se lleva a cabo mediante la deposición de una película delgada de reactivos gaseosos sobre un sustrato, creando una fina capa de producto que se recupera y utiliza.⁴³
- ◆ **Pirolisis:** Se lleva a cabo quemando un precursor con llama. Es el método más utilizado en la industria para producción a gran escala.⁴⁴
- ◆ **Biosíntesis:** Se lleva a cabo mediante bacterias, extractos de plantas, hongos, etc. junto con precursores de nanopartículas, en lugar de productos químicos convencionales, dando un enfoque ecológico y respetuoso con el medio ambiente.⁴⁵

Para poder emplear las nanopartículas sintetizadas en diferentes aplicaciones, es necesario llevar a cabo una exhaustiva caracterización de las mismas, donde se determinen parámetros tales como: el tamaño, la homogeneidad, el área superficial, la composición, la morfología y carga superficial, la concentración y la estructura cristalina. El método de caracterización variará, dependiendo de la fase en la que se obtenga la muestra, sólida, dispersión coloidal o gaseosa (Tabla 2).⁴⁶⁻⁴⁸

Tabla 2. Métodos de caracterización de nanopartículas según su fase.

| NANOPARTÍCULAS | | | |
|------------------------------------|---|--|--|
| Características | Sólidas | Dispersión coloidal | Gaseosa |
| Tamaño | Microscopía electrónica y difracción láser | Espectroscopia de correlación de fotones y centrifugación | SMPS y contador óptico de partículas |
| Área superficial | Isoterma de BET | RMN | SMPS y DMA |
| Composición | XPS y análisis por digestión química | Espectrometría de masas con previa digestión química, Espectroscopia de emisión atómica y Cromatografía iónica | Espectroscopia de las partículas recolectadas |
| Morfología de la superficie | Análisis de imágenes de micrografías electrónicas | Deposición por microscopía electrónica en una superficie | Captura de partículas electrostáticamente o por filtración para imágenes por microscopía electrónica |
| Carga superficial | Potencial-Z | Potencial-Z | DMA |
| Estructura cristalina | Rayos X o difracción de neutrones | - | - |
| Concentración | - | - | CPC |

SMPS: Escáner de Movilidad de Tamaño de Partícula, DMA: Analizador de Movilidad Diferencial y CPC Contador de Condensación de Partículas.

1.3. Nanopartículas para diagnóstico *in vitro*.

Las pruebas de diagnóstico *in vitro* son un componente crucial en la atención clínica ya que se realizan sobre muestras biológicas como sangre, orina o tejido, evitando así la acción directa sobre el propio paciente.

Presentan ventajas como el diagnóstico accesible sin cirugías invasivas, un diagnóstico temprano y facilidad en el tratamiento de enfermedades graves.⁴⁹

Existe por tanto una necesidad constante de mejorar el rendimiento (sensibilidad y especificidad) de estos ensayos *in vitro*, así como de desarrollar estrategias innovadoras frente a los nuevos desafíos. En este contexto, las características de las nanopartículas las hacen ser candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevos ensayos.

La gran relación superficie/volumen presente en este tipo de materiales, permite la integración de una gran cantidad de biomoléculas en una sola nanopartícula. Este hecho, sugiere potencialmente una detección de analitos patológicamente relevantes con una sensibilidad muy alta, lo cual se puede traducir en una mejora del diagnóstico de enfermedades, optimizando así el pronóstico de muchos pacientes gracias a un diagnóstico precoz. Además, el tamaño de las nanopartículas está en el mismo rango que el de muchas biomoléculas (como anticuerpos u oligonucleótidos) facilitando su interacción.^{31,50}

Las nanopartículas que actualmente presentan mayor interés en el campo de diagnóstico *in vitro* son las inorgánicas, especialmente las de oro (AuNP), los quantum dots (QD) y las superparamagnéticas (Fe_xO_y).

Los criterios para clasificar las nanopartículas con el fin de destinarlas al desarrollo de diagnósticos *in vitro* son el parámetro a detectar o el tipo de nanopartícula. Dependiendo de estos parámetros, podemos clasificar los diferentes ensayos usados hoy en día como:

◆ **Ensayos basados en nanopartículas fluorescentes:**

Existen una gran variedad de métodos para desarrollar nanopartículas fluorescentes que actúan como sensores para diferentes moléculas. En este sentido, se han introducido fluoróforos orgánicos en las nanopartículas, ya sea como parte de la estructura o encapsulados dentro de ellas. Un ejemplo de estos sistemas son las denominadas “*Encapsulated By Biologically Localized Embedding*” o PEBBLEs, cuyo funcionamiento está adaptado para poder detectar cambios de pH, concentración de oxígeno y temperatura entre otros, mediante un cambio de fluorescencia tras la exposición a un estímulo concreto.^{51,52}

Los quantum dots (QD) también se han estudiado muy a fondo para esta aplicación, ya que presentan una fotoestabilidad mucho más alta y una banda de emisión mucho más estrecha que los fluoróforos orgánicos. Gracias a estas características, son utilizados como marcadores en inmunoensayos, en tinciones para inmunohistoquímica e imágenes celulares. Además, el hecho de que múltiples QD puedan ser excitados por una sola longitud de onda los hace aptos para diagnóstico múltiple.^{32,53–55}

◆ **Ensayos basados en nanopartículas plasmónicas:**

Las nanopartículas plasmónicas han sido ampliamente evaluadas para desarrollar sistemas de diagnóstico *in vitro*, principalmente basados en nanopartículas de oro (AuNP), ya que presentan propiedades ópticas únicas, como la resonancia de plasmón de superficie (LSPR).

Al tratarse de un fenómeno superficial, cualquier cambio en la superficie de la nanopartícula inducirá un cambio en las propiedades ópticas de la misma, que será posteriormente detectado por un método colorimétrico, dando información sobre la concentración del analito presente en el medio. También se han desarrollado nanosensores de oro para determinar biomoléculas debido a la agregación de nanopartículas cuando el analito está presente en la muestra. El cambio en el tamaño y la forma de las nanopartículas debido a la agregación induce un cambio en el pico LSPR de una magnitud tal que generalmente es detectable a simple vista.⁵⁶⁻⁵⁸

Este tipo de nanopartícula se utiliza también para el desarrollo de nanosensores gracias a las propiedades que le confiere la interacción con fluoróforos. Igualmente, se pueden utilizar para desarrollar métodos de detección electroquímicos sensibles junto con ensayos enzimáticos.^{59,60}

Las principales aplicaciones de este tipo de nanopartículas están basadas en el diagnóstico por imagen, los inmunoensayos y el diagnóstico molecular.

◆ **Ensayos basados en nanopartículas superparamagnéticas:**

Las nanopartículas superparamagnéticas (Fe_xO_y) producen un momento magnético extremadamente grande, resultado del acoplamiento de muchos espines atómicos en presencia de un campo magnético externo, al contrario de lo que pasa en una sustancia paramagnética normal.

Para asegurar la biocompatibilidad de las nanopartículas superparamagnéticas, estas se recubren de un material como sílice o polietilenglicol, pudiendo así modificar su superficie mediante la unión de ligandos apropiados (anticuerpos, proteínas u oligonucleótidos).

Este tipo de nanopartículas se suele emplear para inmunoensayos multiplex y como agentes de contraste en la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), donde presenta una susceptibilidad magnética mucho mayor que los agentes de contraste de MRI convencionales, como el gadolinio.⁶¹⁻⁶⁴

I.4 Diagnóstico *in vitro* de alergias.

Dentro del ámbito sanitario, uno de los grandes desafíos actuales es el diagnóstico de reacciones alérgicas, más concretamente reacciones alérgicas a fármacos, debido a la peligrosidad de los métodos *in vivo*, y a la baja sensibilidad de los métodos *in vitro* actuales.^{65,66}

Para el desarrollo de nuevas pruebas *in vitro*, es fundamental el conocimiento de los mecanismos por los cuales se produce una reacción alérgica.

I.4.1. Alergias.

Según la Organización Mundial de Alergia (WAO), alergia es una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos.⁶⁷

Este término fue descrito por primera vez por Guido Von Pirquet para describir respuestas inmunitarias tanto protectoras del huésped como potencialmente dañinas.⁶⁸

Los mecanismos de hipersensibilidad más frecuentes por los que se desarrolla una respuesta alérgica son los mediados por anticuerpos inmunoglobulinas E (IgE), las cuales están presentes en todos los individuos. Estos anticuerpos presentan la propiedad de unirse a través de receptores de alta afinidad a la superficie de algunas células del sistema inmunitario, como mastocitos, presentes en algunos tejidos, y basófilos presentes en el torrente sanguíneo. Al igual que otras inmunoglobulinas, intervienen en la respuesta inmune específica al reconocer un agente extraño potencialmente peligroso.

La respuesta alérgica se desencadena debido a una reacción de ciertos componentes del sistema inmunológico contra una sustancia extraña, que para la gran mayoría de los individuos es inofensiva. Esto induce a una serie de mecanismos que dan lugar a la liberación de mediadores inflamatorios.

Estos mecanismos comienzan con el procesado del alérgeno por las células dendríticas y su posterior activación. Estas células dendríticas activadas son las encargadas de promover la activación de linfocitos B específicos del alérgeno, los cuales inducirán la producción de IgE específica al alérgeno. La IgE queda presente en todo el organismo incluyendo la superficie de mastocitos y basófilos. A este proceso se le denomina etapa de sensibilización de la alergia (Figura 6).

Posteriores entradas del alérgeno en el organismo dará lugar a la captación de éste por las IgE en los receptores de la superficie de las células (mastocitos o basófilos), liberando mediadores de reacciones inflamatorias responsables de la sintomatología de las reacciones alérgicas (Figura 6).^{69,70}

Existen dos tipos de reacciones alérgicas, las denominadas inmediatas que se producen en un periodo de 15 minutos desde que el alérgeno entra en contacto con el organismo y las denominadas tardías, que se producen horas después de que el alérgeno entre en contacto con el organismo.

En el caso de la respuesta tardía, la sintomatología es causa de la liberación de mediadores dando lugar a la fiebre del heno, el asma, las reacciones a alimentos y los eccemas. Sin embargo en el caso de la inmediata el alérgeno llega a la circulación sanguínea, los basófilos se activan y manifiestan la poco común pero muy peligrosa reacción de anafilaxis.⁷¹

Debido a la peligrosidad de los síntomas causados por las reacciones alérgicas, el correcto diagnóstico de éstas es de vital importancia.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de una enfermedad alérgica se basa en una historia clínica detallada y una prueba de sensibilización, ya sea *in vivo* o *in vitro*, a un alérgeno relevante y concordante con la historia clínica.

Normalmente, las pruebas más utilizadas son las *in vitro* ya que no suponen un riesgo para el paciente. Sin embargo, en algunos casos este tipo de pruebas no son suficientes para obtener un buen diagnóstico debido a sus limitaciones.^{66,72}

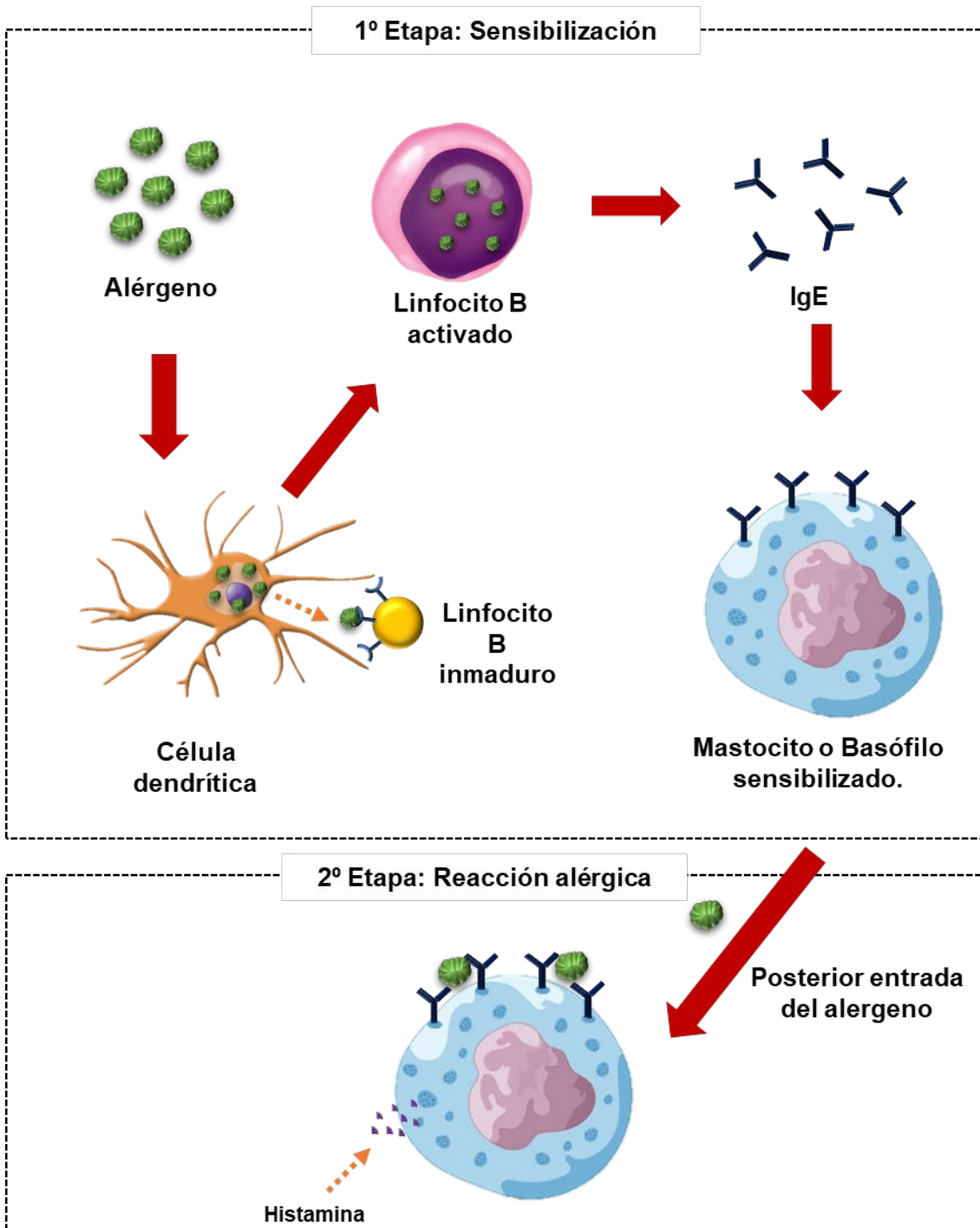


Figura 6. Representación del mecanismo de reacción de la alergia.

1.4.2. Alergias a fármacos:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las reacciones adversas a fármacos (RAF) se definen como toda respuesta nociva y no intencionada a un fármaco que ocurre en dosis terapéuticas.⁷³

Este tipo de reacciones se clasifican en dos tipos principales:

- ♦ **Reacciones Tipo A:** Son dependientes de la dosis, predecibles y están relacionadas con la actividad farmacológica del medicamento. Este tipo es el más frecuente.

- ◆ **Reacciones Tipo B:** No son dependientes de la dosis, impredecibles y no están relacionadas con la actividad farmacológica del medicamento. Aparecen únicamente en ciertos individuos (10-15% de las reacciones adversas a fármacos).⁷⁴

Las reacciones adversas a fármacos con base inmunológica han sido clasificadas según distintas características de éstas, como el tiempo de aparición o el mecanismo subyacente.

Bernad B. Levine, en 1966, realizó una clasificación dependiendo del tiempo de aparición de los síntomas clínicos tras la toma del fármaco. Esta clasificación tomó su nombre, llamándose clasificación de Levine, y consta de tres tipos: La reacción inmediata, la acelerada y la tardía.

- ◆ **Las reacciones inmediatas:** se presentan en la primera hora tras la administración del fármaco y son mediadas por IgE.
- ◆ **Las reacciones aceleradas:** se presentan entre 1 y 72 horas tras la administración del fármaco y el mecanismo no está aún claro.
- ◆ **Las reacciones tardías:** se presentan a partir de 72 horas después de la toma del fármaco y son mediadas por células T.⁷⁵

Philip George Houthem Gell y Robin Coom, en la misma década, propusieron otra clasificación basada en los mecanismos fisiológicos implicados. Se proponen cuatro mecanismos principales por los cuales se desencadena una reacción alérgica.

- ◆ **Las reacciones tipo I:** Este tipo de reacciones son las desencadenadas por la interacción de un antígeno y un anticuerpo IgE unido a receptores de superficie de mastocitos y basófilos. Se corresponden con las reacciones inmediatas descritas anteriormente. Causan principalmente urticaria, anafilaxis y asma.
- ◆ **Las reacciones tipo II:** Este tipo de reacciones son mediadas por inmunoglobulinas G, M (IgG e IgM) y, en menor medida la A (IgA). Las cuales reconocen antígenos unidos a la membrana de eritrocitos, neutrófilos plaquetas y células epiteliales de glándulas o mucosas desencadenan la reacción alérgica.
- ◆ **Las reacciones tipo III:** Este tipo de reacciones son producidas cuando se dan reacciones de los anticuerpos en la sangre, que da como resultado la formación de complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en las membranas basales glomerular y/o pulmonar.
- ◆ **Las reacciones tipo IV:** Este tipo de reacciones son mediadas por linfocitos T, no por anticuerpos. Corresponden a las reacciones tardías de la clasificación de Levine.⁷⁶

El hecho de que la gran mayoría de individuos que toman fármacos no desarrollen una reacción inmunológica pese a ser moléculas extrañas, pone de manifiesto la existencia de tolerancia inmunológica generada frente a moléculas exógenas inocuas. Esto indica que las reacciones alérgicas a fármacos se producen en situaciones en las que el sistema inmunológico reconoce específicamente a estas estructuras y en lugar de generar una respuesta de tolerancia, desencadena una respuesta efectora frente a ellas, generando daño en los tejidos diana donde el fármaco puede ser reconocido por el sistema inmunológico. Dicha respuesta inmunitaria conlleva a una memoria inmunológica, por lo

que en posteriores ingestas del fármaco la respuesta será más rápida y efectiva que en el primer contacto.⁷⁷

En el caso de reacciones adversas a fármacos mediadas por IgE el mecanismo puede explicarse por la “hipótesis del hapteno”, propuesta por Karl Landsteiner.⁷⁸

Según esta hipótesis, moléculas de bajo peso molecular solo pueden inducir una reacción alérgica cuando se unen a una molécula portadora de suficiente tamaño. Por norma general, el hapteno se une a proteínas endógenas formando el conjugado Hapteno-Portador (H-P) que si es capaz de inducir la reacción alérgica (Figura 7).^{79,80}

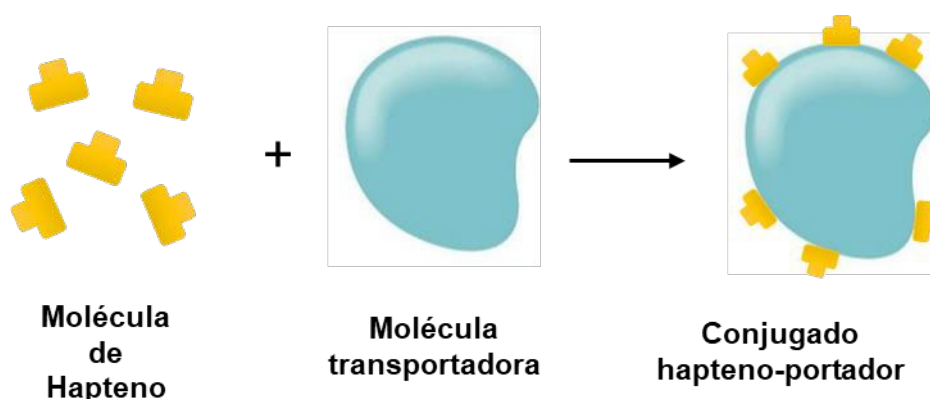


Figura 7. Formación del complejo hapteno portador.

Este tipo de reacciones adversas a fármacos están mediadas por anticuerpos IgE específicos. Su actividad biológica se manifiesta mediante su unión a receptores de alta y baja afinidad (FcεR) en mastocitos y basófilos, donde induce la liberación de mediadores de la inflamación, dando lugar a los síntomas de la alergia. Estos síntomas pueden causar problemas graves como la anafilaxia y reacciones alérgicas cutáneas graves provocando la muerte o dejando secuelas graves.⁶⁵

I.4.3. Test de detección *in vitro* de alergias a fármacos.

Las reacciones adversas a fármacos (RAF), representan un problema importante en la población debido a las dificultades presentes en el diagnóstico de estas. Éste diagnóstico se basa en la realización de una correcta historia clínica, donde se deben recoger de forma detallada todos los fármacos que se han tomado previa a la reacción, el intervalo de tiempo entre la reacción y la toma de dichos fármacos y el número de días que el paciente está tomando el o los medicamentos previos a la aparición de la reacción. El alergólogo debe recoger la máxima información, ya que esto va a condicionar las pruebas diagnósticas que se indiquen y las orientaciones pronósticas y terapéuticas subsiguientes.

Las pruebas diagnósticas “*in vivo*” e “*in vitro*” que se realizan en la práctica clínica son:

Pruebas “*in vivo*”:

- ◆ **Test cutáneos:** Se basan en el contacto del alérgeno a estudiar con la piel del paciente mediante una pequeña deposición intradérmica. Se consideran el método *in vivo* mejor validado para diagnosticar alergias, aunque no está estandarizado para todos los fármacos. Muchas pruebas necesitan altas concentraciones del alérgeno, dando falsos positivos debido a las propiedades irritantes intrínsecas del alérgeno.⁸¹
- ◆ **Provocación de la reacción alérgica:** Se basan en la ingestión del paciente de una cierta cantidad del alérgeno a estudiar. Es la prueba definitiva para diagnosticar a un paciente, pero presenta muchos riesgos y consume mucho tiempo y recursos.⁸²

Pruebas “*in vitro*”:

- ◆ **Inmunoensayos:**

Los inmunoensayos son un tipo de prueba utilizada en diagnóstico para detectar o cuantificar una sustancia específica mediante una reacción inmunológica. Su detección se basa en la unión de anticuerpos IgE específicos, mediante incubación, con el antígeno de interés.

En el contexto del diagnóstico de alergias, los inmunoensayos más utilizados son:

- ◆ **ImmunoCap-FEIA (Fluoroenzimo-inmunoanálisis):**

Es el único método comercial validado en laboratorios de rutina para diagnóstico de alergias.

Para llevar a cabo este inmunoensayo se utilizan unos kits comerciales (cápsulas) que contienen el alérgeno a estudiar unido covalentemente a una fase sólida.

Esta fase sólida consiste en un polímero de celulosa hidrófilo altamente ramificado al que se le unen covalentemente conjugados del alérgeno (fármaco) con poli-L-lisina (PLL), para formar el conjugado H-P.

Al realizar este tipo de test, el suero del paciente a diagnosticar se añade a esta cápsula comercial, permitiendo que se produzca el reconocimiento molecular entre la IgE específica del suero (si está presente, es decir, si el paciente es alérgico) y el complejo hapteno-portador anclado en la superficie del soporte sólido.

Tras el proceso de incubación, la cápsula se somete a procesos de lavado. Posteriormente, la fase sólida (que contendrá la IgE del suero del paciente que se ha unido) se incubará con un anticuerpo secundario anti-IgE, que contiene una enzima que, tras la adición posterior de un determinado sustrato, genera un compuesto fluorescente.

Finalmente, tras detener la reacción entre la enzima y el sustrato, se mide la fluorescencia. La medida de fluorescencia se relaciona directamente con el contenido de IgE específica en el suero del paciente. Si la señal de fluorescencia supera un valor establecido ($\geq 0,1$) se diagnosticará al paciente como alérgico al fármaco en cuestión.

Aunque es una de las técnicas más utilizadas en todo el mundo, presenta algunas limitaciones, sobre todo en el caso de alergias a fármacos, como falsos positivos, debido a otro tipo de antígenos presentes, o falsos negativos, debido a la poca cantidad de IgE presentes en este tipo de reacciones alérgicas.⁸³

❖ **“Radio Allergo Sorbent Test” (RAST):**

Para llevar a cabo este inmunoensayo se utilizan conjugados del fármaco con poli-L-lisina (PLL), acoplados covalentemente a discos formados por un polímero tridimensional de celulosa que actúa como fase sólida.

En este caso, tras la incubación de la fase sólida con el suero del paciente a diagnosticar, la fase sólida se incuba con anticuerpos anti-IgE marcados con I¹²⁵. La cantidad de anticuerpos marcados, medida en términos de radiactividad, unidos a la fase sólida con el fármaco acoplado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgE.

Hoy en día esta técnica sólo se realiza en laboratorios especializados con fines de investigación. Además presenta limitaciones con pacientes que, a pesar de no ser alérgicos, tienen niveles muy altos de IgE, dando falsos positivos, además de presentar valores de RAST bajos en pacientes que, siendo alérgicos, tienen una cantidad elevada de IgG, dando lugar a falsos negativos.^{84,85}

◆ **Test de activación de basófilos (BAT):**

Este método se basa en la capacidad de la IgE para inducir la activación de basófilos en presencia de alérgenos en la sangre. Los basófilos presentan en su membrana receptores de anticuerpos IgE, que son los responsables de las reacciones alérgicas.

La diferenciación de los basófilos activados de los que no lo están se realiza mediante la utilización de anticuerpos con marcadores fluorescentes que reconocen una proteína presente en la membrana de los gránulos del basófilo. Cuando el basófilo se activa, la membrana del gránulo se une a la membrana de la célula y los gránulos (que contienen los mediadores responsables de las reacciones alérgicas) vierten su contenido al exterior. De esta forma la membrana pasa a expresar la proteína. El porcentaje de células activadas respecto a las que no lo están se analiza mediante citometría de flujo.

El gran potencial que presenta esta técnica reside en la capacidad de replicar *in vitro* las reacciones de hipersensibilidad tipo I que se desarrollan *in vivo* cuando el paciente alérgico está expuesto al alérgeno. Sin embargo, al utilizar sangre de pacientes en lugar de suero, como en las anteriores técnicas, presenta una serie de limitaciones como la posibilidad de obtener falsos positivos por la mala manipulación de la muestra o almacenamiento inadecuado, una exposición inapropiada de las células con alérgenos mal identificados que contienen componentes citotóxicos o inhibidores o la aplicación de concentraciones de estimulación citotóxica.⁸⁶

Las principales limitaciones a la hora de realizar un correcto diagnóstico de las reacciones adversas a fármacos a través de pruebas *in vitro*, son la necesidad no solo de la identificación del fármaco culpable, sino también la investigación de todas las estructuras secundarias cuando el fármaco es metabolizado por el organismo. Ya que pueden darse procesos de reacción cruzada que desencadenan también la reacción alérgica, como en el caso de los antibióticos β -lactámicos.⁸⁷⁻⁸⁹

El escaso conocimiento de la naturaleza del conjugado fármaco-portador en los conjugados fármaco-proteína *in vivo*, puede explicar también el valor diagnóstico subóptimo de ambas metodologías (ImmunoCAP y RAST).

La estructura que adopta el fármaco tras unirse covalentemente a la proteína y la naturaleza de la molécula portadora, unido a otros factores como el material utilizado de fase sólida, su funcionalización química y las técnicas de detección de sIgE también influyen en la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos⁹⁰⁻⁹²

Con respecto a la naturaleza de la molécula portadora, esta presenta una gran importancia en la detección de alergias *in vitro*, ya que su tamaño, su distribución y la densidad de hapteno capaz de soportar son factores claves para el reconocimiento molecular. Los portadores tradicionales empleados en la formación de estos conjugados son la Albumina de Suero Humano (HSA) y el polipéptido Poli-L-Lisina (PLL).

La HSA es la molécula portadora clásica en ensayos *in vivo*, ya que los restos de lisina presentes en su estructura reaccionan con los antibióticos β -lactámicos, formando el complejo hapteno-portador. Esta reacción de los restos de lisina también ocurre *in vitro*, sin embargo, algunos estudios exponen que la unión de este tipo de fármaco con la HSA deja solo expuesto a la superficie de la proteína alrededor de 6 residuos del fármaco para la unión con el anticuerpo, lo que se traduce en una baja densidad de hapteno en la superficie del portador.⁹³⁻⁹⁶ La PLL sin embargo, utilizada como proteína artificial, supera esta limitación, ya que presenta una inherente mayor densidad de hapteno en sus conjugados.

Este parámetro repercute en la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica, ya que algunos estudios han demostrado mediante RAST e inhibición de RAST que los conjugados PLL presentan mayor capacidad de unirse específicamente a anticuerpos IgE, que los conjugados con HSA.⁹⁷

Es conocido que la concentración de IgE específica a fármacos presente en el individuo es muy baja (0,2 % de la IgE total) con respecto a la IgE específica a otros alérgenos.⁹⁸

Esto explica por qué existen test de diagnósticos *in vitro* comerciales a una amplia variedad de alérgenos con una alta especificidad y sensibilidad, mientras que para fármacos existen pocos test y poco fiables (baja sensibilidad y especificidad).

El desarrollo y mejora de estos métodos de detección *in vitro* es de vital importancia para solventar estas limitaciones presentes en el diagnóstico de este tipo de reacciones adversas. Dentro de este contexto, hay que tener en cuenta muchos factores para optimizar los inmunoensayos en términos de sensibilidad y especificidad.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral viene trabajando desde hace tiempo en este sentido. Los primeros estudios sobre el reconocimiento de fármacos sIgE se enfocaron en conjugar los fármacos o metabolitos responsables de la DHR con una molécula portadora para imitar el reconocimiento de sIgE *in vivo* y así poder anclar una alta densidad de estos conjugados fármaco-portador a superficies sólidas con accesibilidad para unir sIgE minimizando las interacciones inespecíficas.⁹⁹

En relación a esto los primeros trabajos con éxito consistieron en el uso de dendrímeros para imitar proteínas transportadoras y su inmovilización sobre discos de celulosa para ser utilizados en el radioinmunoensayo, RAST.¹⁰⁰ Posteriormente, el estudio se amplió al uso de diferentes soportes sólidos, empleando nanomateriales como zeolitas y partículas de

Capítulo I

sílice, las cuales presentan unas características ventajosas a la hora de realizar la función de soporte sólido debido a su fácil funcionalización superficial y buen control del tamaño de partícula.¹⁰¹

En este sentido las nanopartículas despiertan un gran interés debido al potencial que presentan como fase sólida, gracias a la excelente versatilidad que presentan a la hora de modificar su superficie. Además, este recubrimiento de la superficie de la partícula garantiza la biocompatibilidad, las propiedades de reconocimiento y la multivalencia.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Los resultados prometedores de estos primeros trabajos, así como la falta de nanosistemas validados para el diagnóstico *in vitro* de alergias a fármacos en la actualidad, es lo que ha motivado el trabajo realizado en esta tesis doctora

CAPÍTULO II ***OBJETIVOS***



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En base a la experiencia adquirida durante los últimos años en el desarrollo y la optimización de métodos de detección *in vitro* de alergia a fármacos, donde se ha comprobado la efectividad de los dendrímeros para emular la proteína portadora en el complejo H-P y la efectividad de los sistemas donde estos Dendrímeros-Antigénicos se encuentran anclados a diferentes soportes sólidos en ensayos tipo RAST, en este trabajo de tesis doctoral, nos hemos planteado la incorporación de nanopartículas como fase sólida en diferentes test de detección *in vitro* de alergia a antibióticos β -lactámicos.

En particular, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- La síntesis de (nano)partículas de sílice modificadas superficialmente con Dendrímeros-Antigénicos para su aplicación en ensayos tipo RAST. Ampliar además este estudio a diferentes antibióticos β -lactámicos, preparando partículas mono- y multi-epítotope, para diagnósticos de alergia a un único fármaco o varios fármacos en un único ensayo.
- 2.- La síntesis de nanopartículas con núcleo magnético modificadas superficialmente con Dendrímeros-Antigénicos, para optimizar los protocolos de realización del ensayo RAST, con objeto del traslado a la práctica clínica de este tipo de ensayos.
- 3.- La síntesis de nanopartículas de sílice de tamaño comprendido entre 20 y 50 nm, modificadas superficialmente con Dendrímeros-Antigénicos, para su aplicación en ensayos tipo BAT.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO III

PARTÍCULAS PARA RAST



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III.1 Introducción.

El ensayo RAST (*Radio Alergo Sorbent Test*) es una modalidad de radioinmunoanálisis (RIA). En el campo de la detección *in vitro*, los inmunoensayos son de particular importancia a la hora de diagnosticar reacciones alérgicas, donde las inmunoglobulinas son las proteínas específicas involucradas en los procesos de reconocimiento molecular. En el caso de alergias a fármacos, el inmunoensayo RAST se emplea para el diagnóstico del fármaco concreto al que es alérgico un individuo, basado en la cantidad de IgE que reconoce específicamente a los alérgenos (fármacos) conocidos o sospechados.¹⁰⁵

Este tipo de inmunoensayo consta de un soporte sólido que contiene en su superficie un conjugado hapteno-portador. Actualmente, el soporte sólido utilizado en laboratorios de rutina son discos de celulosa de 6 mm de diámetro preparados a partir de papel Whatman 54. Este soporte tiene la ventaja de ser económico, fácil de manipular, compatible con la conjugación de moléculas portadoras y con los medios fisiológicos empleados en los ensayos biológicos.¹⁰⁶

La funcionalización de la superficie de estos discos para anclar a su superficie el alérgeno a estudiar, se basa en una primera derivatización de la celulosa con bromuro de cianógeno, para activar los grupos hidroxilos presentes en la superficie de la celulosa. Estos discos activados se hacen reaccionar posteriormente con una molécula portadora, como es el homopolipeptido poli-L-Lisina (PLL), al cual se le une covalentemente el alérgeno a estudio.

Durante el procedimiento de funcionalización de la superficie se produce una etapa de bloqueo de los grupos hidroxilos de la celulosa que no han reaccionado con la PLL (empleando etanolamina). El bloqueo de estos grupos hidroxilos es crucial, ya que impide uniones inespecíficas a la hora de llevar a cabo el ensayo.¹⁰⁷

Una vez funcionalizado el soporte sólido con el fármaco a evaluar, se procede a realizar el ensayo. Para ello primero se incuban los discos funcionalizados con el suero de referencia o control a evaluar y con el suero del paciente, permitiendo que se produzca el reconocimiento molecular entre la IgE específica del suero (si está presente, es decir si el paciente es alérgico) y el complejo hapteno-portador anclado en la superficie del soporte sólido.

Tras el lavado de los discos, estos se incuban con una disolución que contiene anti-anticuerpo humano policlonal IgE marcado radiactivamente con I^{125} . La medida de radioactividad mediante un contador gamma se relaciona directamente con el contenido de IgE específica en el suero del paciente (Figura 8). Si la señal de radioactividad supera un valor establecido se diagnosticará al paciente como alérgico al fármaco en cuestión.¹⁰⁸

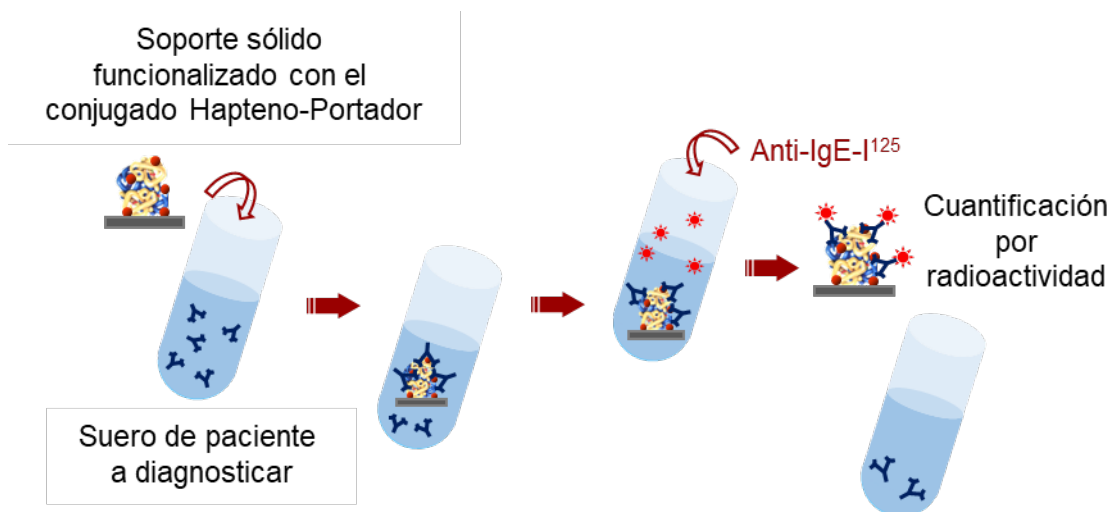


Figura 8. Protocolo ensayo RAST convencional.

La naturaleza de la molécula portadora presenta una gran importancia a la hora de desarrollar test de detección de alergias *in vitro*, ya que su tamaño, su distribución y la densidad de hapteno capaz de soportar son factores claves para el reconocimiento molecular. El portador empelado normalmente en la formación de estos conjugados es el polipéptido Poli-L-Lisina (PLL).⁹³⁻⁹⁶

La PLL utilizada como proteína artificial, posee una alta densidad de hapteno en sus conjugados. Sin embargo, debido a su estructura tridimensional, no se pueden cuantificar la cantidad de haptenos unidos a ella.⁹⁷

Los antibióticos β -lactámicos son hoy en día uno de los fármacos más prescritos para el tratamiento de infecciones. Por ello, también son la causa más común de reacciones alérgicas, afectando al 10% de los pacientes tratados con penicilinas. Dependiendo de la localización geográfica, del momento en el que nos encontremos y del patrón de prescripción médica, se puede observar una tendencia más frecuente a desarrollar la enfermedad. Inicialmente, Bencilpenicilina (BP), fue la mayor causante de alergias en la población. Tras su reemplazo por Amoxicilina (AX) es esta actualmente la mayor causante de alergias.

Además, el uso indiscriminado de estos antibióticos ha desembocado en una resistencia bacteriana tanto a BP como a AX, lo que ha obligado a buscar alternativas. Una de estas soluciones ha sido introducir ácido clavulánico (CLV), un inhibidor de β -lactamasa, a la Amoxicilina prescrita, resultando este sensible también a reacciones alérgicas (Figura 9).¹⁰⁹

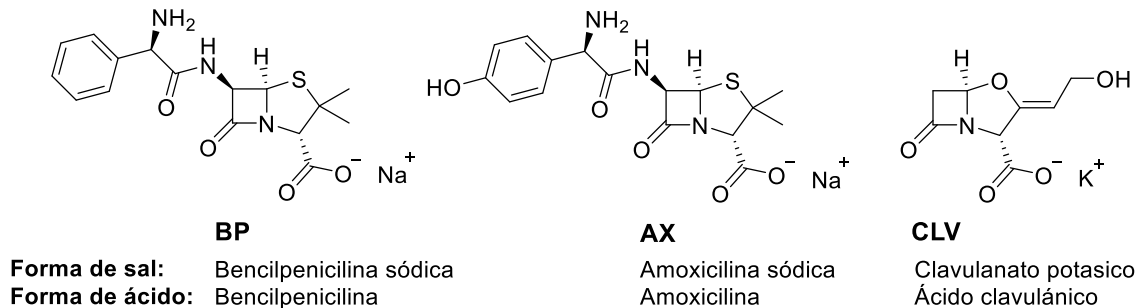


Figura 9. Ejemplos de antibióticos β -lactámicos.

Las penicilinas son reactivas frente a una amplia variedad de reactivos nucleófilos, debido a la estructura tensionada del anillo de β -lactama presente en su estructura química. Como consecuencia de esta alta reactividad, su transformación *in vivo* genera diferentes metabolitos que son reconocidos por el sistema inmunológico. Esos metabolitos son denominados determinantes antigénicos, y son los responsables de causar la reacción alérgica.

El grupo peniciloilo (Figura 10), estructura resultante de la reacción de los grupos aminos de los restos de lisina de las proteínas con el anillo de β -lactama presente en la estructura química de la penicilina, es el determinante antigénico mayor.¹⁰⁰ Sin embargo, también existen evidencias de la existencia de otros derivados de penicilinas con capacidad inmunogénica, denominados determinantes antigénicos menores.

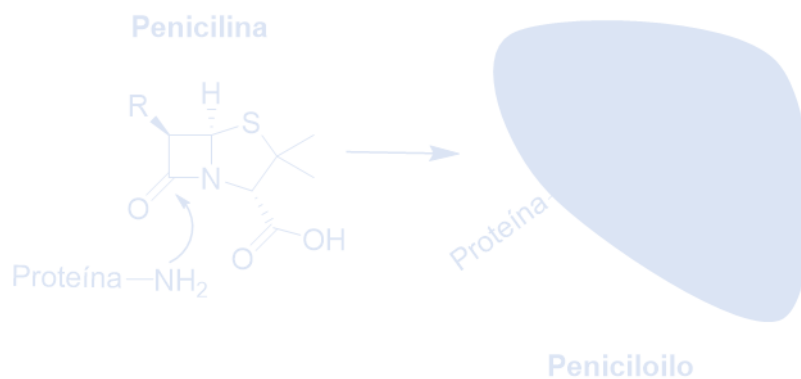


Figura 10. Reacción de los grupos amino de las proteínas con el anillo de β -lactama del antibiótico para formar el grupo peniciloilo.

En el caso de la Bencilpenicilina, el determinante antigénico mayor es el grupo Bencilpeniciloilo (BPO), que se forma a partir del ataque nucleofílico a la molécula de penicilina por el grupo amino de los restos de lisina de las proteínas del suero humano presente en el plasma y las membranas celulares. En el caso de la amoxicilina el determinante antigénico mayor es el Amoxiciloilo (AXO) (Figura 11).¹¹⁰

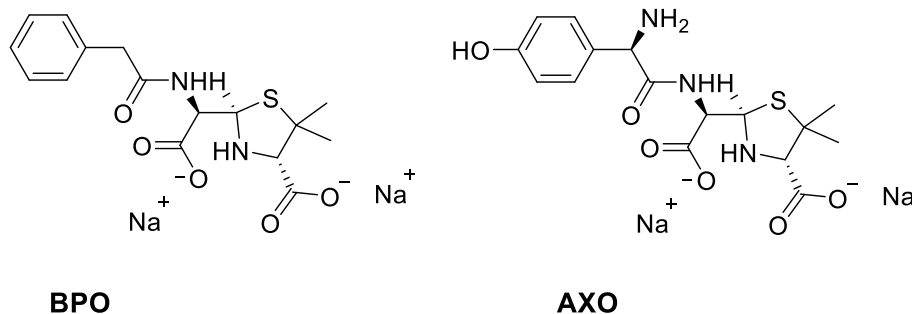


Figura 11. Determinantes antigénicos mayores de penicilinas.

En el contexto de la alergia a antibióticos β -lactámicos las pruebas de reconocimiento de IgE poseen limitaciones para diagnosticar a pacientes con reacciones inmediatas a penicilina, ya que, aunque el método comercial ImmunoCAP presenta una alta especificidad (83-100%), su sensibilidad es baja y variable (0-50%).¹¹¹⁻¹¹³ Debido a esto, la detección de IgE puede fallar a la hora de llevar a cabo un diagnóstico clínico, incluso cuando el cuadro clínico es confiable.

Además, los kits comerciales para llevar a cabo un diagnóstico *in vitro* solo están disponible para cuatro penicilinas (BP, AX, penicilina V y ampicilina), por lo que el espectro de fármacos que se puede diagnosticar mediante este método se limita a ese tipo de alergia sin poder llevarlo a cabo con otro tipo de fármacos.¹¹⁴

Debido a esta problemática y a la necesidad de desarrollar nuevos test de detección de alergias *in vitro*, actualmente está en auge el diseño y síntesis de nuevos materiales para la fabricación de sensores que ofrezcan una mayor sensibilidad y selectividad en relación con los sistemas de diagnósticos convencionales.¹¹⁵

Normalmente, los biosensores que permiten una detección rápida a un coste bajo contienen un agente de captura en la superficie para unir la biomolécula a estudiar de manera específica y selectiva.

De hecho, la eficacia de estos dispositivos depende de una serie de factores donde se incluyen las técnicas de fabricación a escalas micro/nano y la química empleada en la inmovilización sobre la superficie, ya que la orientación y la funcionalidad de las moléculas bio-receptoras tienen una fuerte influencia en el rendimiento general del biosensor.

Además, es de gran importancia conocer la interacción entre material (partículas) y los biosistemas para un uso efectivo de estos sensores. En condiciones ideales, la matriz de los biosensores deberían tener una superficie biocompatible, con una cantidad de ligando

apropiada y una accesibilidad adecuada para proporcionar bajas interacciones no específicas y una unión estable del ligando a lo largo de un ensayo.¹¹⁶

Dentro del estudio de nanomateriales en los últimos años, se está trabajando con unas macromoléculas altamente ramificadas denominadas dendrímeros. Estas estructuras tienen una gran importancia desde el punto de vista de sus aplicaciones biomédicas, gracias a su tamaño y forma bien definidas.

Uno de los primeros autores dedicados al estudio y síntesis de estas moléculas ha sido Donal A. Tomalia, el cual los nombró dendrímeros, palabra proveniente del griego (*dendro*: árbol y *meros*: parte de) debido a su similitud con la estructura de la copa de los árboles.¹¹⁷

Los dendrímeros se caracterizan por una estructura tridimensional altamente ramificada y bien definida, lo que le proporciona un alto grado de funcionalidad superficial y versatilidad. La estructura de un dendrímero presenta tres componentes esenciales: un núcleo central multifuncional, los brazos ramificados que crecen desde la unidad central y una superficie exterior con grupos funcionales terminales. Cada paso posterior del crecimiento de una nueva capa representa una nueva generación de dendrímero (Figura 12).¹¹⁸ La unidad central sobre la que crece el dendrímero puede ser un átomo o una molécula, y el número de ramificaciones influirá en la multiplicidad y el tamaño de la estructura final. La flexibilidad/rigidez de un dendrímero viene condicionada por la elección de las unidades de ramificación y los grupos terminales.¹¹⁴

Ejemplos de este tipo de estructura dendrímica flexible son los dendrímeros POPAM (polipropilenoamina)¹¹⁹ y PAMAM (poliaminoamida)¹¹⁷, mientras que los dendrímeros con unidades de ramificación basadas en poliareno¹²⁰ y fenilacetileno¹²¹ presentan una estructura con una alta rigidez.

La generación (G_x) de un dendrímero viene determinada por el crecimiento de cada capa de este. Los grupos terminales son los que quedan expuestos en la periferia y el número de estos, está determinado por la generación del dendrímero, el número de grupos reactivos del núcleo y las unidades de ramificación.

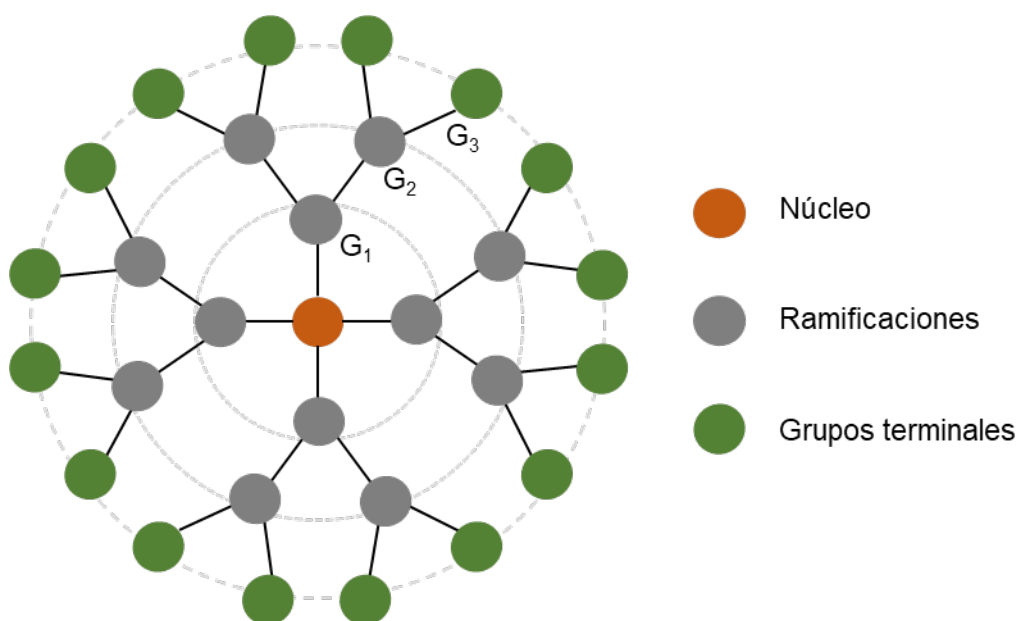


Figura 12. Representación de la figura de un dendrímero.

Propiedades como la estabilidad, solubilidad o viscosidad se pueden modificar seleccionando los grupos adecuados y así, unir moléculas con características específicas a la superficie del dendrímero. Estas características los hace únicos para su aplicación con fines de biodetección.¹²²

Paralelamente al desarrollo de los dendrímeros, han surgido como nuevos y potenciales candidatos para muchas bioaplicaciones los materiales a base de óxido de hierro y sílice debido a su alta biocompatibilidad, a la diversidad de tamaños posibles de sintetizar con procedimientos bien establecidos, sencillos y reproducibles. Además de una funcionalización sencilla y eficaz de la superficie involucrando reactivos baratos y procesos a temperatura ambiente.^{123,124}

Dentro de este contexto expuesto, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo de tesis doctoral ha desarrollado una investigación focalizada hacia el estudio de la potencialidad de los dendrímeros para emular las proteínas portadoras endógenas, que conforman el conjugado hapteno-portador, el antígeno responsable del proceso alérgico a fármacos.¹²⁵

Los primeros estudios sobre el reconocimiento de fármacos sIgE se enfocaron en conjugar los fármacos o metabolitos responsables de la RAF con una molécula portadora para imitar el reconocimiento de sIgE *in vivo* y así poder anclar una alta densidad de estos conjugados fármaco-portador a superficies sólidas con accesibilidad para unir sIgE minimizando las interacciones inespecíficas.⁹⁹

En este sentido los primeros trabajos con éxito consistieron en el uso de dendrímeros para imitar proteínas transportadoras y su inmovilización sobre varios soportes sólidos para ser utilizados en el radioinmunoensayo RAST. Posteriormente, se iniciaron estudios para modificar la fase sólida, en este sentido hay estudios sobre soportes sólidos basados en zeolitas y partículas de sílice, las cuales presentan unas características ventajosas a la hora de realizar la función de soporte sólido debido a su fácil funcionalización superficial y buen control del tamaño de partícula.¹⁰¹

Por otro lado, se debe tener presente a la hora de destinar este tipo de materiales para la función de soporte sólido la dificultad y el coste de preparación, ya que influirían negativamente para su estandarización como uso diagnóstico a nivel hospitalario. En relación con esto, las zeolitas, a pesar de ser excelentes y prometedoros materiales debido a su gran área superficial, implican procedimientos de síntesis tediosos difícilmente estandarizables para su uso a nivel hospitalario. Al contrario, las partículas de sílice (SiO₂), presentan procedimientos de síntesis bien establecidos, fáciles y reproducibles. Además de no ser citotóxicas y tener una excelente estabilidad fisicoquímica que permite múltiples estrategias de funcionalización, lo que es muy interesante a la hora de establecer protocolos para anclar las estructuras hapteno-portador necesarias para diagnosticar la alergia.^{100,126}

En base a todos estos resultados prometedoros con la trayectoria del desarrollo de los dendrímeros en el grupo y los problemas expuestos previamente para el diagnóstico de las reacciones alérgicas, en este proyecto de tesis se ha desarrollado una investigación sustentada en el estudio de la síntesis de partículas tanto de sílice como de óxido de hierro recubiertas de una capa de sílice como soporte sólido, para este tipo de nano-conjugados

dendrímico-hapteno en los test *in vitro* utilizados actualmente para el diagnóstico de reacciones adversas a fármacos.

III.2. Partículas de sílice con determinante antigénico mixto DeAn@SiO₂.

Dentro de los trabajos desarrollados en los últimos años por el grupo de investigación en la mejora de test *in vitro* para diagnóstico de reacciones adversas a fármacos, se inició una línea de investigación basada en el estudio de nuevos materiales. En este sentido se han realizado diferentes pruebas de concepto donde se emplearon diferentes nanomateriales como soporte sólido en lugar de los tradicionales discos de celulosa.^{100,126}

En este sentido y con el respaldo de esta investigación se pretenden abordar los siguientes objetivos en este apartado: Sintetizar partículas de sílice incorporando nuevos determinantes antigénicos, y su posterior validación mediante ensayos RAST.

A la hora de desarrollar un protocolo para realizar el ensayo RAST con discos de celulosa, la recuperación del soporte sólido después de los ciclos de lavado consiste en secar el propio disco, siendo un procedimiento muy fácil y rápido de llevar a cabo. Cuando se utilizan nanopartículas, este procedimiento se complica ya que la forma de recuperar el soporte sólido es mediante ciclos de centrifugación.

Estas etapas de lavado imponen una limitación a la hora de optimizar los tiempos del test, ya que a menor tamaño de partícula se aumentarán los tiempos de centrifugación y por consiguiente los tiempos de realización del test.

Una de las ventajas de utilizar nanomateriales es la gran relación existente entre la cantidad de nanomaterial empleado y el área superficial que esta presenta. Sin embargo, teniendo en cuenta que las partículas sintetizadas en este trabajo tienen como objetivo final una aplicación en el ámbito de diagnóstico hospitalario, hemos llegado a un compromiso donde poder emplear el menor tamaño de partícula posible sin extender demasiado los tiempos de realización de los ensayos (que se van a ver afectados por los tiempos de centrifugación).

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de partículas de sílice de 500 nm de diámetro. Para su modificación superficial se han elegido AX y BP como fármacos de estudio, tanto por separado como conjuntamente en la misma partícula. Estas partículas con el determinante antigénico mixto presentan la ventaja de poder llevar a cabo una evaluación del paciente más eficaz y diagnosticar posibles alergias a dos fármacos diferentes en un único test, acortando los tiempos del diagnóstico.

III.2.1. Síntesis de partículas de Sílice.

Existen diversos métodos de síntesis de partículas de sílice, sin embargo, uno de los más citados y extendidos es el método Sol-Gel. El término Sol-Gel fue acuñado por Thomas Graham en 1864 mediante el desarrollo de trabajos con dispersiones de sílice, donde obtenía cristales muy brillantes que denominó "soles de sílice".¹²⁷

Desde ese momento diversos autores han trabajado en el desarrollo de este método para síntesis de estos materiales.^{128,129} Uno de los autores más citados para la obtención de partículas de sílice mediante el método Sol-Gel ha sido Werner Stöber, el cual le da nombre al método más extendido en la obtención de partículas de sílice.¹³⁰

De manera general, el proceso de síntesis de partículas por el método Sol-Gel trae consigo una primera etapa de formación de una suspensión coloidal de partículas en un medio líquido, denominado Sol. Y una segunda etapa donde las partículas reaccionan entre sí formando una red tridimensional, denominada Gel.

En el método descrito por Stöber, en la primera etapa de la reacción (Sol) se utiliza un tetraalcoxido de silicio como precursor, que es hidrolizado en una mezcla de etanol, hidróxido de amonio y agua. En la segunda etapa (Gel), ocurre la formación de los enlaces siloxano generando la partícula (Figura 13). El agua y el etanol desempeñan la función tanto de reactivo como de producto en esta reacción, lo que origina una inestabilidad en el sistema originando una reacción autocatalítica. El equilibrio de esta reacción está condicionado por varios factores como el pH, la temperatura, las especies iónicas y la concentración de especies, entre otras variables, que afectan directamente al tamaño y propiedades de las partículas obtenidas.^{130,131}

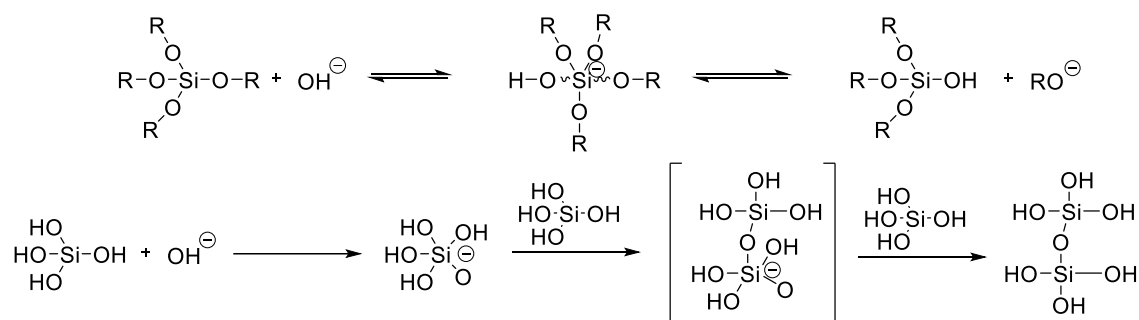


Figura 13. Mecanismo de formación de partículas de SiO₂ por el método de Stöber.

En este trabajo hemos empleado el método de Stöber para preparar las partículas de 500 nm de diámetro. En primer lugar, se prepara una mezcla de amoníaco (NH₃) y etanol absoluto que se agita durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añade tetraetilortosilicato (TEOS) y se mantiene en agitación durante 16h a temperatura ambiente. Tras este tiempo se puede observar la aparición de un sólido blanco correspondiente a la matriz del material (SiO₂).

Las partículas obtenidas se han evaluado mediante diferentes técnicas de caracterización.

♦ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de las partículas SiO₂ presenta bandas vibracionales características de los enlaces Si-O-Si y Si-OH (1100 $\nu_{\text{asimétrica Si-O-Si}}$, 950 $\nu_{\text{simétrica Si-OH}}$, 795 $\nu_{\text{asimétrica Si-O-Si}}$ cm⁻¹) (Figura 14).¹³²⁻¹³⁴ Por lo tanto se ha podido confirmar la formación de la matriz de sílice de las partículas

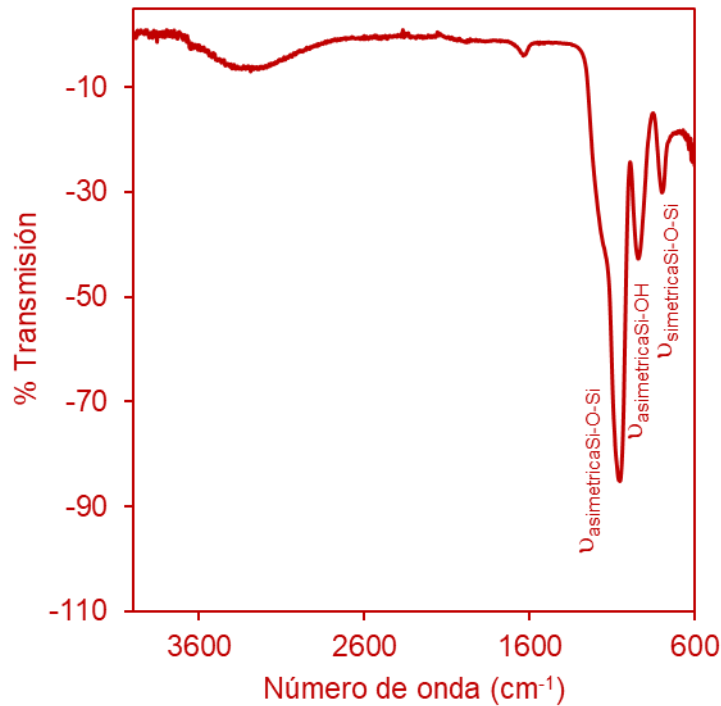


Figura 14. FTIR de las partículas de SiO₂ obtenidas.

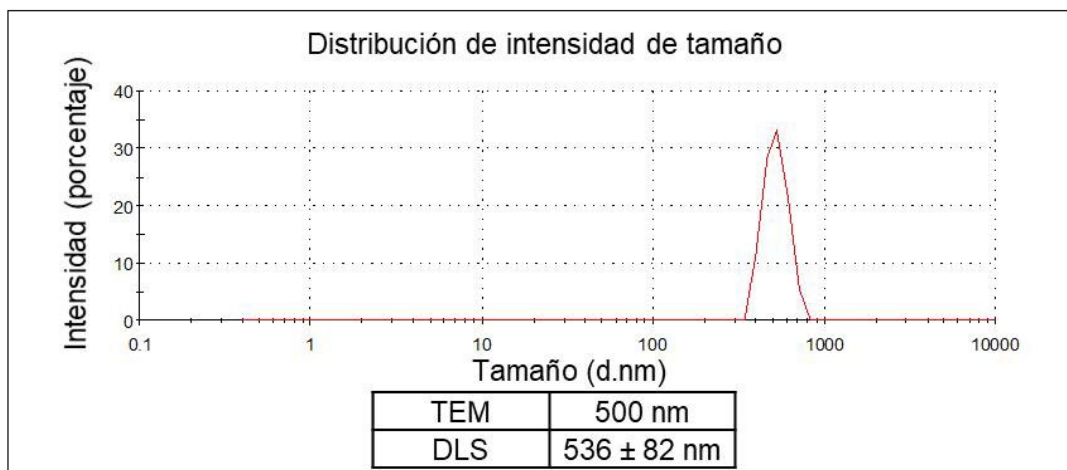
◆ **Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

Las micrográficas obtenidas mediante TEM muestran una muestra monodispersa, con una morfología esférica de las partículas y un diámetro de tamaño 500 nm. Por lo que se ha podido observar la obtención de la muestra de la forma y tamaño deseado (Figura 15 b)).

◆ **Dispersión de luz dinámica (DLS).**

Esta técnica permite medir el diámetro hidrodinámico que presentan las partículas en dispersión. El espectro de DLS de las partículas presenta una única banda a tamaño 536 nm y un PDI de 0,36, lo que indica que la mayoría de las partículas tienen este tamaño. Por lo que se puede observar el tamaño y la homogeneidad de las partículas SiO₂ obtenidas (Figura 15 a)).

a)



b)

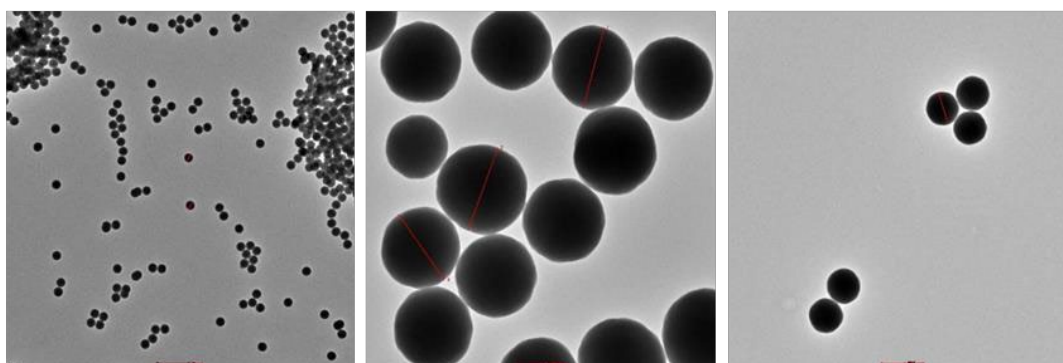


Figura 15. a) Medidas de DLS de las partículas de SiO₂ obtenidas, b) Imágenes de TEM de SiO₂ tratadas con el equipo Thermo Fisher Scientific-TEM Imaging and Analysis program, version 4.71 SP1.

III.2.2. Modificación química de la superficie de las partículas.

Varios factores son importantes a la hora de destinar las partículas sintetizadas para su uso como soporte sólido en la aplicación clínica de diagnósticos *in vitro*. El más importante es minimizar las interacciones no específicas entre la superficie de la partícula y los sueros a analizar. Para ello es imprescindible llevar a cabo una correcta y versátil modificación superficial de las partículas, la cual permita una alta densidad de determinantes antigénicos en un entorno hidrófilo.

En el presente trabajo se ha diseñado una metodología eficaz y reproducible formada por varias etapas de reacción, para conseguir con éxito el ensamblaje del conjugado hapteno portador a la superficie de la partícula (Figura 16).

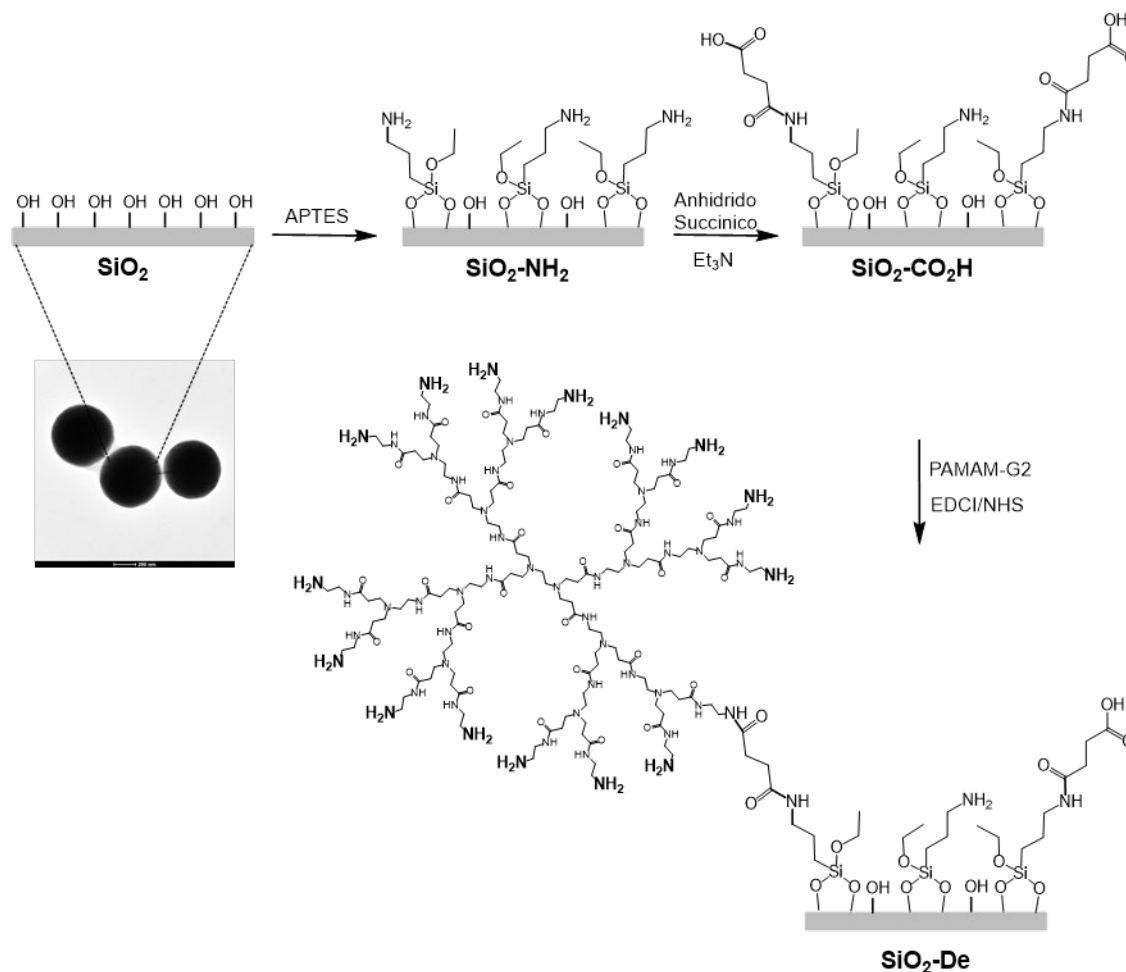


Figura 16. Esquema de funcionalización de las partículas de SiO_2 .

La primera etapa de la funcionalización superficial de las partículas SiO_2 consiste en la inserción de grupos amino. Para ello se han hecho reaccionar los grupos hidroxilos de la superficie de la sílice con un gran exceso de 3-(aminopropil)triethoxisilano (APTES) dispersando las partículas en tolueno y calentando a reflujo durante 16h.

Tras la reacción se han eliminado los restos de reactivos mediante sucesivos lavados con tolueno y posteriormente con agua. El APTES actúa como agente de acoplamiento, formando enlaces covalentes con los grupos hidroxilos de la superficie de la partícula, obteniendo como resultado de esta reacción partículas funcionalizadas con grupos amino ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) en su superficie. La reacción de silanización es una de las técnicas más efectivas actualmente unir moléculas orgánicas a materiales inorgánicos como las partículas.^{135,136}

La segunda etapa consiste en la introducción de grupos carboxílicos sobre la superficie de las partículas funcionalizadas con grupos amino. Para ello se han hecho reaccionar $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ con un gran exceso de anhídrido succínico, empleando como disolvente dimetilformamida (DMF), durante 16h a temperatura ambiente.

En esta reacción se utilizó trietilamina (TEA) para desplazar el equilibrio hacia la formación del enlace amida, haciendo reaccionar a la mayor cantidad de grupos amino, introduciendo así un gran número de estos grupos carboxílicos. Esta reacción ha dado lugar a partículas con ácidos carboxílicos en su superficie, **SiO₂-CO₂H**.¹³⁷ Las partículas obtenidas se sometieron a sucesivos lavados con DMF y agua.

La etapa final ha consistido en la unión covalente de los dendrímeros PAMAM a la superficie de las partículas. En este trabajo se han elegido dendrímeros PAMAM comerciales debido a los excelentes resultados que el grupo ha observado en sus trabajos anteriores. La generación de dendrímero elegida ha sido la generación 2 (G2, 16 grupos amino terminales), ya que, en trabajos anteriores del grupo en la funcionalización con AX y BP de estos dendrímeros, se ha comprobado que tanto esta generación como la generación 4 (G4, 64 grupos amino terminales) presentan excelentes resultados. Siendo G2 más económico.¹⁰⁷

Para llevar a cabo esta reacción, primero se activaron los grupos carboxílicos con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) y N-Hidroxysuccinimida (NHS) manteniendo en agitación las partículas dispersadas en DMF con un exceso de ambos reactivos en relación EDCI:NHS 1:1,2. Posteriormente, se hacen reaccionar estos grupos carboxílicos activados con una disolución de dendrímeros PAMAM-G2 disueltos en DMF durante 16h a temperatura ambiente. Tras la reacción, las partículas se han sometido a sucesivos lavados con DMF y agua. Las partículas obtenidas se han denominado **SiO₂-De**

III.2.3. Funcionalización de las partículas con el fármaco a evaluar.

Para modificar los dendrímeros anclados a la superficie con el fármaco a estudiar, se han hecho reaccionar los grupos aminos libres del dendrímero con el grupo carbonilo del anillo de β -lactama de AX y BP.

El protocolo de reacción se ha llevado a cabo siguiendo una metodología eficaz y reproducible, optimizada por el grupo de investigación en trabajos anteriores con dendrímeros PAMAM, donde se observa en todos los casos a la funcionalización del dendrímero completo.¹²⁵

Se han preparado tres tipos de partículas diferentes (**DeAn@SiO₂**) utilizando amoxicilina y bencilpenicilina como antibióticos β -lactámicos ya sea por separado o combinados en la misma partícula.

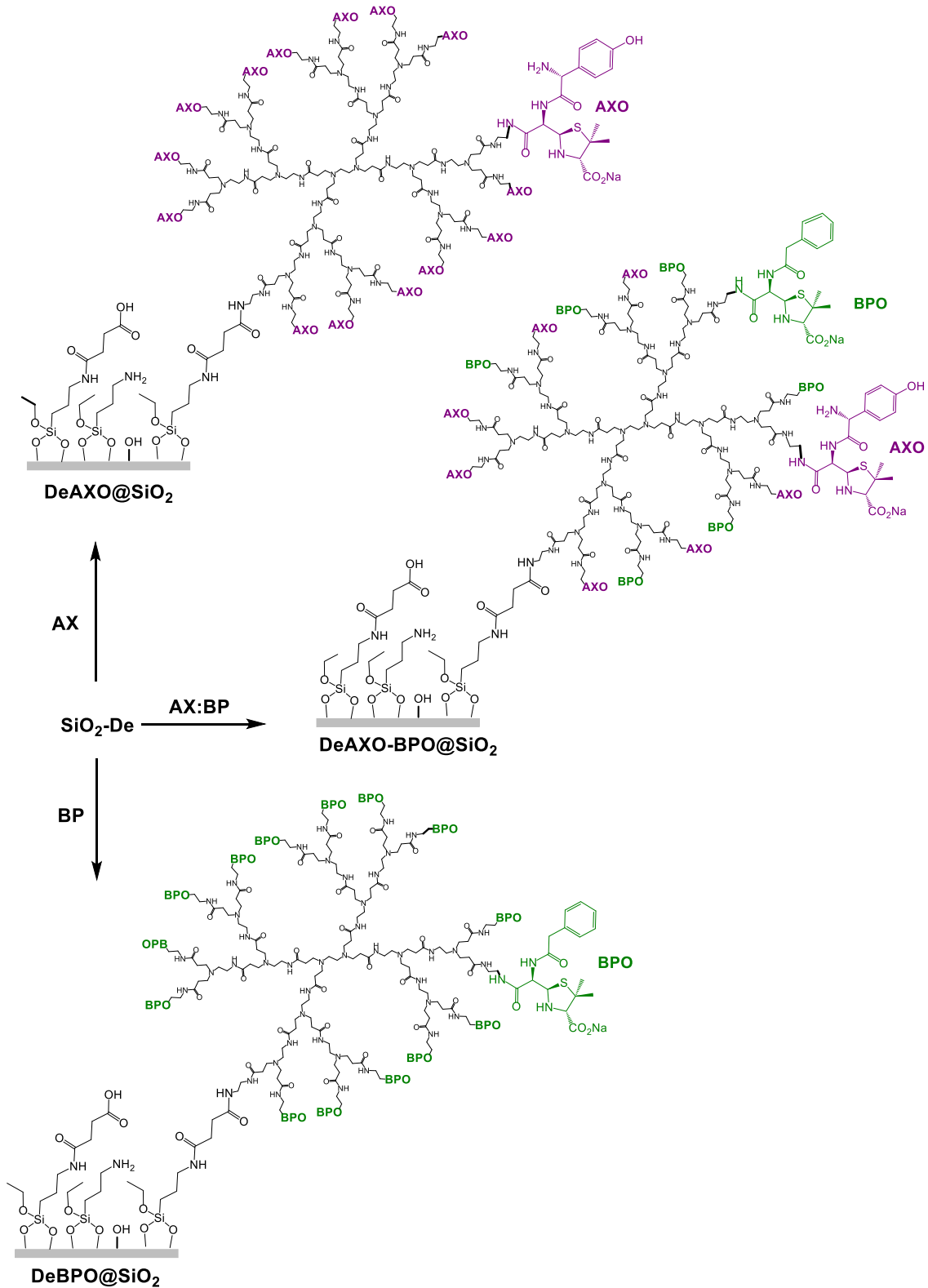


Figura 17. Esquema sintético de las partículas de DeAn@SiO₂.

En primer lugar, se han hecho reaccionar las partículas modificadas con el dendrímero ($\text{SiO}_2\text{-De}$) con un gran exceso de amoxicilina en una disolución tampón carbonato/bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) a $\text{pH}= 11,4$, durante 7 días, a 4°C .

Durante estos siete días la reacción se ha refrescado diariamente con un exceso de amoxicilina para asegurarnos que todos los grupos amino libres del dendrímero reaccionan con la β -lactama. Tras este tiempo las partículas obtenidas (**DeAXO@SiO₂**) se han lavado con PBS 1X y agua.

Para obtener las partículas donde se ha anclado covalentemente bencilpenicilina (**DeBPO@SiO₂**) se ha llevado a cabo el mismo procedimiento, pero empleando BP en lugar de AX.

Para obtener las partículas mixtas (**DeAXO-BPO@SiO₂**) se ha hecho reaccionar una dispersión de **DeAn@SiO₂** en una disolución tampón carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃/NaHCO₃) con una mezcla 1:1 de AX:BP durante 7 días a 4°C (Figura 17). Ambos antibióticos β -lactámicos se han añadido en exceso refrescando con una mezcla de ambos 1:1 cada día. Tras los 7 días las partículas se han lavado con PBS y agua. En este caso es de esperar que ambos antibióticos se anclen arbitrariamente a la periferia del dendrímero.¹²⁵

III.2.4. Caracterización de las partículas obtenidas.

Para llevar a cabo la caracterización de estas partículas se han empleado diferentes técnicas que se detallan a continuación:

◆ **Potencial-Z.**

Las medidas de Potencial-Z se han utilizado para hacer un seguimiento de cada etapa de funcionalización, ya que es de esperar que la carga superficial cambie en cada etapa. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Las medidas de Potencial-Z se han realizado por triplicado y a una concentración de 1mg de partículas en 1 ml de PBS (pH fisiológico 7,4).

Tabla 3. Datos de potencial Z de las partículas SiO₂ funcionalizadas

| Partículas | Potencial-Z (ξ) mV |
|-------------------------------------|--------------------------|
| SiO ₂ | -64 \pm 8 |
| SiO ₂ -NH ₂ | 20 \pm 5 |
| SiO ₂ -CO ₂ H | -40 \pm 6 |
| SiO ₂ -De | 41 \pm 7 |
| DeAXO@SiO ₂ | -8,6 \pm 6 |
| DeBPO@SiO ₂ | -25 \pm 5 |
| DeAXO-BPO@SiO ₂ | -12 \pm 4 |

Se ha podido observar que las partículas **SiO₂**, las cuales presentan grupos hidroxilos en su superficie, muestran una carga negativa, debido a que los grupos hidroxilos se encuentran desprotonados en PBS, ya que presentan un valor de pK_a de 6.8.^{138,139}

Cuando la superficie de la partícula presenta grupos amino (**SiO₂-NH₂**), las medidas de potencial-Z muestran un cambio a valores positivos. Esto es debido a los valores de pK_a comprendidos entre 9 y 10, que presentan estos grupos amino, los cuales se encuentran protonados en PBS.

En el caso de **SiO₂-CO₂H** se han vuelto a observar valores negativos de potencial-Z. Esto es consistente con la nueva funcionalización, ya que en este caso la superficie está recubierta por grupos carboxílicos (pK_a entre 4 y 5), que en PBS se encuentran en forma de carboxilato, y por tanto cargados negativamente.

Después de la reacción con el dendrímero PAMAM-G2, los valores de potencial-Z vuelven a cambiar hacia valores positivos. Se ha observado además una carga positiva que duplicaba el valor obtenido para **SiO₂-NH₂**. Asumiendo que cada PAMAM-G2 reacciona con la superficie de la partícula con un solo grupo amino, quedan por tanto 15 grupos amino por dendrímero libre.¹⁰⁰ En consecuencia, existen 15 grupos cargados positivamente en la periferia del dendrímero, mientras que las aminas terciarias internas de la estructura del PAMAM no permanecen protonadas en PBS.¹⁴⁰

La reacción de los grupos amino terminales de los dendrímeros con el anillo de β-lactama de los antibióticos provoca de nuevo un cambio en los valores de potencial-Z a valores negativos en todos los casos.

En el caso de **DeAXO@SiO₂**, el epítipo amoxiciloilo anclado al dendrímero posee un grupo fenol en su forma neutra a pH fisiológico, ya que su pK_a posee un valor de 9.6. Sin embargo, el grupo carboxilo debe estar en su forma carboxilato, es decir, cargado negativamente. Por otro lado, el grupo amino primario de AXO tiene un pK_a de 7.4,¹⁴¹ lo que significa que aproximadamente el 50% de estos grupos aminos están protonados a pH fisiológico. Debido a esto, la presencia de cargas negativas en el 100% de las unidades de AXO y de cargas positivas en el 50% de ellas ancladas al dendrímero, hace que el 50% de estas unidades no estén cargadas mientras que el resto poseen una carga negativa.

En el caso de **DeBPO@SiO₂**, la ausencia tanto del grupo hidroxilo como del grupo amino, en comparación con AXO, hace que todas las unidades de BPO ancladas a los dendrímeros estén cargadas negativamente. Este hecho es consistente con un valor más bajo de potencial-Z para las partículas funcionalizadas con BPO que con AXO.

En el caso de **DeAXO-BPO@SiO₂**, el potencial-Z ha presentado un valor intermedio, lo que es consistente con correspondiente a la presencia de ambas unidades de fármaco en la superficie.

◆ Test de Ninhidrina.

Para llevar a cabo una estimación del grado de funcionalización de las partículas se ha realizado el test de Ninhidrina, lo que permite cuantificar el número de grupos amino primarios libres presentes en la superficie de las partículas.¹⁴²

El test de Ninhidrina, diseñado por Siegfried Ruhemann en 1910, se basa en la reacción de las aminas primarias con ninhidrina para formar un complejo, denominado complejo de Ruhemann's, de color púrpura (Figura 18).¹⁴³ La medida de la absorbancia de la disolución resultante (a la longitud de onda de 570 nm) se puede correlacionar con la cantidad de grupos amino presentes.

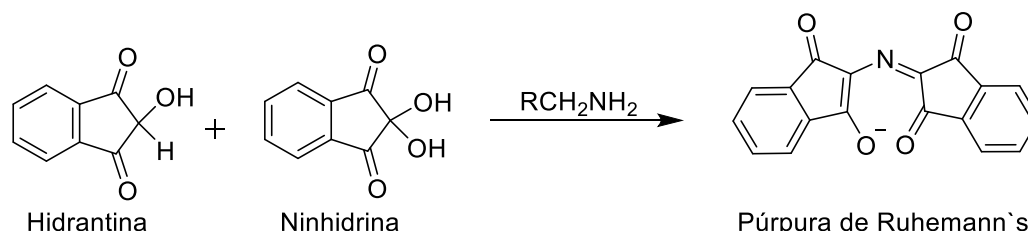


Figura 18. Reacción de la ninhidrina con grupos aminos primarios para formar el complejo de Ruhemann's

En este trabajo, el protocolo que se ha llevado a cabo para la realización del test de Ninhidrina se basa en una primera incubación de las partículas funcionalizadas en una disolución de ninhidrina e hidrantina en DMSO anhidro y acetato de litio 4M, a una temperatura de 100°C durante 15 minutos, para formar el complejo de Ruhemann's. Posteriormente, se enfría la suspensión de partículas y se filtra para separar las partículas del sobrenadante y medir así la absorbancia de la disolución coloreada.

Previamente a las medidas de la muestra, se ha realizado una recta de calibrado con butilamina en un rango de concentraciones conocidas entre 100 y 650 μM , siguiendo el mismo protocolo descrito. De esta manera hemos estimado la cantidad de grupos amino anclados covalentemente a la superficie en los diferentes pasos de reacción.^{144,145}

El valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina, expresado en μmol de grupos aminos por gramo de partícula, indica la introducción de **113 μmol de grupos amino por gramo** de partículas (**$\text{SiO}_2\text{-NH}_2$**). Tras la reacción de estos grupos amino con un exceso de anhídrido succínico, se ha detectado una disminución del valor obtenido al realizar el test de Ninhidrina a **$\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$** , siendo este valor **57 μmol de grupos amino por gramo** de partículas. Este dato indica que se han insertado 56 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas de **$\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$** , y por tanto, han reaccionado aproximadamente el 50% de los grupos aminos de la superficie de la partícula

Después del acoplamiento covalente del dendrímero PAMAM-G2 sobre la superficie de las partículas, se ha obtenido un valor al realizar el test de Ninhidrina de **170 μmol de grupos amino por gramo** de partículas **$\text{SiO}_2\text{-De}$** . Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 57 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 113 $\mu\text{molNH}_2/\text{g}$ de partículas **$\text{SiO}_2\text{-De}$** .

Esto implica la introducción de 7.5 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas de **$\text{SiO}_2\text{-De}$** . Asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 13% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 19).

En este sentido y asumiendo que las partículas son esferas perfectas de sílice de 500 nm y densidad $2,2 \text{ g/cm}^3$ y que no ocurren procesos de agregación durante el proceso de modificación superficial, se ha podido estimar que 1 gramo de partículas presentan una área superficial aproximada de 6 m^2 (ver sección VI.4).¹⁴⁶ Por lo tanto, se ha podido estimar la presencia de aproximadamente un dendrímero de PAMAM-G2 por nm^2 en las partículas de $\text{SiO}_2\text{-De}$.

Teniendo en cuenta las aproximaciones y supuestos anteriores, este valor indica una cobertura casi completa de la superficie de las partículas con dendrímeros.

Figura 19. Estimación del grado de funcionalización durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula.

Para estimar la cantidad de fármaco anclado covalentemente a la superficie se asume que los 15 grupos amino libre del dendrímero PAMAM-G2 anclado a la superficie de la partícula reaccionan con unidades de fármaco.^{107,125} Sabiendo que la contribución de grupos amino correspondiente al dendrímero en $\text{SiO}_2\text{-De}$ es de $113 \mu\text{mol}$ de $-\text{NH}_2/\text{g}$ de partícula, y asumiendo que los 15 aminos libres del dendrímero reaccionan con el fármaco, la cantidad de fármaco (AX y BP) anclado covalentemente a $\text{SiO}_2\text{-De}$ será de $113 \mu\text{mol}$ de fármaco/g de partícula de **DeAXO@SiO₂**, **DeBPO@SiO₂** y **DeAXO-BPO@SiO₂**.

Los datos después realizar el test de Ninhidrina a diferentes lotes de partículas sintetizadas y funcionalizadas en su superficie obtenidos han dado como resultado valores similares, indicando con un grado de funcionalización similar en cada lote, es decir, obteniéndose partículas homogéneas y reproducibles. Se ha desarrollado por tanto un método de modificación reproducible.

◆ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de todas las partículas preparadas, muestra una banda intensa alrededor de 1050 cm^{-1} , característica de los enlaces Si-O-Si ($\nu_{\text{Si-O-Si}}$).

Además, aparecen dos nuevos picos en el espectro de **SiO₂-De** y **DeAn-SiO₂**. Estas nuevas bandas, a 1635 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , son típicas de los grupos amida ($\nu_{\text{C=O}}$ y $\nu_{\text{N-H}}$ respectivamente) y se observan en todas las partículas donde el dendrímero está unido covalentemente (Figura 20).

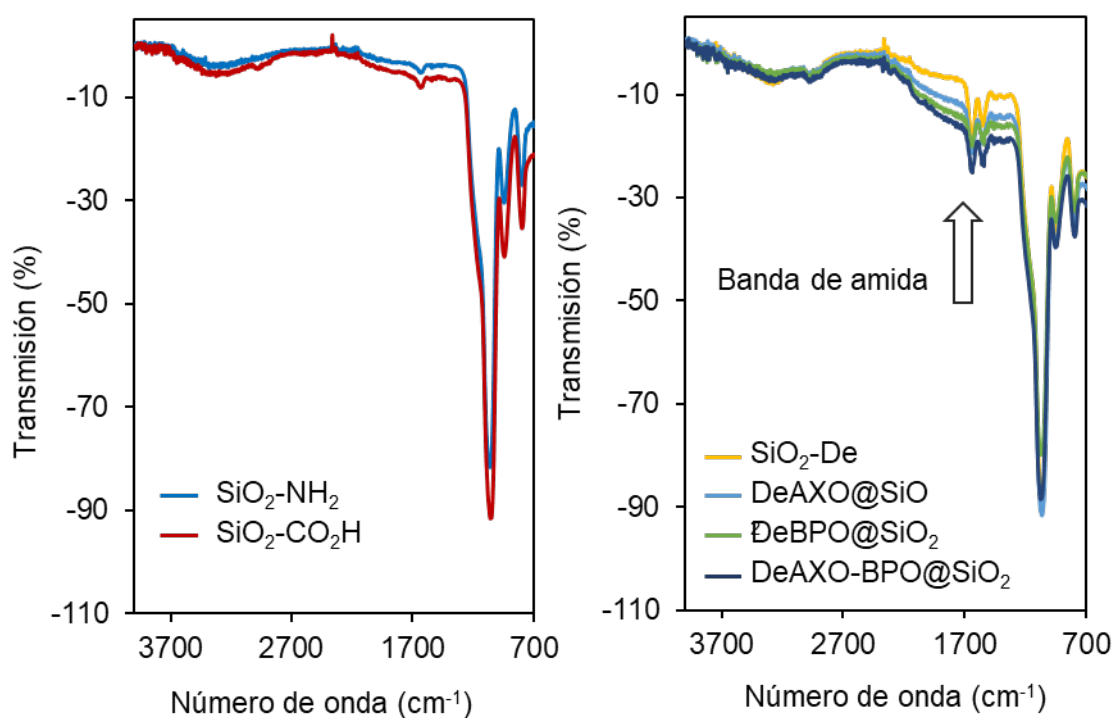


Figura 20. FTIR de las partículas funcionalizadas de SiO₂.

◆ **Resonancia magnética nuclear de sólido (¹H-RMN).**

Se han realizado espectros de ¹H-RMN de sólido de las partículas **DeAXO@SiO₂**, **DeBPO@SiO₂** y **DeAXO-BPO@SiO₂** donde se ha insertado el determinante antigénico.

Se han utilizado como modelo, los espectros ¹H-RMN de los conjugados amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO). Se han utilizado estos conjugados ya que el determinante antigénico, AXO y BPO, formado tras la reacción de los grupos amino de la superficie del dendrímero con el fármaco es equivalente al que se forma cuando se hace reaccionar butilamina con el fármaco.¹⁰¹

En el espectro **DeAXO@SiO₂** se han podido observar los picos característicos de la unidad de AXO. Las señales correspondientes al anillo de β-lactama abierto se han observado a 4,94 y 4,32 ppm, H-5 y H-6, respectivamente. Cuando este anillo está cerrado en AX, H-5 y H-6 aparecen juntas alrededor de 5,5 ppm. La ausencia de señal en ese rango del espectro indica que no queda anillo de β-lactama cerrado, por lo que no hay AX adsorbida en la superficie de las partículas y todo lo que hay está con el anillo abierto, y por tanto, unida al PAMAM.

Figura 21. a) Espectro de ¹H-RMN de DeAXO@SiO₂ (suspendido en D₂O) y b) Conjugado Amoxicilina-Butilamina (Bu-AXO)

Son característicos también los picos en la región aromática a 7,34 y 6,89 ppm, correspondientes al anillo aromático de AXO (Figura 21).¹⁴⁷ La presencia del dendrímero PAMAM se ha confirmado en todos los espectros por la señal entre 3,7 y 2,0 ppm, típica de este tipo de dendrímeros.

En el espectro **DeBPO@SiO₂** se han podido observar los picos más característicos de la unidad de BPO. Las señales correspondientes al anillo de β-lactama abierto se han observado a 4,94 y 4,32 ppm (H-5 y H-6), respectivamente.

Cuando este anillo está cerrado, estas señales aparecen alrededor de 5,5 ppm al igual que en el caso anterior. Es característico también el pico de la región aromática a 7,5 ppm correspondientes al anillo aromático monosustituido de la estructura de BPO (Figura 22).¹⁴⁷

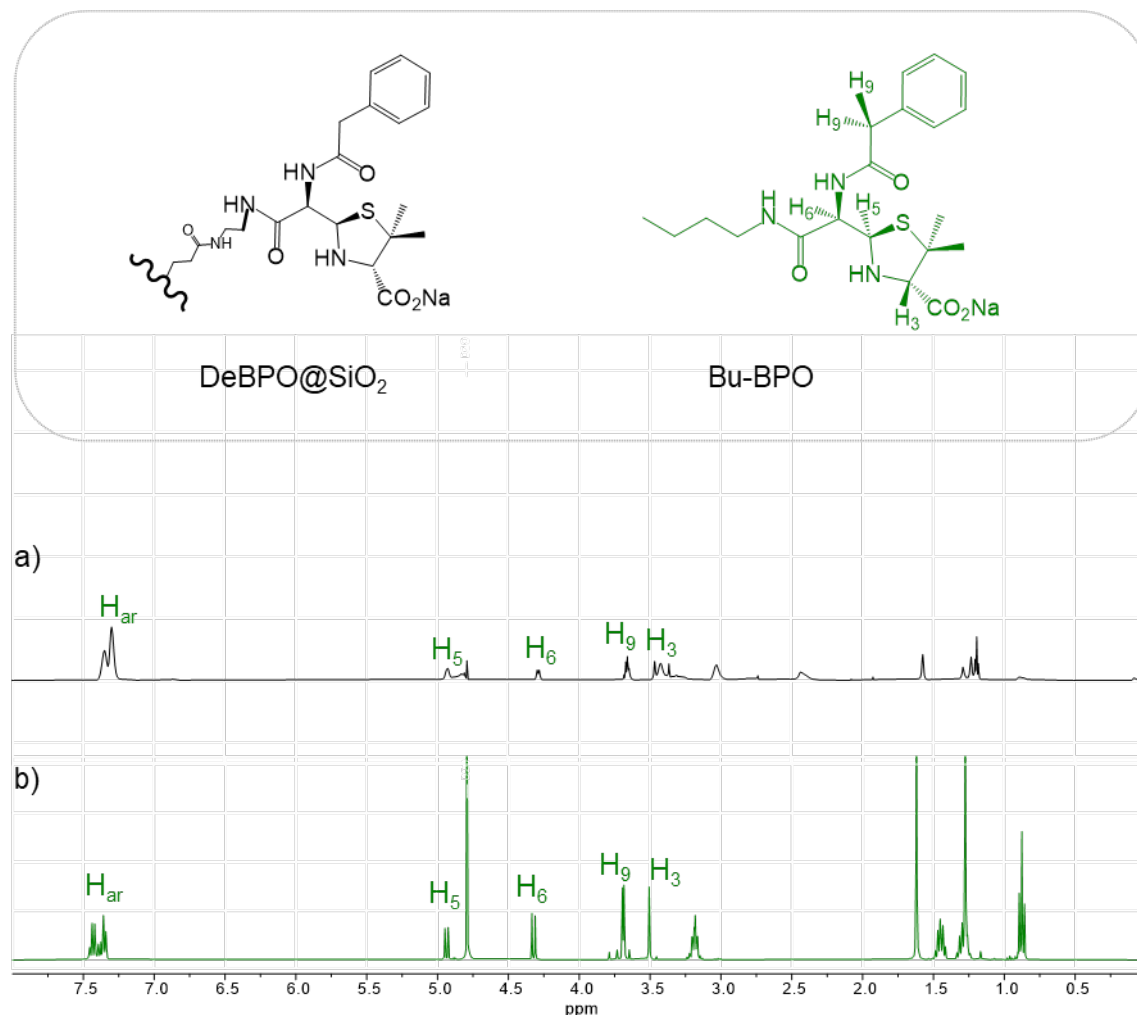


Figura 22. a) Espectro de ^1H -RMN de DeBPO@SiO_2 (resuspendido en D_2O) y b) Conjugado Bencilpenicilina-Butilamina (Bu-BPO) en D_2O .

En el espectro de DeAXO-BPO@SiO_2 se ha podido observar la presencia de restos de AXO y BPO. En la región aromática las señales corresponden al anillo aromático de BPO en un multiplete, y AXO en los dos picos bien definidos alrededor de 7,40 y 7,34 ppm. La ausencia de cualquier señal alrededor de 5,5 ppm indica que no hay presentes anillos de β -lactama cerrados, es decir no se observan antibióticos adsorbidos en la superficie de la partícula.

La presencia de AXO y BPO unidos covalentemente en DeAXO-BPO@SiO_2 también se confirma por las señales de H-5, H-6 y H-3 de las unidades AXO y BPO (Figura 23).

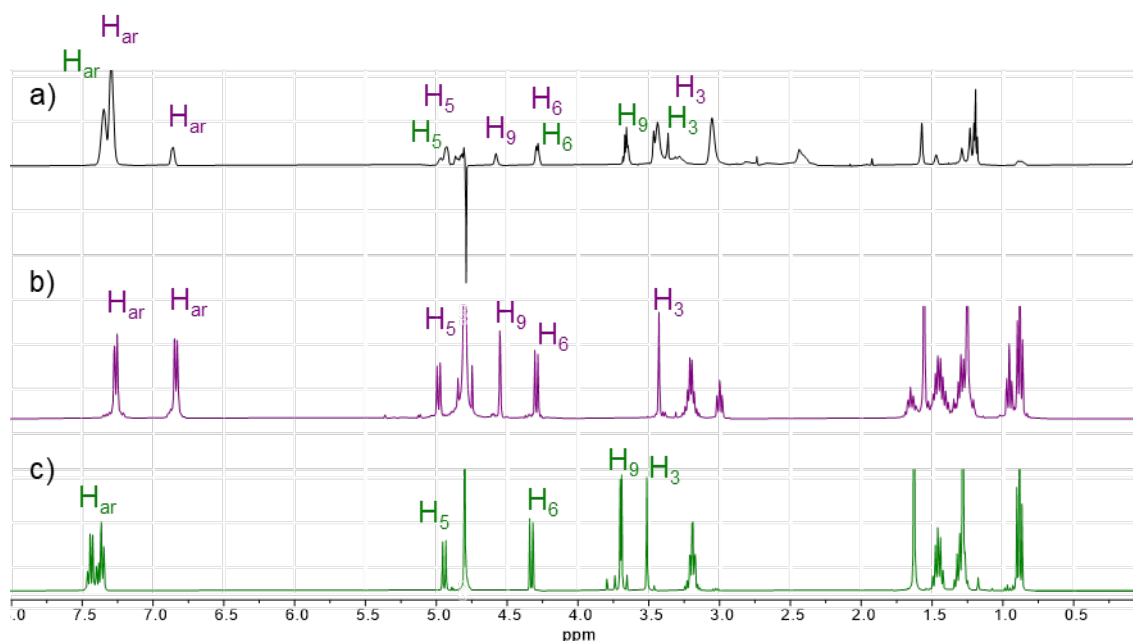


Figura 23. a) Espectro de ^1H -RMN de DeAXO-BPO@SiO₂ (resuspendido en D₂O), b) Conjugado Amoxicilina-Butilamina (Bu-AXO) y c) Conjugado Bencilpenicilina-Butilamina (Bu-BPO) en D₂O.

III.2.6. Ensayos RAST con 500 nm DeAn@SiO₂

Para estudiar el potencial de DeAn@SiO₂ en el diagnóstico de alergia a fármacos, se ha evaluado su capacidad de reconocimiento de IgE específica mediante ensayos RAST (Figura 24).

Estos ensayos se han realizado en colaboración con el grupo de investigación de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga, (HRUM), liderado por la Dra. M.J. Torres.

Para ello se han empleado sueros de pacientes diagnosticados como alérgicos a Amoxicilina y Bencilpenicilina, por técnicas convencionales, e individuos control, es decir, no alérgicos, de acuerdo con las directrices de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI).^{126,148}

El ensayo RAST a realizar consta de varias etapas:

- ◆ Una primera etapa de incubación de las partículas funcionalizadas con el determinante antigénico con el suero de referencia o control y con el suero del paciente a estudio, permitiendo que se produzca el reconocimiento molecular entre la IgE específica del suero, si está presente, y la partícula funcionalizada con el fármaco en su superficie. Esta incubación se realiza mediante agitación en cámara húmeda (550 rpm) durante 16 horas.
- ◆ Una primera etapa de lavado con una disolución de PBS con un 0,05% de Tween 20 mediante tres periodos de centrifugación (10 minutos a 5500 rpm), para separar la fase sólida del sobrenadante.

- ◆ Una segunda etapa de incubación de las partículas a las que se ha unido el anticuerpo IgE, con un anti-anticuerpo humano policlonal IgE marcado radiactivamente con I^{125} . Esta incubación se vuelve a realizar en cámara húmeda mediante agitación (550 rpm) durante 16 horas.
- ◆ Una segunda etapa de lavado con una disolución de PBS con un 0,05% de Tween 20 mediante tres periodos de centrifugación (10 minutos a 5500 rpm), para separar la fase sólida del sobrenadante.
- ◆ Finalmente se mide la radioactividad de las partículas en un contador gamma.

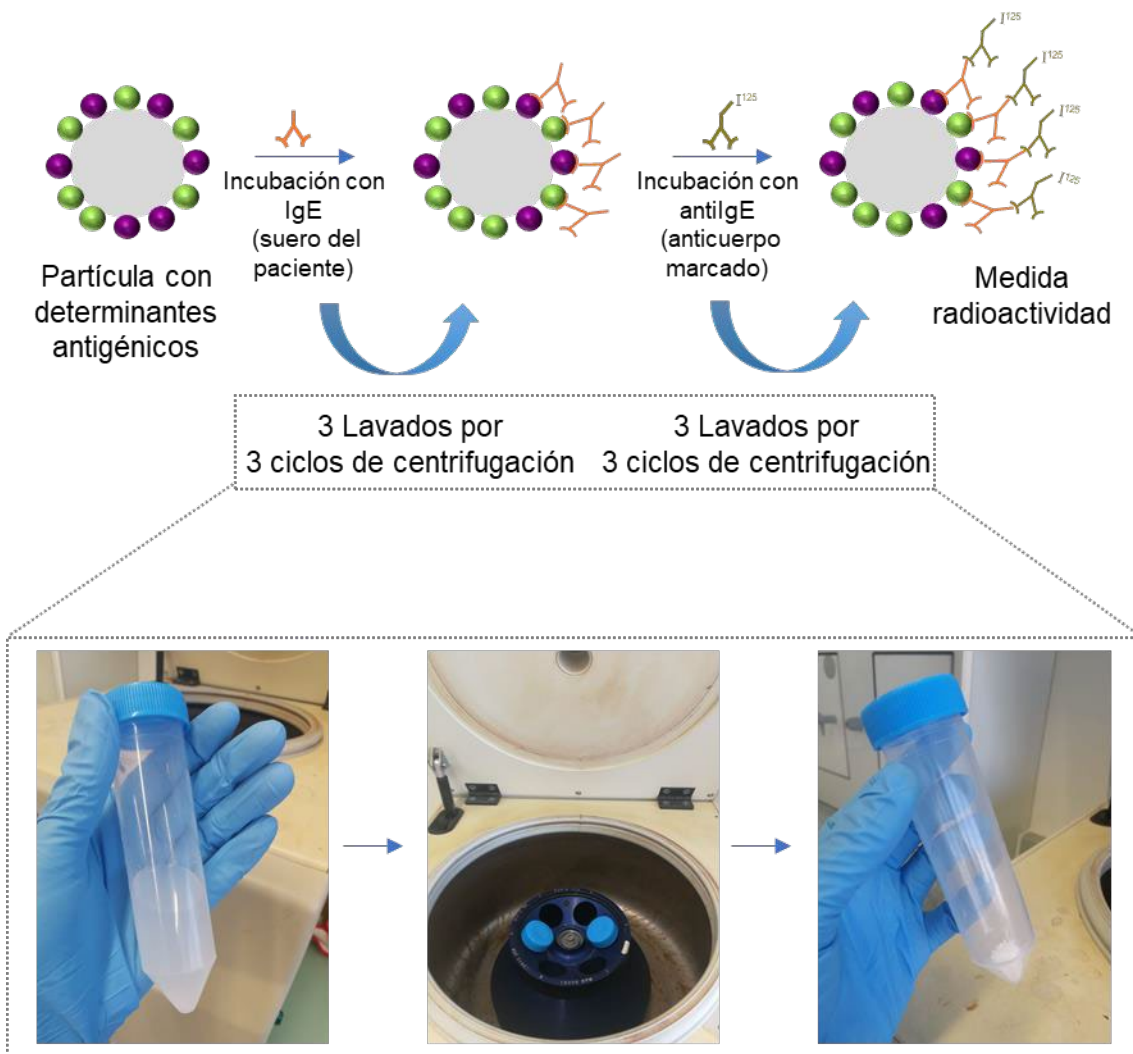


Figura 24. Representación del ensayo RAST con partículas de sílice.

Las etapas más importantes al utilizar partículas para realizar el ensayo RAST son las incubaciones tanto con el suero del paciente como la posterior incubación con el anticuerpo marcado radiactivamente.

En este caso estas etapas se llevan a cabo mediante agitación, para que las partículas estén en dispersión durante todo el periodo de incubación sin que decanten con el paso del tiempo, ya que, si esto ocurre el contacto entre el conjugado hapteno portador y la IgE presente en el suero no es total, por lo que el reconocimiento por parte de la IgE tampoco lo sería.

En este sentido, para que el proceso de incubación sea óptimo hay que llegar a un compromiso entre velocidad de agitación y virulencia de la agitación evitando salpicaduras y por tanto pérdida de suero.

Con este fin se han realizado varios ensayos a diferentes velocidades (450rpm, 500 rpm, 650rpm) para que las partículas estén en dispersión durante todo el periodo de incubación, siendo la velocidad óptima a la que esto ocurre 550 rpm.

Después de establecer este protocolo descrito y con el objetivo de encontrar una concentración óptima de partículas aplicable en clínica, se han realizado dos experimentos diferentes.

1. Optimización de la cantidad de partículas empleadas en el ensayo.

Para determinar la cantidad necesaria de partículas para el reconocimiento de la IgE, el primer experimento realizado ha sido el estudio de las partículas utilizando diferentes cantidades de estas (1.5 mg, 2 mg y 3 mg) suspendidas en un volumen fijo de PBS (20µL).

En este experimento se ha utilizado las partículas DeAXO@SiO₂ y los denominados pool (combinación de sueros de pacientes).

Para este experimento se utilizan dos pool de suero de pacientes alérgicos a amoxicilina, diferenciándose entre sí en la cantidad de IgE que presentan.

- ◆ **Pool (+) alto:** Pacientes diagnosticados alérgicos a AX con una IgE alta.
- ◆ **Pool (+) bajo:** Pacientes diagnosticados alérgicos a AX con una IgE baja.

También se han utilizado POOL de sueros de pacientes control, es decir, pacientes no alérgicos, diferenciándose entre sí en la cantidad de IgE que presentan.

- ◆ **Pool (-):** Pacientes no alérgicos.
- ◆ **Pool (-) IgE alta:** Pacientes no alérgicos a β-lactámicos, pero sí alérgicos a otro tipo de antígeno.

Para llevar a cabo el ensayo RAST hay que realizar dos incubaciones, una primera incubación de las partículas con el suero de paciente o control y otra segunda con el anticuerpo marcado, como se ha visto anteriormente. Estas incubaciones se llevan a cabo en tubos donde se añaden cada tipo de partícula sintetizada y el suero o control a estudiar. Por lo que para comprobar la reproducibilidad del método estas incubaciones se realizan en tubos por duplicado.

En este caso, el ensayo se realiza con 4 pool y un solo tipo de partícula modificada por lo que el número final de tubos para realizar el ensayo es de 20.

Con los valores obtenidos se ha calculado el resultado del % RAST, como porcentaje del máximo de número de cuentas minuto (cpm), según la siguiente ecuación.

$$\% \text{ RAST} = \frac{\text{cpm (fase sólida con el fármaco)} - \text{cpm (fase sólida blanca)}}{\text{cpm máximas}}$$

Los resultados de realizar el RAST con DeAXO@SiO₂ y en lugar de sueros de pacientes, los pool de suero se muestran en la figura 25 y la tabla 31 del apéndice.

En primer lugar, se puede observar que el % de RAST es alto para todas las concentraciones de partículas ensayadas con los pool de sueros positivos, es decir, existe reconocimiento de la nanopartícula funcionalizada por la IgE específica. Para los pool de suero negativos, los cuales no contienen IgE específica el % de RAST es muy bajo o cero.

En segundo lugar y observando el % de RAST únicamente de los pool positivos se puede observar que este aumenta conforme aumenta la concentración de partículas (1.5 mg y 2 mg) hasta llegar a un umbral donde disminuye (3mg), probablemente por la agregación de las partículas al tratarse de más cantidad.

Basándonos en estos datos la cantidad de partícula elegida para realizar el ensayo ha sido 2 mg.

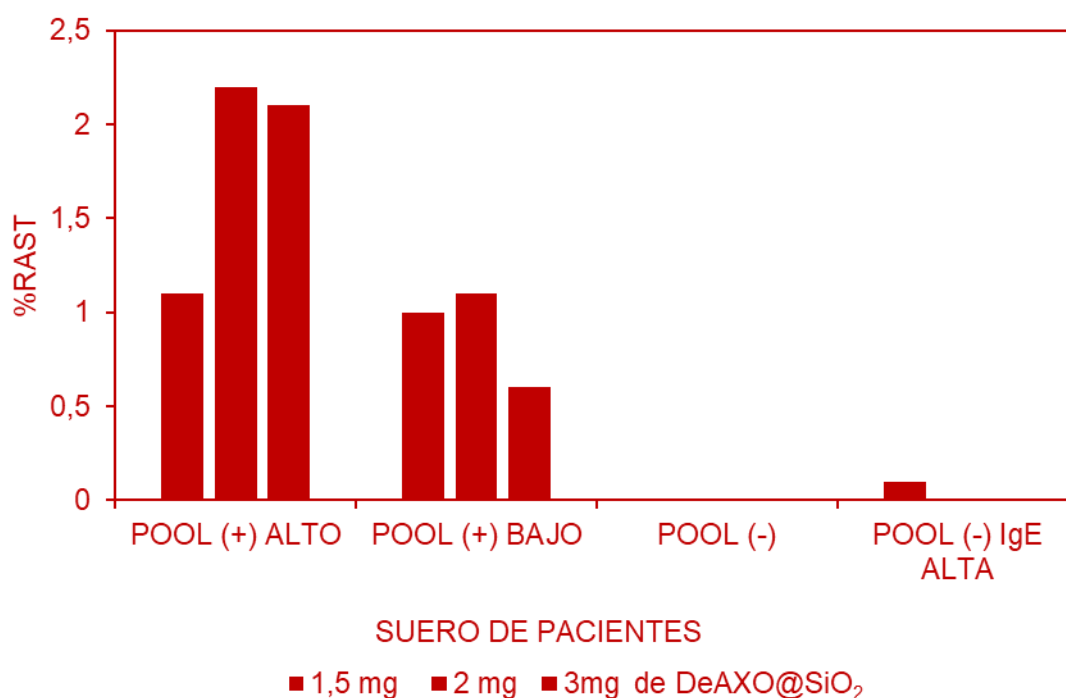


Figura 25. %RAST variando la cantidad de partículas (mg) con un volumen fijo. Valores en tabla 31 del apéndice.

2. Optimización del volumen necesario en el ensayo.

Para determinar el volumen necesario en el que al realizar el ensayo para que las partículas queden en suspensión y el reconocimiento sea el máximo, se ha realizado un segundo experimento fijando la cantidad de partícula empleada (2mg) y variando el volumen final de PBS (20, 70, 120 y 170 μL).

En este experimento se han utilizado las partículas DeAXO@SiO₂ y suero de 3 pacientes alérgicos a amoxicilina.

Los resultados de realizar el RAST con DeAXO@SiO₂ y los 3 sueros de pacientes se muestran en la figura 26 y la tabla 32 del apéndice.

Se puede observar que a mayor volumen de PBS, menor es el % de RAST, es decir menor es el reconocimiento de la IgE específica por las partículas. Este hecho es debido a que cuanto mayor es el volumen en el que se suspenden las partículas, mayor va a ser la dilución tanto del suero del paciente como del anticuerpo marcado en cada etapa, por lo tanto, la interacción es menor.

Basándonos en estos datos, el volumen elegido para desarrollar el ensayo ha sido 20 μL .

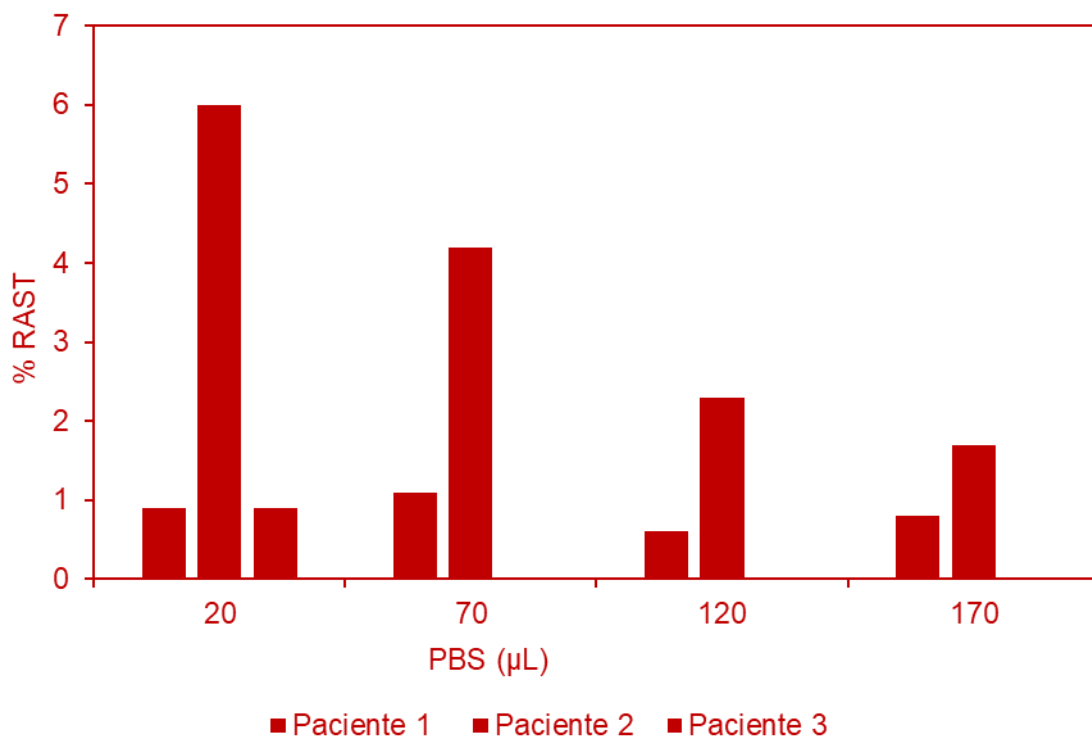


Figura 26. % RAST variando el volumen de PBS1X con una cantidad de partículas (mg) fija. Valores en tabla 32 del apéndice.

En este sentido y en relación con los datos obtenidos en los dos experimentos realizados, la concentración elegida en la que se van a ensayar las partículas posteriormente va a ser **2mg de partícula/20 μL de PBS y 30 μL de suero.**

3. Validación técnica del ensayo RAST con partículas de sílice.

Una vez optimizada la cantidad de partículas y el volumen de PBS adecuado para la realización del ensayo RAST, se ha procedido a hacer una validación técnica del material. Para ello se han llevado a cabo ensayos con 21 sueros de pacientes diagnosticados alérgicos tanto a amoxicilina selectivos como a amoxicilina bencilpenicilina reactividad cruzada y con 10 sueros de individuos control, es decir tolerante a β -lactámicos.

En todos los pacientes alérgicos se ha confirmado la reacción alérgica inmediata a AX, por una prueba cutánea (PC) positiva a AX o por la presencia de IgE específica a AX detectada mediante ImmunoCAP, prueba realizada por los clínicos del hospital Regional de Málaga.⁹⁰ Los valores de ImmunoCAP se muestran en la Tabla 36 del apéndice.

Los pacientes se han clasificado como selectivos a AX (12 sujetos, Grupo A) o reactividad cruzada a BP (9 sujetos, Grupo B), según los resultados de PC o IgE a BP, determinada por ImmunoCAP (negativo para el Grupo A y positivo para el Grupo B).

Estos sueros de pacientes y los controles se han evaluado con los tres tipos de partículas de sintetizadas anteriormente, **DeAXO@SiO₂**, **DeBPO@SiO₂** y **DeAXO-BPO@SiO₂**, usando como material de referencia **SiO₂-De**.

En este caso, el ensayo de validación se ha llevado a cabo con 21 sueros de pacientes y 10 controles, por lo que el número final de tubos para realizar el ensayo es de 248 (tabla 4).

Tabla 4. Número de tubos utilizado en un ensayo RAST de 21 suero con partículas de sílice.

| Partículas | Nº sueros pacientes | Nº sueros control | Nº tubos |
|----------------------------|---------------------|-------------------|----------|
| SiO ₂ -De | 21 | 10 | 62 |
| DeAXO@SiO ₂ | 21 | 10 | 62 |
| DeBPO@SiO ₂ | 21 | 10 | 62 |
| DeAXO-BPO@SiO ₂ | 21 | 10 | 62 |

Antes de analizar los resultados obtenidos después de realizar el ensayo RAST hay que tener en cuenta que en bioanálisis se pueden obtener dos tipos de resultados. Uno donde el resultado únicamente te da información sobre si el resultado es positivo o negativo y otro donde el resultado es un valor (número, porcentaje etc..) que hay que analizar posteriormente.

En este caso, los resultados obtenidos en el ensayo RAST son valores en forma de porcentaje que son necesarios analizar posteriormente con respecto a un valor umbral o punto de corte establecido por nosotros y así discernir si un paciente es alérgico o no.

Para establecer dicho punto de corte se realiza lo que se conoce como Curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC), donde se representa la sensibilidad y la especificidad para diferentes valores de una medida del ensayo RAST, dando como resultado una lista de varios valores y la correspondiente sensibilidad y especificidad de la prueba a ese valor.

Posteriormente, se representa la curva ROC gráfica trazando la sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) en el eje Y, frente a la especificidad en el eje X (tasa de individuos control) para los diversos valores tabulados.

La elección del punto de corte depende del propósito de cada ensayo, en este caso se establece un compromiso entre especificidad y sensibilidad, por lo tanto, el punto de corte elegido se va a basar en esta premisa.¹⁴⁹

En la figura 27 se representa la curva ROC grafica para los valores obtenidos después de realizar el ensayo RAST. Los valores se pueden observar en las tablas 33, 34 y 35 del apéndice.

Figura 27. Curva ROC de $DeAn@SiO_2$. Valores en las tablas 33, 34 y 35 del apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

Capítulo III

Se puede observar que existe un punto donde cortan ambos ejes para el cual se obtiene un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad en todas las partículas, siendo este ≥ 4 para **DeAXO@SiO₂**, ≥ 2 para **DeBPO@SiO₂** y $\geq 1,2$ para **DeAXO-BPO@SiO₂**.

Por lo que, siguiendo el compromiso marcado anteriormente entre especificidad y sensibilidad, los puntos de cortes seleccionados para las partículas serán estos respectivamente.

Una vez establecido el punto de corte, se ha procedido a analizar los datos obtenidos después de realizar el ensayo RAST a los 21 pacientes descritos anteriormente para validar técnicamente el método y comprobar su sensibilidad.

En la figura 28 y tabla 36 del apéndice se representan los valores de RAST obtenidos al realizar los ensayos con las diferentes partículas funcionalizadas con el determinante antigénico.

Figura 28. Resultados de % de RAST en 21 pacientes alérgicos con **DeAn@SiO₂**. Valores en tabla 36 apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

Según los puntos de cortes elegido anteriormente, se observan valores de RAST positivos con **DeAXO@SiO₂** en 21 de 21 (100%) de los pacientes con reacciones inmediatas a AX, con **DeBPO@SiO₂** en 9 de 9 (100%) de los pacientes con reactividad cruzada a BP y, con **DeAXO-BPO@SiO₂** en 21 de 21 (100%) pacientes alérgicos incluidos a AX o a ambos antibióticos.

En los controles (sujetos tolerantes a las BL), el porcentaje de RAST fue negativo en el 100% de los casos para las tres partículas.

Este hecho ha confirmado la validez de reconocimiento de estos materiales para reconocer anticuerpos IgE específicos tanto a amoxicilina, como a amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada y por lo tanto para poder usarse en métodos de detección *in vitro*.

Por otro lado, cabe destacar que la determinación de IgE específica de amoxicilina (AX-IgE) utilizando las diferentes fases sólidas en sujetos individuales del Grupo A han mostrado valores de RAST más altos para DeAXO@SiO₂ que para DeAXO-BPO@SiO₂, ya que esta última fase sólida contiene la mitad de los grupos AXO, lo cual está relacionado con la unión de anticuerpos específicos.

Los resultados obtenidos, proporcionan la detección exitosa de anticuerpos IgE tanto para AX como para BP, por lo que este material con dos determinantes antigénicos puede presentar una gran utilidad para detectar dichos IgE de alérgenos en un primer cribado para el diagnóstico de alergia a BL.

Estos resultados obtenidos se han comparado con el método validado actualmente en la detección de alergias, ImmunoCAP, el cual utiliza como soporte sólido un polímero de celulosa encapsulado y funcionalizado con PLL unida covalentemente al fármaco a estudiar, AX y BP en este caso. Y con ensayos RAST, el cual utiliza como soporte sólido discos de celulosa funcionalizados con PLL y el fármaco a estudiar, en este caso amoxicilina y bencilpenicilina, para poder comparar los resultados (Figura 29).

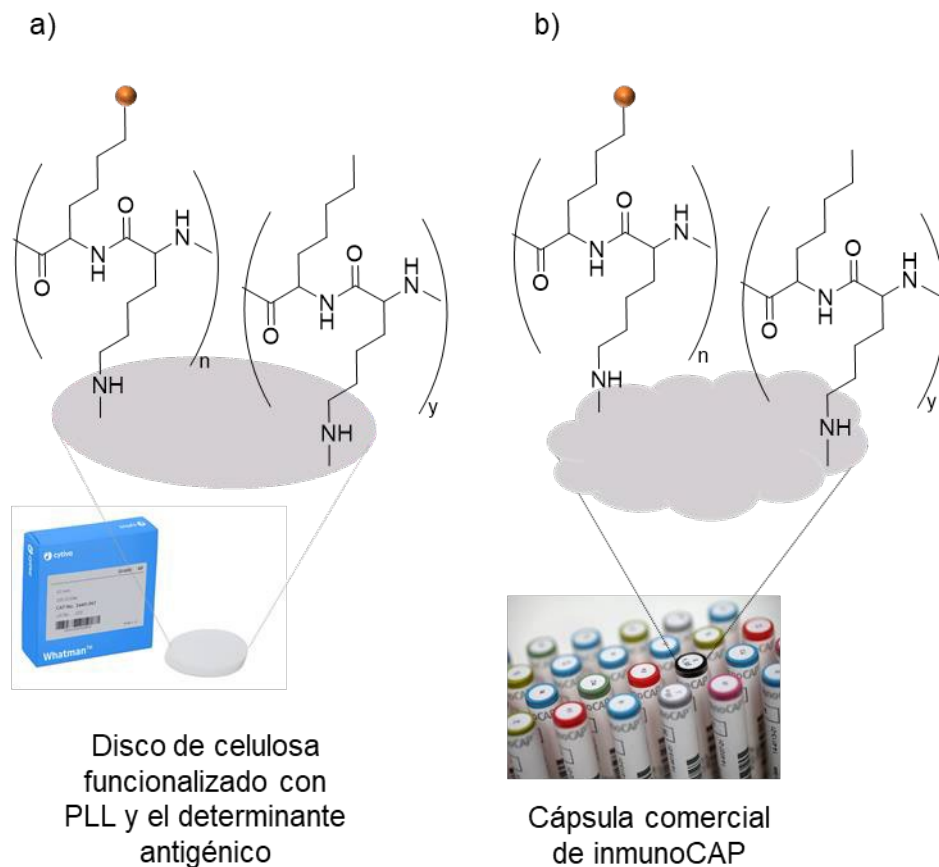


Figura 29. Representación de los soportes sólidos para a) RAST con discos de celulosa y b) ImmunoCAP.

Capítulo III

Los puntos de corte establecidos para los discos BL-PLL han sido $\geq 4\%$ para AX con discos AXO-PLL y $\geq 2,3\%$ para BP con discos BPO-PLL.

En la figura 30 y tabla 36 del apéndice se representan los valores de RAST obtenidos al realizar los ensayos con los discos funcionalizados con el determinante antigénico (AXO-PLL y BPO-PLL)

Según los puntos de corte seleccionados, se pueden observar valores positivos de RAST con discos AXO-PLL en 10 de 12 (83%) de los pacientes del Grupo A y en 7 de 9 (78%) de los pacientes del Grupo B; por lo tanto, en general el porcentaje de positivos fue del 80% de todos los pacientes con reacciones inmediatas a AX (Grupo A más Grupo B).

Se pueden observar también valores positivos de IgE para BP con discos BPO-PLL en 5 de 9 (55%) de los pacientes con reactividad cruzada a BP (Grupo B). En los controles (sujetos tolerantes a las BL), el RAST fue negativo en el 100% de los casos para los dos tipos de discos.

Figura 30. Resultados de % de Rast con discos funcionalizados con AXO-PLL y BPO-PLL en 21 pacientes alérgicos. Valores en tabla 36 del apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

La tabla 36 del apéndice muestra los valores de IgE para cada BL utilizando los diferentes métodos teniendo en cuenta su punto de corte seleccionado (estandarizado para ImmunoCAP y calculado para RAST). El análisis de los resultados de ImmunoCAP a AX y/o BP se ha hecho de acuerdo con el corte recomendado más recientemente ($\geq 0,1$ kUA/L).

La selectividad de los diferentes sistemas se ha podido estudiar en los pacientes sin respuesta inmunológica a BP, ya que la cuantificación de IgE selectiva a BP (BP-IgE) en los pacientes con AX selectivo se traduce en falsos positivos tanto con ImmunoCAP como con el ensayo RAST, ya sea con partículas como con discos de celulosa.

En la figura 31, tabla 36 del apéndice se pueden observar los datos representados para las tres metodologías donde 3 de 12 pacientes selectivos a AX, un 25% para el Grupo A, correspondiente a pacientes selectivos de AX (resultados falsos positivos) utilizando ImmunoCAP, de acuerdo con los casos reportados de resultados falsos positivos.¹⁵⁰ Esto

podría explicarse por la presencia de una IgE clínicamente no relevante a la feniletilamina, una estructura que puede estar presente en el ImmunoCAP® y que comparte epítopos alérgicos al bencilo con BP.¹⁵¹ También se han encontrado resultados falsos positivos en 5 de los 12 pacientes, con los discos BPO-PLL, el 45% de los pacientes del grupo A, lo que demuestra una baja selectividad. Se obtuvieron grandes resultados con el DeBPO@SiO₂ para el que todos los pacientes del Grupo A y del Grupo B fueron clasificados correctamente.

En conclusión, las partículas sintetizadas en este trabajo aumentan la sensibilidad con respecto a los discos de celulosa funcionalizados y con respecto a ImmunoCAP. Por lo que el nuevo material sintetizado con su correcta funcionalización es un método prometedor para la detección de alergias *in vitro*.

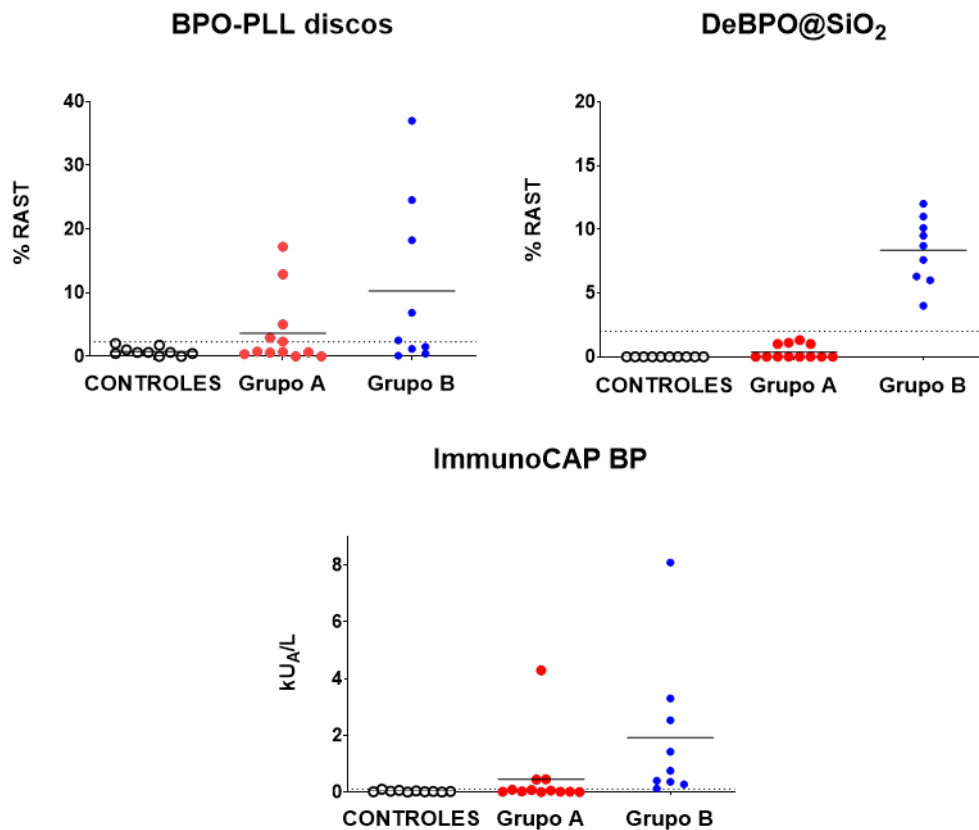


Figura 31. Resultados de % de Rast de BP-sIgE mediante ImmunoCAP, discos BPO-PLL y DeBPO@SiO₂. Los gráficos de puntos muestran los resultados individuales de los 3 grupos de sujetos: tolerantes a las BL (controles), pacientes selectivos a AX (Grupo A) y BP-AX reactividad cruzada (Grupo B). Valores en tabla 36 del apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2

En este capítulo se ha optimizado tanto la síntesis de partículas de SiO₂ de 500 nm como el proceso de funcionalización de las mismas con diferentes fármacos (Amoxicilina y Bencilpenicilina) de forma eficaz y reproducible. El proceso se ha monitorizado empleando diferentes técnicas como son: FTIR, XPS, RMN de sólido, DLS, medidas de potencial Z y test de ninhidrina para estimar la cantidad de fármaco introducido en cada NPs.

Se ha realizado además la evaluación de dichas nanopartículas en radioinmunoensayos RAST, empleando muestras de sueros de pacientes alérgicos a amoxicilina, bencilpenicilina o ambos fármacos. Los resultados obtenidos han resultado muy prometedores, indicando una sensibilidad del 100 % tanto para AX-sIgE como para BP-sIgE, mostrando una mejora notable de la sensibilidad en comparación con la técnica comercial ImmunoCAP (59 % para AX y 30 % para BP). También se observó una mayor especificidad (100%), evitando los falsos positivos a BP obtenidos tanto con técnicas RAST utilizando discos de celulosa como en ImmunoCAP.

Los resultados más relevantes de este capítulo han quedado recogidos en un artículo publicado en la revista *Frontiers in Immunology* con el título de “**Multiepitope Dendrimeric Antigen-Silice particle composites as nano-based platforms for specific recognition of IgEs**”.¹⁵²

III.3. Partículas de núcleo magnético.

III.3.1. Introducción

Dado los resultados tan prometedores obtenidos en el ensayo RAST con partículas de sílice del apartado anterior, seguimos investigando en esta línea de llevar a la práctica clínica los ensayos RAST con partículas. Sin embargo, a la hora de llevarlo a cabo, las partículas de sílice presentan un ligero inconveniente.

Este reside en los dos procesos de lavado del test, ya que para poder separar las partículas sólidas del sobrenadante después de la incubación con el suero y con el anticuerpo marcado hay que realizar tres periodos de centrifugación, lo cual se traduce directamente en largos tiempos de realización del test.

En la práctica clínica el número de sueros utilizados en cada ensayo es muy elevado, lo que se traduce en un número de tubos para realizar el ensayo muy alto y por tanto no es factible tiempos tan largos para realizar el test.

La centrifugación de los tubos de las etapas de lavado se lleva a cabo en tandas de 12 tubos, durante un tiempo de 10 minutos, por lo que para completar el primer periodo de lavado de un total de 31 sueros (248 tubos) como en el apartado anterior, se necesita un tiempo total de 42 horas.

Como hay que realizar tres períodos de lavado, el tiempo total de realización de lavados es de 126h, es decir, más de 5 días para realizar el ensayo con todos los sueros.

Para resolver este inconveniente nos planteamos la inserción en las partículas de un núcleo magnético, que permitiera que los períodos de lavado se realizarían mediante la imantación de las partículas para separarlas del sobrenadante, eliminando las etapas de centrifugación, y como consecuencia disminuyendo el tiempo de realización del RAST.

La introducción del núcleo magnético, además, permitiría la reducción del tamaño de partícula, y por tanto un aumento de área superficial por gramo de partícula. Disminuir el tamaño de SiO_2 conllevaría un aumento de los tiempos de centrifugación y los haría inviables.

En este sentido, las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) son perfectas candidatas para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*, y su aplicación en la práctica clínica de diagnóstico de rutina, ya que sus propiedades magnéticas resultan de gran utilidad para su recuperación tras los procesos de lavados en ensayos RAST. Además, presentan gran estabilidad y biocompatibilidad, y no presentan riesgos para el medio ambiente.¹⁵³⁻¹⁵⁵

En la naturaleza, estos óxidos presentan siete formas polimórficas (Goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$), Hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Akagenita ($\beta\text{-FeOOH}$), Lepidocrocita ($\gamma\text{-FeOOH}$), Ferrihidrita ($\text{Fe}_5\text{O}_7(\text{OH})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y Magnetita (Fe_3O_4). Cada una de estas formas presentan propiedades magnéticas diferentes según su fase cristalina.¹⁵⁶

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de sintetizar este tipo de partículas es el uso para el que están destinadas ya que, dependiendo de este, se requerirá que cumplan una serie de requisitos tales como una forma, un tamaño, una fase de óxido y una respuesta magnética a un campo aplicado determinado.¹⁵⁷

Con el objetivo de destinar estos materiales basados en óxidos de hierro para inmunoensayo RAST, en este trabajo de tesis se propone la síntesis de nanopartículas de núcleo de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas de una capa de sílice (SiO_2).

Se ha elegido esta forma polimórfica para el núcleo de las partículas debido a las propiedades superparamagnéticas presentes en ella. Estas excelentes propiedades magnéticas se originan gracias a la coexistencia de iones de Fe^{+2} y Fe^{+3} en su estructura. Por otro lado, el recubrimiento de sílice de este núcleo magnético garantizaría la funcionalización superficial de las partículas, al igual que las partículas de sílice descritas anteriormente.¹⁵⁸

III.3.2. Síntesis de partículas magnéticas (Fe_3O_4).

En las últimas décadas se ha desarrollado una amplia investigación en la síntesis de partículas magnéticas. Más concretamente, en los últimos años se han descrito rutas sintéticas que permiten controlar la forma, la estabilidad y la monodispersidad de estas.

Algunos de los métodos de síntesis para este tipo de materiales más populares son: coprecipitación, descomposición térmica y/o reducción, síntesis de micelas, síntesis hidrotermal y técnicas de pirolisis laser.¹⁵⁸

En este trabajo hemos elegido el método de la descomposición térmica, concretamente la reducción hidrotermal de precursores orgánicos de hierro a altas temperaturas, en medio orgánico y en presencia de surfactantes. Este método se basa en un mecanismo general de transferencia y separación de fases que se producen en las interfaces de las fases líquida, sólida y en disolución presentes durante la síntesis, dando lugar a la obtención de partículas monodispersas y muy cristalinas (Figura 32).

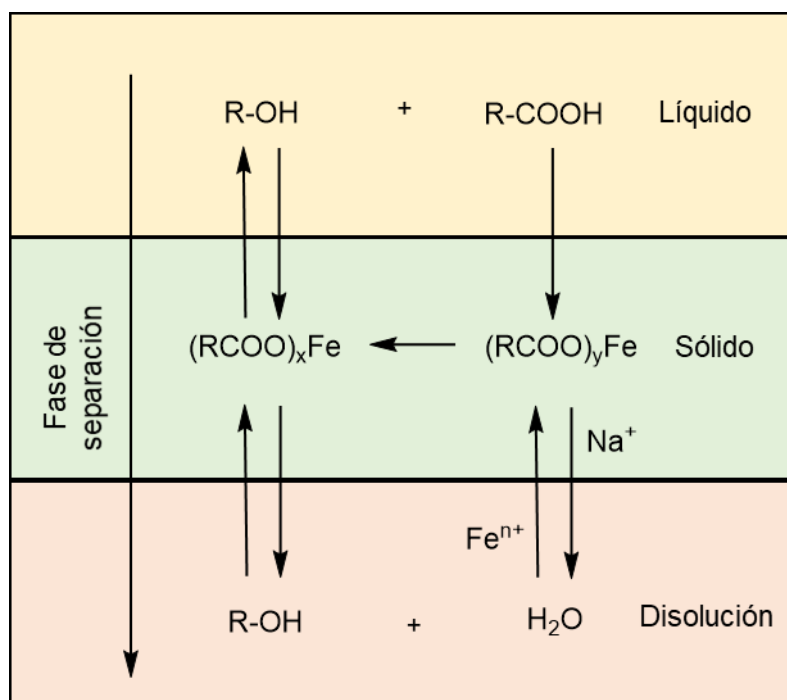


Figura 32. Esquema general de la síntesis hidrotermal de Fe_3O_4 .

La elección del disolvente, el precursor de hierro, la relación de las concentraciones de Fe:surfactante y la temperatura son algunos parámetros críticos a optimizar para controlar el tamaño, la distribución y la forma de las nanopartículas que se desea preparar.^{159,160}

Con el fin de disminuir el tamaño de partícula de hierro se ha propuesto la síntesis de nanopartículas de 15, 30, 50 y 200 nm de diámetro respectivamente.

Para corroborar que el núcleo de hierro no influye a la hora de realizar el ensayo RAST, se han sintetizado partículas con una matriz de sílice de 200 nm y así poder realizar una comparación entre partículas con el mismo tamaño y diferente material.

El protocolo de síntesis de las partículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) es diferente dependiendo el tamaño de partícula sintetizado.

En el caso de las partículas de 200 nm, la reducción hidrotermal tiene lugar cuando se mezclan $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, etilenglicol, acetato sódico y polietilenglicol calentando a una temperatura de 200°C durante 24 h.

El etilenglicol actúa como agente reductor de alto punto de ebullición, el acetato sódico como estabilizador electrostático y el polietilenglicol como tensoactivo contra la aglomeración de las partículas.¹⁶⁰

En el caso de las partículas más pequeñas la reducción hidrotermal tiene lugar cuando se mezclan $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, etilenglicol, acetato sódico y agua desionizada calentando a 200°C durante 24 h.

El tamaño de partícula es dependiente de la cantidad de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, siendo mayor el tamaño cuanto mayor sea cantidad de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ añadida, mientras que la concentración de los demás componentes de esta reacción se mantiene constante.¹⁵⁹

Finalmente, tras optimizar todos los parámetros se obtuvieron partículas de 15, 30, 50 y 200 nm de hierro empleando las siguientes cantidades de reactivo (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad (mmol) de reactivos utilizado en la síntesis de las nanopartículas de Fe_3O_4 .

| Reactivos \ Diámetro | 200nm Fe_3O_4 | 50nm Fe_3O_4 | 30nm Fe_3O_4 | 15nm Fe_3O_4 |
|--|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Etilenglicol (mL) | 80 | 80 | 80 | 80 |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mmol) | 10 | 3.9 | 2.9 | 1.9 |
| NaOAc (mmol) | 87,7 | 64 | 64 | 64 |
| Surfactante (mmol) | 0.5 | 300 | 300 | 300 |

Las partículas obtenidas tienen el aspecto de un sólido de color marrón en todos los casos.

En el caso de las partículas de sílice de 200 nm de diámetro la síntesis se lleva a cabo siguiendo el método de stöber. En primer lugar, se prepara una mezcla de amoníaco (NH_3) y etanol absoluto que se agita durante 15 minutos. Tras este tiempo se añade tetraetilortosilicato (TEOS) y se mantiene en deja agitando en el ultrasonido durante 2h a temperatura ambiente. Tras este tiempo se puede observar la aparición de un sólido blanco correspondiente a la matriz del material (**200nmSiO₂**).

Las partículas obtenidas se han evaluado mediante diferentes técnicas de caracterización.

♦ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de las partículas de Fe_3O_4 obtenidas presenta las bandas vibracionales características de los enlaces Fe-O ($570 \nu_{\text{Fe-O}} \text{ cm}^{-1}$) correspondientes al núcleo de hierro (Figura 33 a)).^{157,161} Por lo tanto se ha podido observar la formación de la matriz de hierro de las partículas.

En el caso de las partículas de 200 nm SiO_2 el espectro presenta bandas vibracionales características de los enlaces Si-O-Si y Si-OH ($1100 \nu_{\text{asimétricaSi-O-Si}}$, $950 \nu_{\text{simétricaSi-OH}}$ 795

$\nu_{\text{asimétrica Si-O-Si}} \text{ cm}^{-1}$) (Figura 33 b)).¹³²⁻¹³⁴ Por lo que también se ha podido observar la formación de la matriz de sílice de las partículas.

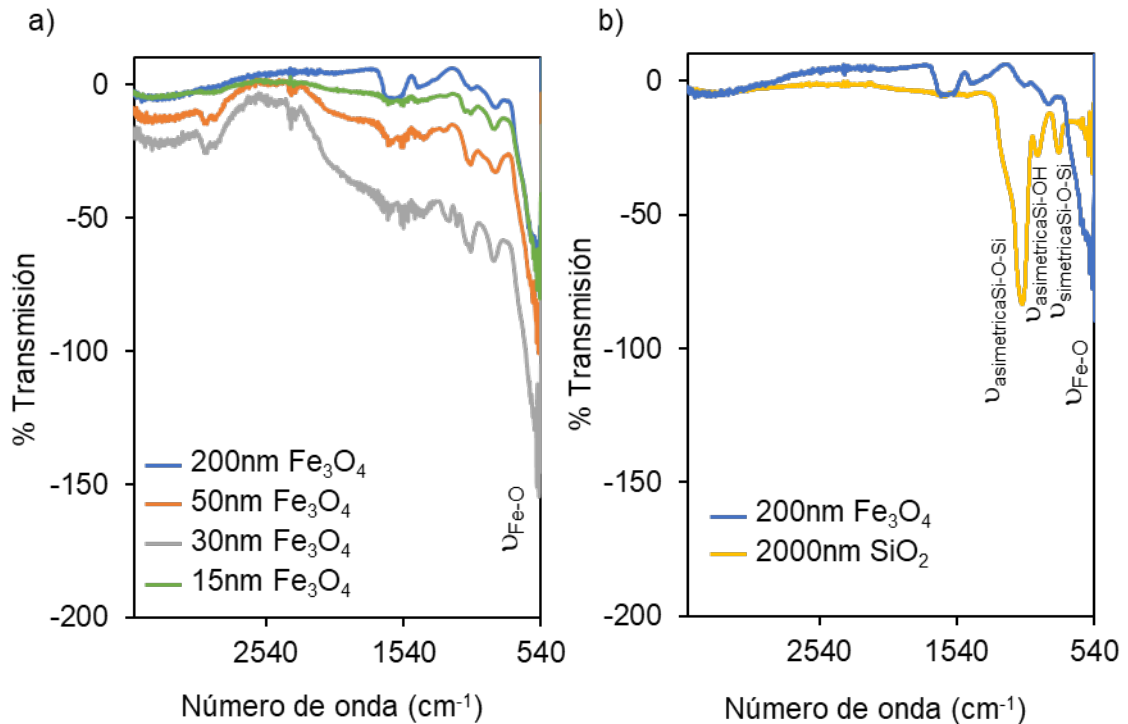


Figura 33. FTIR de las partículas de Fe_3O_4 de 200 nm, 50 nm, 30 nm y 15 nm de diámetro y de las partículas de sílice de 200 nm de diámetro.

◆ Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las micrografías obtenidas mediante TEM muestran un diámetro del tamaño deseado en todos los casos. Así como una distribución homogénea de las nanopartículas (Figura 34 y 35 b)).

◆ Dispersión de luz dinámica (DLS).

Esta técnica permite medir el diámetro hidrodinámico que presentan las partículas en dispersión. En este caso, las partículas de Fe_3O_4 no han podido evaluarse por DLS debido a la fuerte capacidad magnética presente en estas partículas cuando se encuentran en dispersión, dando así lugar a efectos de aglomeración y medidas inexactas.

Sin embargo, en el caso de las partículas 200 nm SiO_2 el espectro de DLS presenta una única banda a tamaño 275 nm, por lo que se ha observado el tamaño y la polidispersidad de las partículas SiO_2 obtenidas (Figura 35 a)).

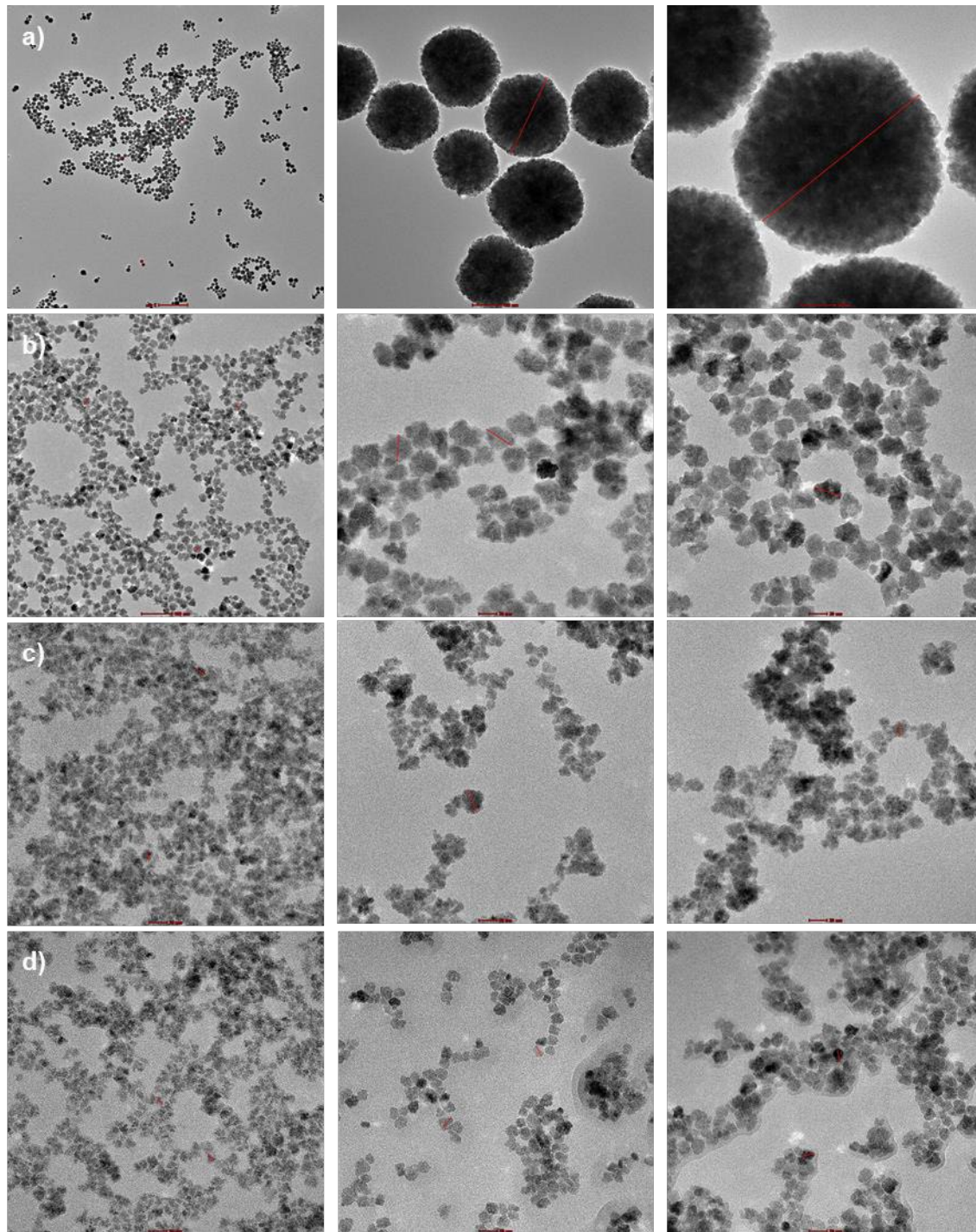


Figura 34. Imágenes de TEM de las partículas de Fe_3O_4 de 200 nm (a), 50 nm (b), 30 nm (c) y 15 nm (d), tratadas con el equipo Thermo Fisher Scientific-TEM Imaging and Analysis program, version 4.71 SP1.

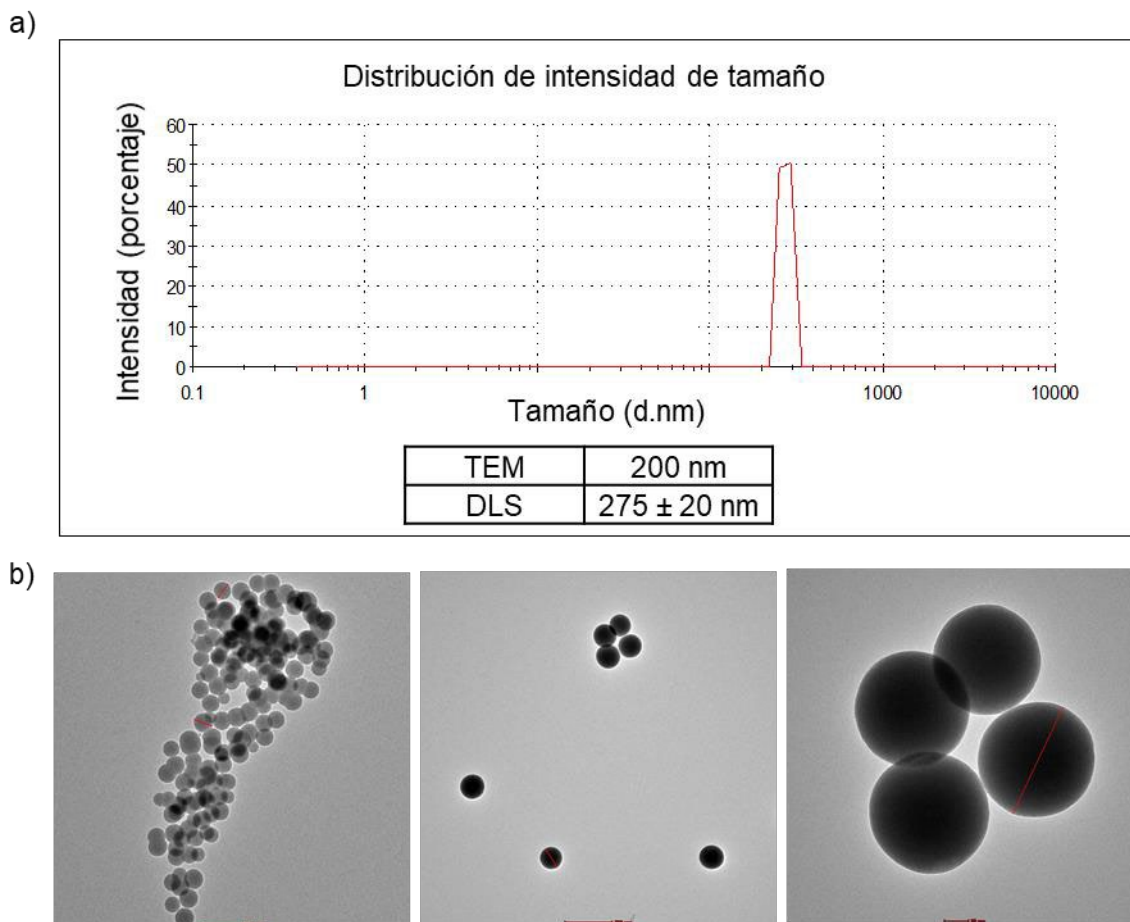


Figura 35. a) Medidas de DLS de las partículas de sílice de 200 nm de diámetro y b) Imágenes de TEM de las partículas de sílice de 200 nm de diámetro tratadas con el equipo Thermo Fisher Scientific-TEM Imaging and Analysis program, version 4.71 SP1.

III.3.3. Recubrimiento de sílice.

Para poder llevar a cabo la modificación superficial en las partículas, para anclar covalentemente el conjugado hapteno-portador, tal y como se ha realizado en el apartado anterior, es necesario el recubrimiento de la partícula de hierro de una capa de sílice.

La metodología que se ha utilizado para llevar a cabo este recubrimiento en todas las nanopartículas ha sido el método de Stöber citado anteriormente.

A una dispersión de nanopartículas Fe_3O_4 en etanol absoluto se le añade amoníaco (NH_3) y se agita durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añade tetraetilortosiliceto (TEOS) gota a gota y se mantiene en agitación durante 16h a temperatura ambiente. Tras este tiempo se obtiene la matriz del material ($\text{Fe}_3\text{O}_4 \subset \text{SiO}_2$). Al igual que las partículas precursoras (Fe_3O_4) en este paso de reacción se obtienen unas partículas con aspecto de sólido de color marrón (Figura 36).^{157,161}

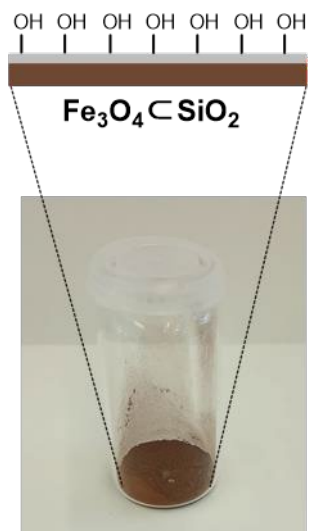


Figura 36. Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

La caracterización de las partículas obtenidas se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas.

◆ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, presenta las bandas vibracionales características de los enlaces Fe-O ($570 \nu_{\text{Fe-O}} \text{ cm}^{-1}$)^{157,161} correspondientes al núcleo de hierro.

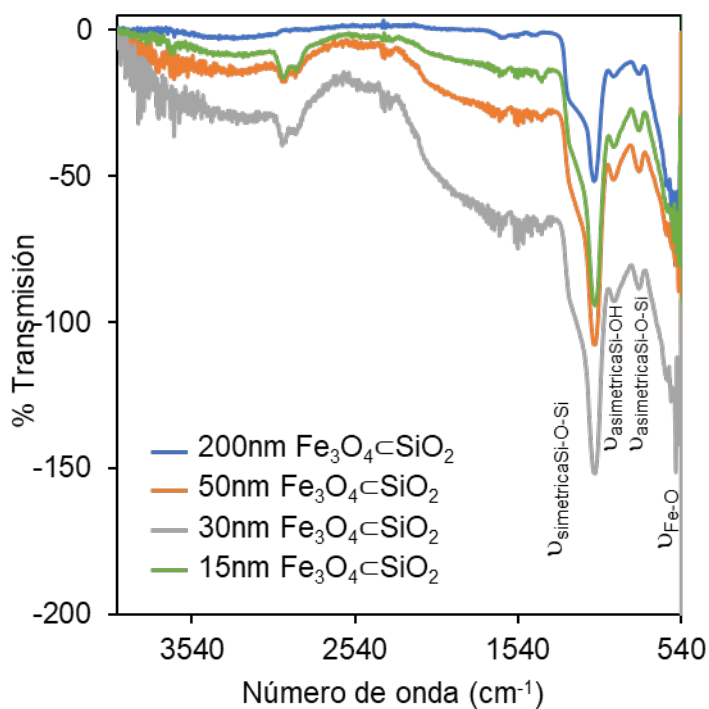


Figura 37. FTIR de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ de 200 nm, 50 nm, 30 nm y 15 nm.

Además se puede observar que el espectro presenta nuevas bandas vibracionales entre 1100 y 790 características de los enlaces Si-O-Si y Si-OH ($1100 \nu_{\text{asimétrica Si-O-Si}}$, $950 \nu_{\text{simétrica Si-OH}}$, $795 \nu_{\text{asimétrica Si-O-Si}} \text{ cm}^{-1}$) ¹³²⁻¹³⁴ correspondientes a la capa de sílice formada (Figura 37).

♦ **Microscopía electrónica de transmisión con dispersión de Rayos X (TEM-EDX).**

El uso de TEM-EDX en lugar de TEM como en caso anteriores, es muy frecuente para la caracterización de este tipo de materiales con recubrimiento, pudiendo distinguir la composición de cada material.

Las micrografías obtenidas mediante TEM-EDX muestran la formación de una capa de sílice que mide 5 nm de diámetro alrededor de cada núcleo de hierro por separado y de manera homogénea. Por lo que se ha podido corroborar la formación de la capa de sílice alrededor del núcleo de hierro de las partículas. (Figura 38 y 39).

Después de la reacción de formación de la capa de sílice de 5 nm de grosor el diámetro de las partículas aumenta, por lo que el tamaño de las partículas después del recubrimiento es de 25,40, 60 y 210 nm respectivamente.

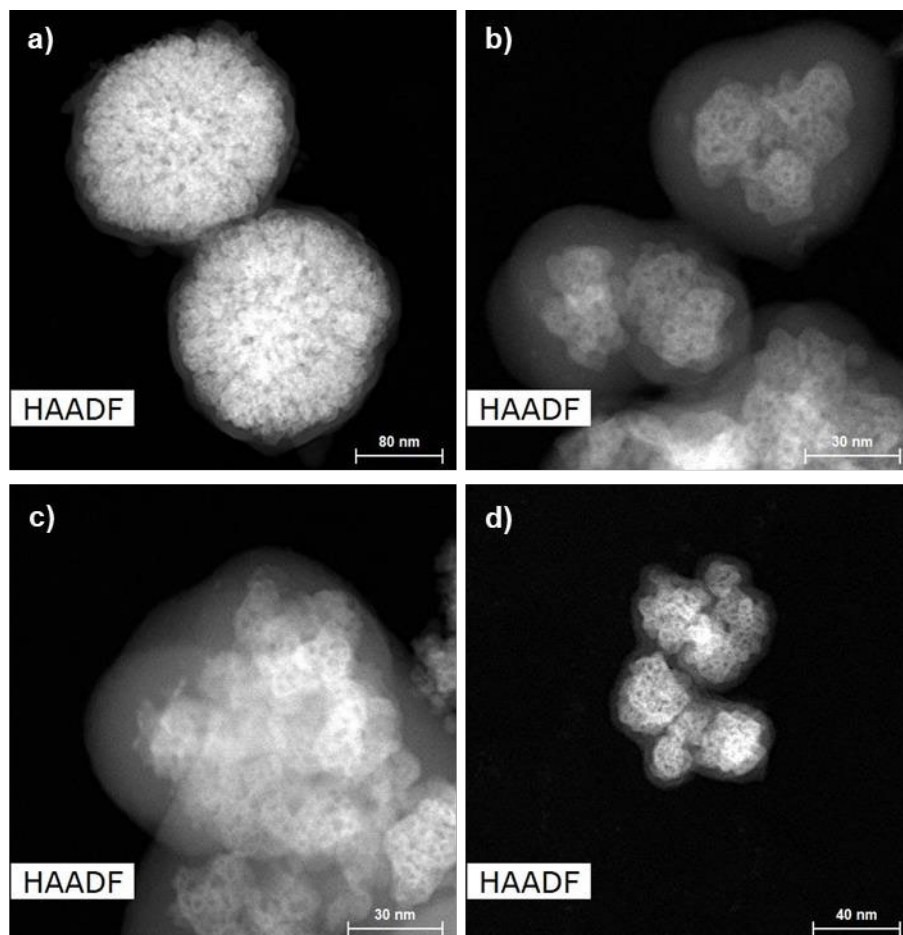


Figura 38. Imágenes de TEM de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 200 nm (a), 50 nm (b), 30 nm (c) y 15 nm (d).

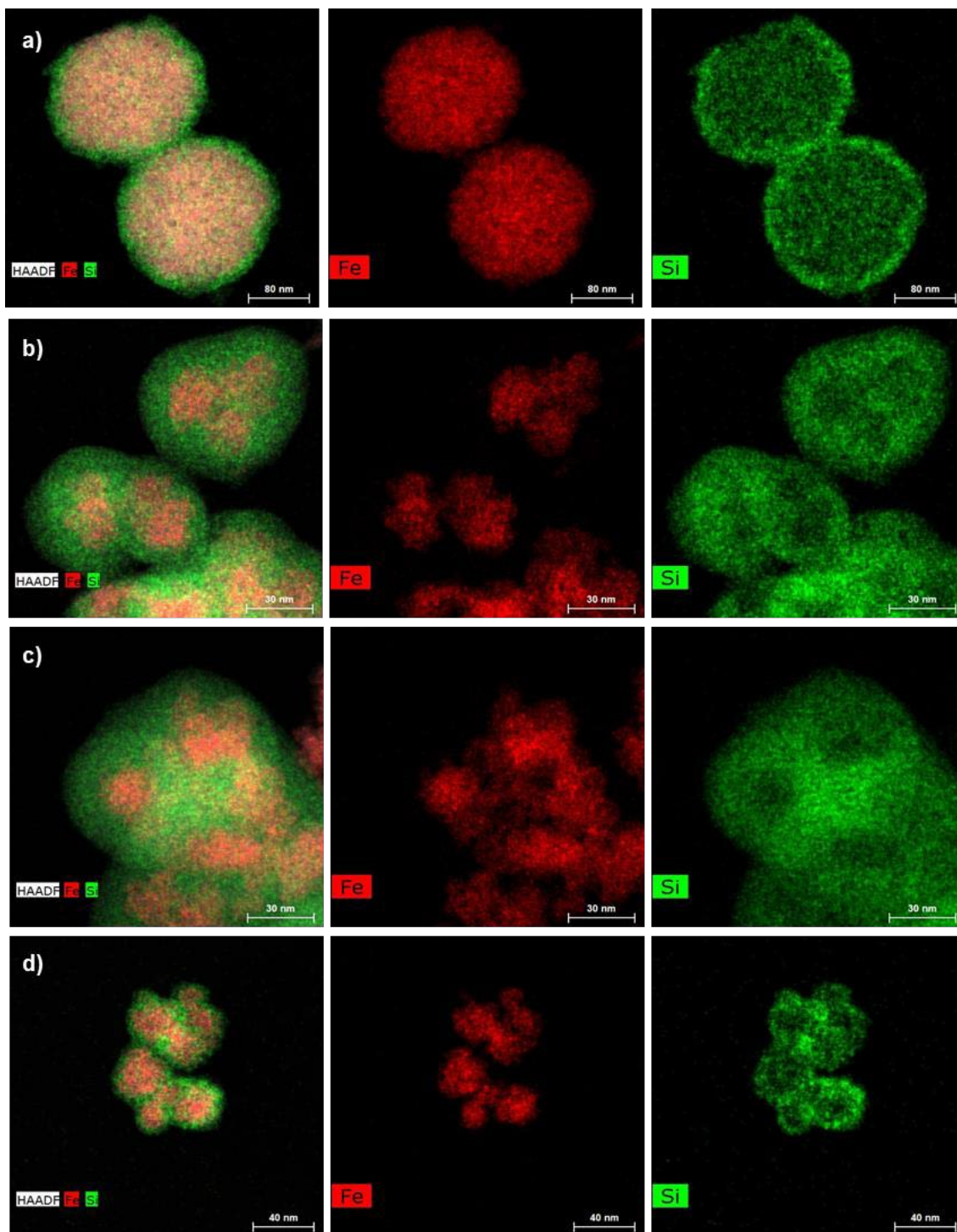


Figura 39. Imágenes de TEM-EDX de las partículas de $Fe_3O_4@SiO_2$ 200 nm (a), 50 nm (b), 30 nm (c) y 15 nm (d).

Debido al protocolo de preparación de las muestras para evaluar en TEM, pueden ocurrir procesos de aglomeración en las partículas, como se observa en algunas de las imágenes de la figura 39.

◆ **Dispersión de luz dinámica (DLS).**

Las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ al igual que Fe_3O_4 no se han podido evaluar por DLS debido a la fuerte capacidad magnética presente, dando así lugar a efectos de aglomeración y medidas inexactas.

III.3.4. Modificación química de la superficie de las nanopartículas.

La modificación superficial las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ y de las partículas de 200 nm SiO_2 se ha llevado a cabo utilizando el mismo protocolo descrito en el apartado anterior para la funcionalización de las partículas SiO_2 .

En primer lugar, se usa como agente de acoplamiento el APTES en gran exceso, dando lugar a una superficie funcionalizada con grupos amino ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-NH}_2$). Posteriormente se añade un gran exceso de anhídrido succínico, para introducir la mayor cantidad de grupos ácidos carboxílicos en la superficie ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$). Finalmente, se ancla covalentemente dendrímeros PAMAM-G2 ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-De}$) (Figura 40).

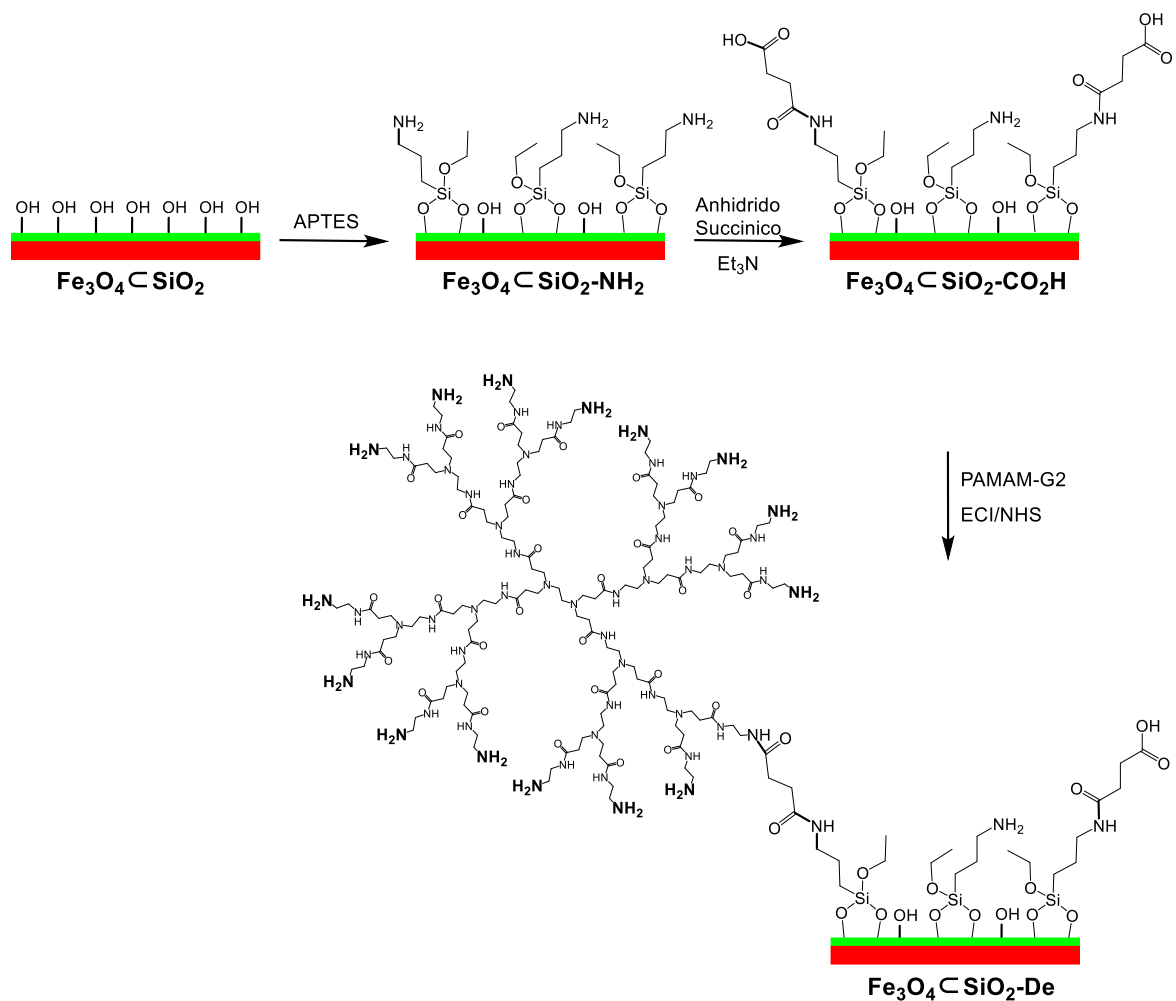


Figura 40. Funcionalización de la superficie de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$.

III.3.5. Funcionalización de las partículas con el determinante antigénico.

Para modificar los dendrímeros anclados a la superficie con el determinante antigénico a estudiar, se ha seguido el mismo protocolo descrito anteriormente

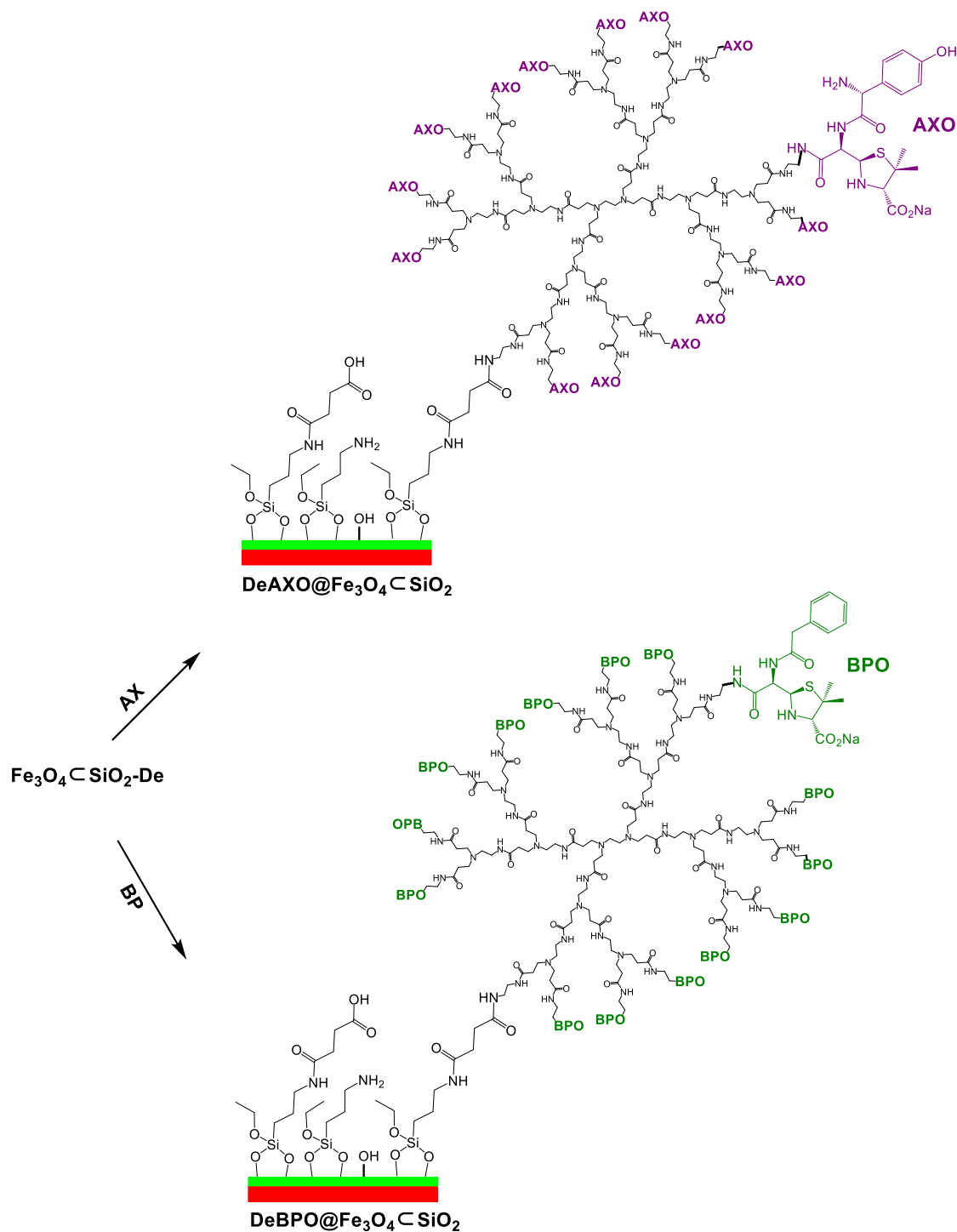


Figura 41. Síntesis de las partículas de $\text{DeAn}@Fe_3O_4@SiO_2$.

En este caso, se han preparado dos tipos de partículas diferentes (**DeAn@Fe₃O₄@SiO₂** y **200nmDeAn@SiO₂**) utilizando amoxicilina y bencilpenicilina como antibióticos β -lactámicos. Exceptuando las partículas de 200 nm de diámetro para las cuales únicamente se ha sintetizado un único material con el determinante antigénico amoxicilina, ya que este tamaño de partícula se ha utilizado únicamente como prueba de concepto a la hora de diseñar un protocolo de ensayo RAST para este nuevo tipo de partículas.

Primero se han hecho reaccionar las partículas modificadas con el dendrímero con un gran exceso de amoxicilina en una disolución tampón Na₂CO₃/NaHCO₃ durante 7 días a 4°C. Durante estos siete días la reacción se ha refrescado diariamente con un exceso de amoxicilina para asegurarnos que todos los grupos amino libres del dendrímero reaccionan con la β -lactama. Tras este tiempo las partículas obtenidas (**DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂** y **200nmDeAXO@SiO₂**) se han lavado con PBS y agua.

Para obtener las partículas donde se ha anclado covalentemente bencilpenicilina (**DeBPO@Fe₃O₄@SiO₂**) se ha llevado a cabo el mismo procedimiento, pero empleando BP en lugar de AX (Figura 41).

III.3.6. Caracterización.

Para llevar a cabo la caracterización de estas partículas se han empleado diferentes técnicas que se detallan a continuación:

◆ **Potencial-Z.**

Las medidas de Potencial-Z se han utilizado para hacer un seguimiento de cada etapa de funcionalización, mediante el cambio de la carga superficial de la superficie de la partícula ya que se espera que esta cambie en cada etapa, corroborando la modificación química al igual que en el apartado anterior.

Las medidas de Potencial-Z se han realizado por triplicado y en PBS para emular el pH fisiológico.

Se ha podido observar como la tendencia de los valores de potencial-Z de los diferentes pasos de reacción ha sido la esperada para todas las partículas, siendo estos valores negativos cuando la superficie presenta grupos hidroxilos o carboxilos y positivos cuando la superficie presenta grupos aminos. Además, se observan valores similares en todos los tamaños de partículas (Figura 42 y Tabla 6). Por lo que se observa la correcta funcionalización de todas las partículas sintetizadas.

Tabla 6. Valores de Potencial Z de las partículas sintetizadas. Concentración de partículas de 1mg de partículas en 1 ml de PBS.

| ξ (mV) | 200 nm SiO ₂ | 200 nm Fe ₃ O ₄ | 50 nm Fe ₃ O ₄ | 30 nm Fe ₃ O ₄ | 15 nm Fe ₃ O ₄ |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fe ₃ O ₄ | - | 30 ± 2 | 20 ± 4 | 33 ± 9 | 33 ± 6 |
| SiO ₂ | -51 ± 5 | -56 ± 5 | -48 ± 5 | -36 ± 4 | -48 ± 5 |
| APTES | 32 ± 7 | 26 ± 6 | 20 ± 4 | 32 ± 3 | 20 ± 4 |
| ANH. SUCCINICO | -38 ± 8 | -32 ± 3 | -37 ± 4 | -32 ± 4 | -37 ± 4 |
| PAMAM-G2 | 30 ± 4 | 32 ± 4 | 34 ± 3 | 38 ± 4 | 34 ± 3 |
| AXO | -8 ± 3 | -8 ± 6 | -14 ± 1 | -12 ± 1 | -11 ± 1 |
| BPO | - | - | -21 ± 4 | -23 ± 5 | -28 ± 5 |

Figura 42. Representación gráfica de los valores de Potencial Z de las partículas sintetizadas.

◆ Test de Ninhidrina.

Para llevar a cabo una estimación del grado de funcionalización de las partículas se ha realizado el test de Ninhidrina, y así cuantificar el número de grupos amino primarios libres presentes en la superficie de la misma.¹⁴²

Al igual que el apartado anterior, previamente a las medidas de la muestra se ha realizado una recta de calibrado con butilamina en medio acuoso en un rango de concentraciones conocidas entre 300 y 900 μ M, siguiendo el mismo protocolo descrito.^{144,145}

Se observa cómo los valores del test de Ninhidrina de las partículas funcionalizadas con APTES, Anhídrido succínico y PAMAM-G2 son coherentes con los valores obtenidos para el caso de las partículas SiO₂ del apartado anterior (Figura 43 y Tabla 7).

Además, en el caso de las partículas de 200 nm de sílice se ha observado que estos valores coinciden con los valores de las partículas del mismo tamaño, pero con núcleo magnético, por lo que el grado de funcionalización en partículas de igual tamaño pero diferente material en este caso es el mismo.

Tabla 7. Valores de Test de Ninhidrina expresados en $\mu\text{mol-NH}_2/\text{g}$ de las partículas funcionalizadas.

| Partículas | 200 nm SiO ₂ | 200 nm Fe ₃ O ₄ | 50 nm Fe ₃ O ₄ | 30 nm Fe ₃ O ₄ | 15 nm Fe ₃ O ₄ |
|-----------------------|----------------------------|--|---|---|---|
| APTES | 117 | 117 | 184 | 187 | 196 |
| ANH. SUCCINICO | 59 | 57 | 62 | 62 | 62 |
| PAMAM-G2 | 189 | 194 | 262 | 270 | 277 |

Figura 43. Representación gráfica de los valores de Test de Ninhidrina las partículas funcionalizadas

También, se ha observado que la cantidad de grupos amino aumenta cuanto menor es el tamaño de partícula tanto con APTES y como con PAMAM-G2

Este hecho se puede explicar ya que cuanto menor es el tamaño de partícula, mayor es el área superficial por gramo de partícula, lo que se traduce directamente en una mayor cantidad de grupos amino por gramo de partícula en ambos casos.

Asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres al igual que en el apartado anterior, se ha estimado para todos los tamaños de partículas los μmoles de PAMAM-G2 por gramo de partícula de Fe₃O₄/SiO₂-De.

◆ **200 nm Fe₃O₄@SiO₂-De y SiO₂**

En el caso de las partículas de 200 nm **Fe₃O₄@SiO₂** el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina expresado en μmol de grupo amino por gramo de partícula, indica la introducción de **117 μmol de grupos amino por gramo** de partículas en ambos casos cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES.

Cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos se detecta una disminución del valor obtenido siendo este **57 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, lo que indica que aproximadamente el 50% de los grupos aminos de la superficie de la partícula reaccionaron con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 56 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas.

Después del acoplamiento covalente del dendrímero PAMAM-G2 sobre la superficie de las partículas, se ha obtenido un valor de **194 μmol de grupos amino por gramo** de partículas funcionalizadas con el dendrímero.

Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 60 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 137 $\mu\text{molNH}_2/\text{g}$ de partículas.

***Figura 44.** Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 200 nm Fe₃O₄@SiO₂ en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula*

Esto implica la introducción de 9 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas funcionalizada con dendrímero, asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 16% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 44).

Para estimar la cantidad de fármaco anclado covalentemente a la superficie se asume que los 15 grupos amino libre del dendrímero PAMAM-G2 anclado a la superficie de la partícula reaccionan con unidades de fármaco.^{107,125}

Sabiendo que la contribución de grupos amino según los cálculos realizados después de obtener el valor del test de ninhidrina en la superficie de la partícula correspondiente al dendrímero (Fe₃O₄@SiO₂-De y SiO₂-De) es de 137 μmol de -NH₂/g, la cantidad de fármaco (AX) anclado covalentemente a **Fe₃O₄@SiO₂-De** será de 137 μmol de fármaco/g de partícula **DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂** y **DeAXO@SiO₂**.

De igual forma, en el caso de las partículas de 200 nm SiO_2 los valores obtenidos del test de Ninhidrina se representan en la Figura 45.

Figura 45. Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 200 nm SiO_2 en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula

◆ **50 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$.**

En el caso de las partículas de 50 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina expresado en μmol de grupo amino por gramo de partícula, indica la introducción de **184 μmol de grupos amino por gramo** de partículas cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES.

Cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos se detecta una disminución del valor obtenido siendo este **62 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, por lo que han reaccionado el 66% de los grupos aminos de la superficie con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 122 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas **$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$** .

Después del acoplamiento covalente del dendrímero PAMAM-G2 sobre la superficie de las partículas, se ha obtenido un valor de **262 μmol de grupos amino por gramo** de partículas **$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$** . Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 62 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 200 $\mu\text{molNH}_2/\text{g}$ de partículas.

Esto implica la introducción de 13 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas **$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$** , asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 11% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 46).

La cantidad de fármaco anclado covalentemente al dendrímero se calcula de manera análoga a los casos anteriores. Por lo que si la contribución de grupos amino según los cálculos realizados después de obtener los valores del test de ninhidrina en la superficie de la partícula correspondiente al dendrímero ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$) es de 200 μmol de $-\text{NH}_2/\text{g}$, la cantidad de fármaco (AX y BP) anclado covalentemente a $\text{SiO}_2\text{-De}$ será de 200 μmol de fármaco/g de partículas **$\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$** y **$\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$** respectivamente.

Figura 46. Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 50 nm en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula.

◆ **30 nm Fe₃O₄◊SiO₂-De**

En el caso de las partículas de 30 nm **Fe₃O₄◊SiO₂** el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES es de **187 μmol de grupos amino por gramo** de partículas.

Sin embargo, cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos el valor obtenido disminuye hasta **62 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, por lo que han reaccionado el 67% de los grupos aminos de la superficie con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 125 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas **Fe₃O₄◊SiO₂-CO₂H**.

Después de la inserción de PAMAM-G2 sobre la superficie de las partículas, se ha obtenido un valor de **270 μmol de grupos amino por gramo** de partículas **Fe₃O₄◊SiO₂-De**. Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 62 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 208 μmolNH₂/g de partículas.

Figura 47. Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 30 nm en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula.

Esto implica la introducción de 14 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$, asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 11% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 47).

De igual forma que los cálculos realizados anteriormente, la cantidad de fármaco anclado covalentemente al dendrímero ha sido de 208 μmol de fármaco/g de partículas $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ y $\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ respectivamente.

◆ **15 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$.**

En el caso de las partículas de 15 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES es de **196 μmol de grupos amino por gramo** de partículas.

Sin embargo, cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos el valor obtenido es de **62 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, por lo que han reaccionado el 68% de los grupos aminos de la superficie con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 134 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$.

Después de la funcionalización con PAMAM-G2, se ha obtenido un valor de **277 μmol de grupos amino por gramo** de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$.

Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 62 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 215 $\mu\text{molNH}_2/\text{g}$ de partículas.

Esto implica la introducción de 14 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$, asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 11% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 48).

Figura 48. Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 15 nm en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula

Al igual que en los casos anteriores, la cantidad de fármaco anclado covalentemente al dendrímero ha sido de 215 μmol de fármaco/g de partículas **DeAXO@Fe₃O₄◊SiO₂** y **DeBPO@Fe₃O₄◊SiO₂** respectivamente.

En la tabla 8 se exponen los resultados a modo de resumen de los valores de la cantidad (μmol) de PAMAM-G2 por grado de partícula **Fe₃O₄◊SiO₂-De**.

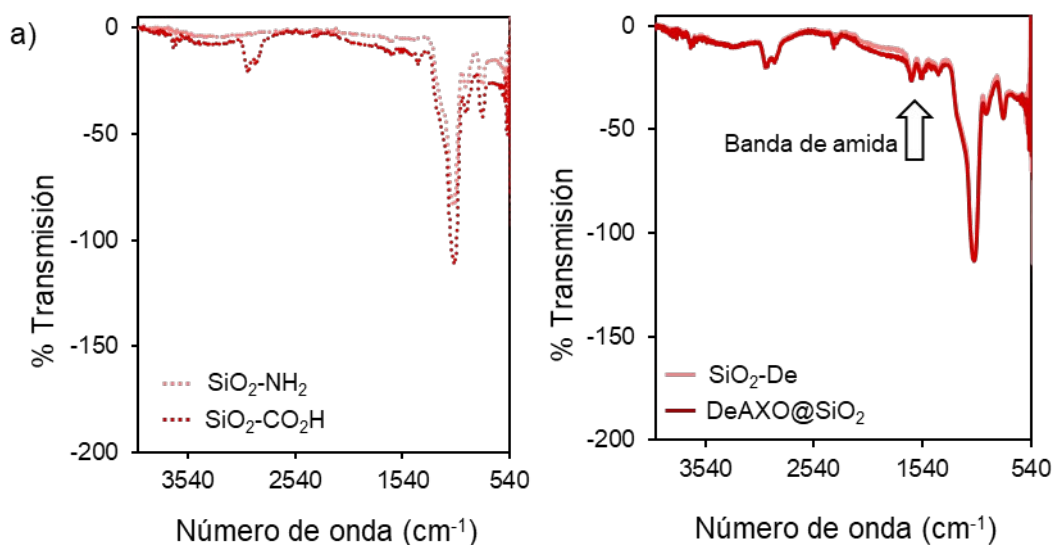
Tabla 8. Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula.

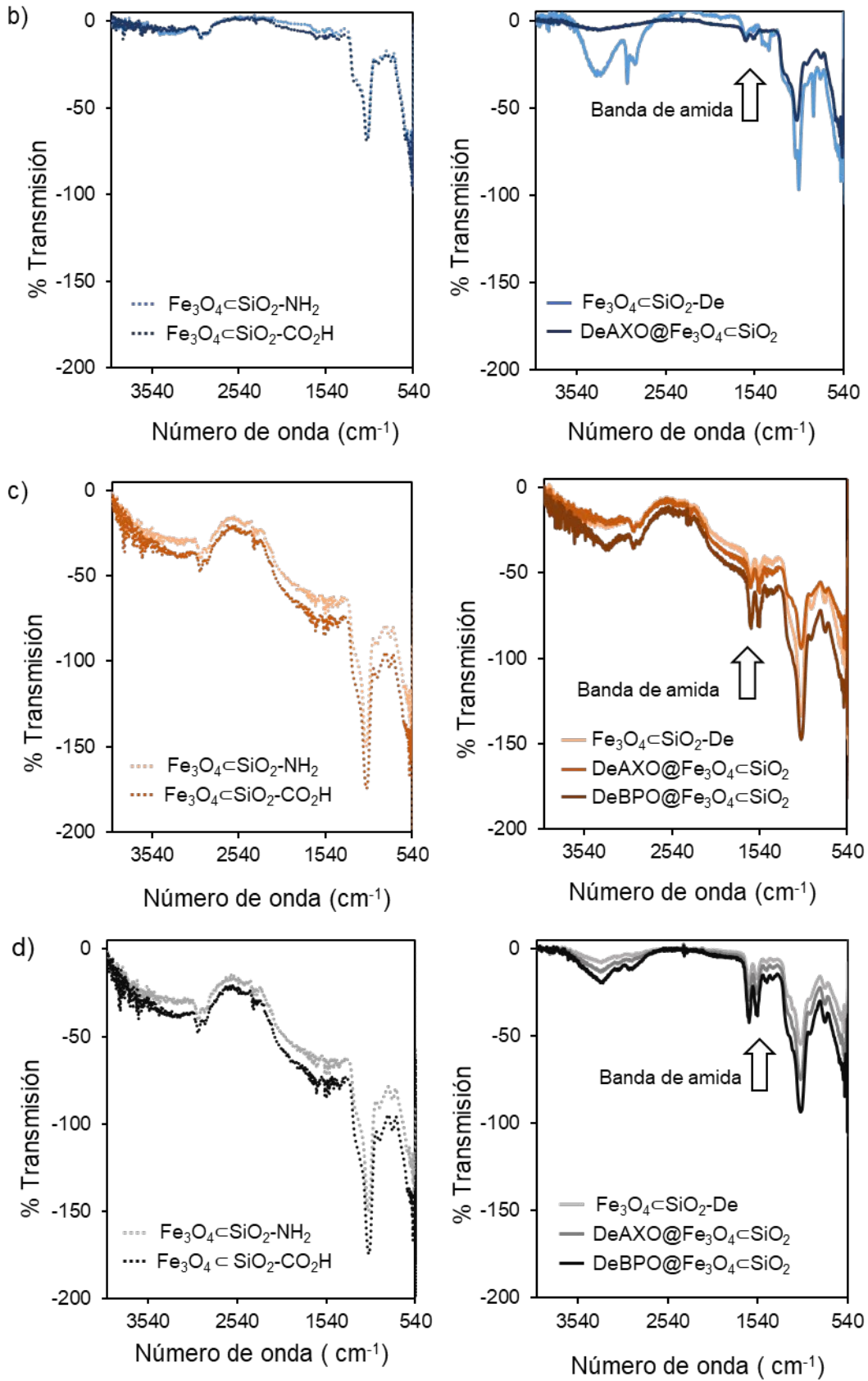
| Partículas | 200 nm SiO ₂ | 200 nm Fe ₃ O ₄ | 50 nm Fe ₃ O ₄ | 30 nm Fe ₃ O ₄ | 15 nm Fe ₃ O ₄ |
|---|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| $\mu\text{mol-NH}_2$ de fármaco/ g de partícula de Fe ₃ O ₄ ◊SiO ₂ -De | 132 | 137 | 200 | 208 | 215 |
| $\mu\text{mol PAMAM-G2}$ / g de partícula de Fe ₃ O ₄ ◊SiO ₂ -De | 9 | 9 | 13 | 14 | 14 |

◆ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de las partículas de **Fe₃O₄◊SiO₂**, presenta bandas vibracionales características de los enlaces Fe-O ($570 \nu_{\text{Fe-O}} \text{ cm}^{-1}$)^{157,161} correspondientes al núcleo de hierro y bandas vibracionales entre 1100 y 790 características de los enlaces Si-O-Si y Si-OH ($1100 \nu_{\text{asimétricaSi-O-Si}}$, $950 \nu_{\text{simétricaSi-OH}}$, $795 \nu_{\text{asimétricaSi-O-Si}} \text{ cm}^{-1}$).¹³²⁻¹³⁴ correspondientes al recubrimiento de sílice.

Además, aparecen dos nuevos picos en el espectro de las partículas que contienen en su superficie el dendrímero y el fármaco. Estas nuevas bandas, a 1635 y 1540 cm^{-1} , son típicas de los grupos amida ($\nu_{\text{C=O}}$ y $\nu_{\text{N-H}}$ respectivamente) y se observan en todas las partículas donde el dendrímero está unido covalentemente (Figura 49).





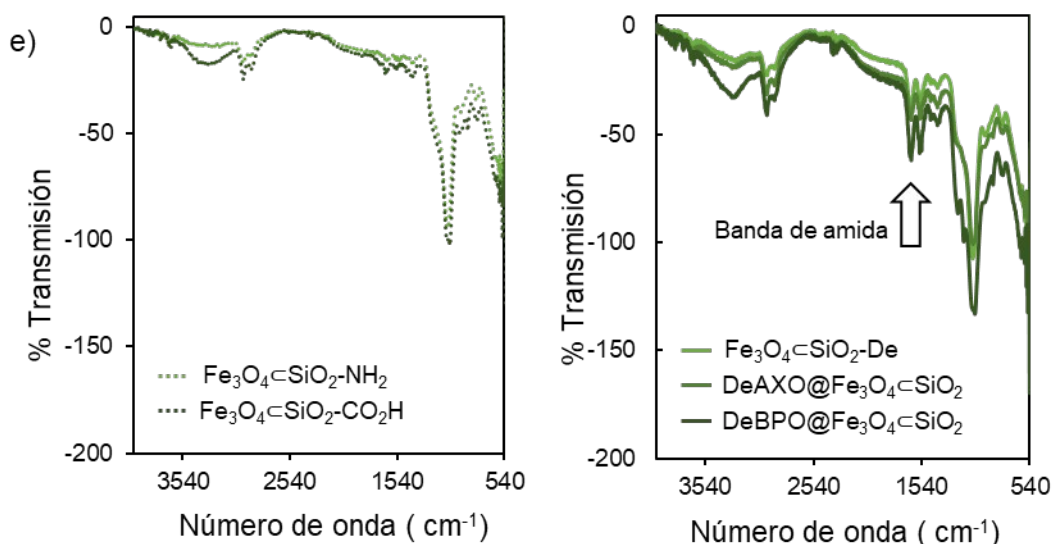


Figura 49. FTIR de las partículas funcionalizadas a) 200nmSiO₂, b) 200 nm Fe₃O₄@SiO₂, c) 50 nm Fe₃O₄@SiO₂, d) 30 nm Fe₃O₄@SiO₂ y e) 15 nm Fe₃O₄@SiO₂

◆ Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS).

En este caso la confirmación de que el fármaco ha reaccionado correctamente con el dendrímero pegado a la superficie de la partícula en los materiales **DeAn@Fe₃O₄@SiO₂** se ha hecho mediante estudios de espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS).

Esta técnica ha permitido realizar un análisis de la composición de la superficie de todas las partículas funcionalizadas tanto con el dendrímero (**Fe₃O₄@SiO₂-De**) como con los fármacos (**DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂** y **DeBPO@Fe₃O₄@SiO₂**).

Se ha observado la presencia de carbono (C1s), nitrógeno (N1s), oxígeno (O1s), silicio (Si2p) y hierro (Fe2p), como cabía esperar debido a la composición de la muestra.

Después de la funcionalización de estas partículas con los fármacos, amoxicilina y bencilpenicilina, la composición que se ha determinado por XPS ha mostrado la presencia de azufre (S2s), además de todos los componentes anteriores.

La presencia de este nuevo elemento en la superficie de **DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂** y **DeBPO@Fe₃O₄@SiO₂** y no en **Fe₃O₄@SiO₂-De** ha verificado el correcto anclaje de los fármacos en la superficie de todos los tamaños de estas partículas ya que, tanto la amoxicilina como la bencilpenicilina, presentan en su estructura un átomo de azufre (Tabla 9).

Tabla 9. XPS de las partículas $Fe_3O_4 \subset SiO_2$ -De y $DeAn@Fe_3O_4 \subset SiO_2$.

| MUESTRA | CONCENTRACIÓN ÁTOMICA (at. %) | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|------|-------|-------|-------|------|
| | C 1s | N 1s | O 1s | Si 2p | Fe 2p | S 2s |
| 200 nm $Fe_3O_4 \subset SiO_2$ -De | 24,02 | 3,80 | 47,73 | 21,31 | 0,71 | - |
| 200 nm $DeAXO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 40,20 | 4,81 | 38,62 | 15,68 | 0,56 | 0,13 |
| 50 nm $Fe_3O_4 \subset SiO_2$ -De | 34,40 | 7,52 | 42,46 | 13,91 | 1,70 | - |
| 50 nm $DeAXO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 33,06 | 6,85 | 42,96 | 14,50 | 2,54 | 0,09 |
| 50 nm $DeBPO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 29,65 | 6,95 | 45,06 | 16,03 | 2,20 | 0,10 |
| 30 nm $Fe_3O_4 \subset SiO_2$ -De | 35,36 | 9,06 | 41,47 | 12,72 | 1,45 | - |
| 30 nm $DeAXO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 29,87 | 7,12 | 45,09 | 14,16 | 3,61 | 0,14 |
| 30 nm $DeBPO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 48,90 | 4,90 | 32,50 | 9,90 | 3,58 | 0,16 |
| 15 nm $Fe_3O_4 \subset SiO_2$ -De | 32,31 | 8,54 | 44,37 | 15,31 | 1,51 | - |
| 15 nm $DeAXO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 44,27 | 8,46 | 34,02 | 10,78 | 2,36 | 0,10 |
| 15 nm $DeBPO@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ | 62,88 | 3,94 | 20,62 | 6,66 | 5,78 | 0,11 |

A pesar de que con XPS se pueden apreciar picos debido al azufre S2s hay que tener en cuenta que estamos muy cerca del límite de detección de la técnica.

III.3.7. Ensayos RAST con $DeAn@Fe_3O_4 \subset SiO_2$.

Para estudiar el potencial de $DeAn@Fe_3O_4 \subset SiO_2$ en el diagnóstico de alergia a fármacos, se ha evaluado su capacidad de reconocimiento de IgE específica mediante ensayos RAST (Figura 50).

Estos ensayos se han realizado en colaboración con el grupo de investigación de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga, (HRUM), liderado por la Dra. M.J. Torres.

Para ello se han empleado sueros de pacientes diagnosticados como alérgicos a Amoxicilina y Bencilpenicilina, por técnicas convencionales e individuos control, es decir, no alérgicos de acuerdo con las directrices de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI).^{126,148}

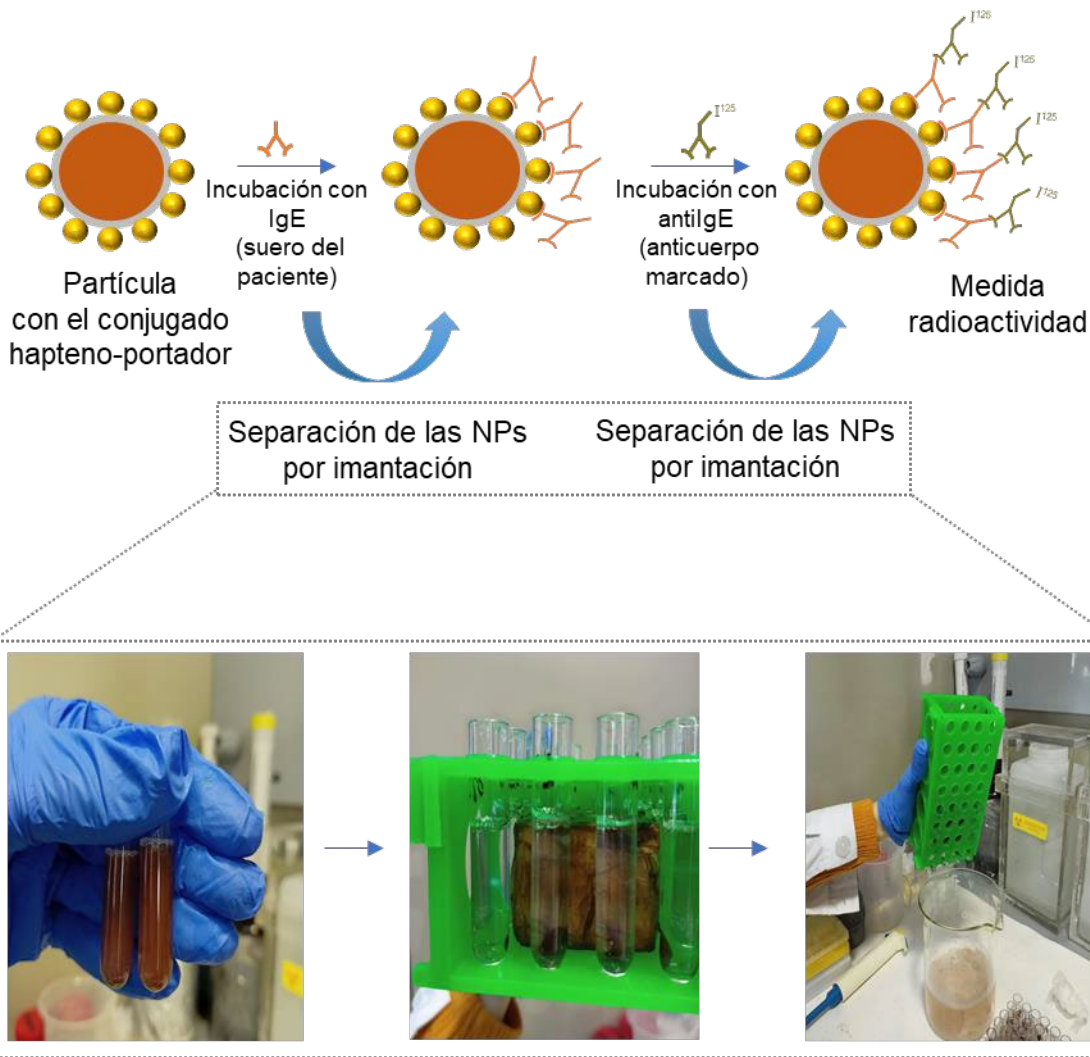


Figura 50. Representación del ensayo RAST con partículas de óxido de hierro cubiertas por una capa de sílice.

1. Aproximación a RAST con las partículas de Fe_3O_4 .

Siguiendo este protocolo descrito, y con el objetivo de comprobar que las nuevas partículas sintetizadas de óxido de hierro recubiertas de una capa de sílice presentan capacidad de reconocimiento de IgE específica, al igual que las partículas de sílice del apartado anterior, se ha realizado un primer experimento comparativo.

Para ello, se han utilizado partículas de sílice de 500 nm (sintetizadas en el apartado anterior) y 200 nm funcionalizadas en su superficie con el determinante antigénico amoxicilina DeAXO@SiO_2 , y así poder comparar el resultado del ensayo RAST con partículas de diferente tamaño pero igual material

A su vez también se han utilizado partículas de hierro de 200 nm funcionalizadas con el determinante antigénico amoxicilina $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, y poder así comparar los resultados del ensayo RAST en partículas con el mismo tamaño, pero diferente material.

Este primer ensayo se ha realizado utilizando diferentes disoluciones de sueros de pacientes, denominadas pool, tanto para los pacientes alérgicos a amoxicilina como para los pacientes control. Estos pool son al igual que en el apartado anterior, pool (+) alto y pool (+) bajo para los pacientes alérgicos. Y pool (-) y pool (-) IgE alta, para pacientes control.

Las condiciones a las que se ha realizado este ensayo han sido idénticas a las optimizadas para las partículas de sílice del apartado anterior, 2 mg de partícula en 20 μ L de PBS y velocidad de agitación de 550 rpm.

Los resultados de realizar el RAST con estos tres tipos de partículas se representan en la Figura 51 y tabla 37 del apéndice.

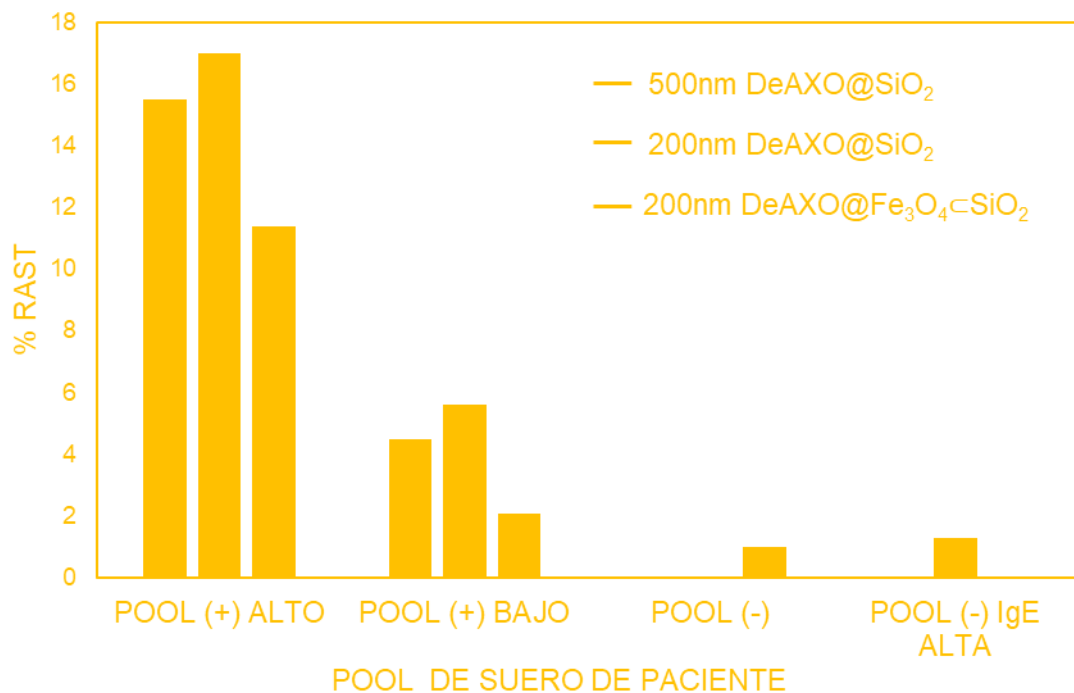


Figura 51. Comparación del %RAST de las partículas 500 nm DeAXO@SiO₂, 200 nm DeAXO@SiO₂, y 200 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ agitando a 550 rpm. Valores en la Tabla 37 del apéndice.

Se ha observado cómo las partículas de sílice de 200 nm presentan un % de RAST mayor que las de 500 nm. Esto se puede explicar ya que a menor tamaño de partícula aumenta el área superficial por gramo de partícula y como consecuencia aumenta la concentración de alérgeno expuesto, lo que se traduce en mayor % de RAST. Sin embargo, los tiempos de centrifugación han aumentado.

A su vez también se ha observado que el % de RAST para las partículas de 200 nm de sílice es mayor que para las de núcleo magnético. Este hecho se puede explicar ya que las condiciones utilizadas en este primer ensayo han sido las optimizadas para las partículas de sílice, siendo la etapa de agitación (550 rpm) insuficiente para las partículas de núcleo

magnético, debido a la fuerte imantación que sufren entre ellas, y dando lugar a la decantación de las partículas después de cada periodo de incubación.

Al igual que en el apartado anterior la agitación de las etapas de incubación es un paso crucial a la hora de desarrollar el ensayo RAST. Por lo que para obtener resultados en el ensayo RAST que sean comparables con ambas partículas, se ha realizado el mismo experimento, pero a una mayor agitación (700 rpm). Así se consigue que las partículas de óxido de hierro se encuentren en dispersión durante todo el proceso de incubación y el contacto entre el alérgeno de la superficie de partícula y la IgE sea total.

Los resultados obtenidos de repetir el ensayo el RAST con estos tres tipos de partículas a una agitación de 700 rpm se representan en la figura 52 y tabla 38 del apéndice.

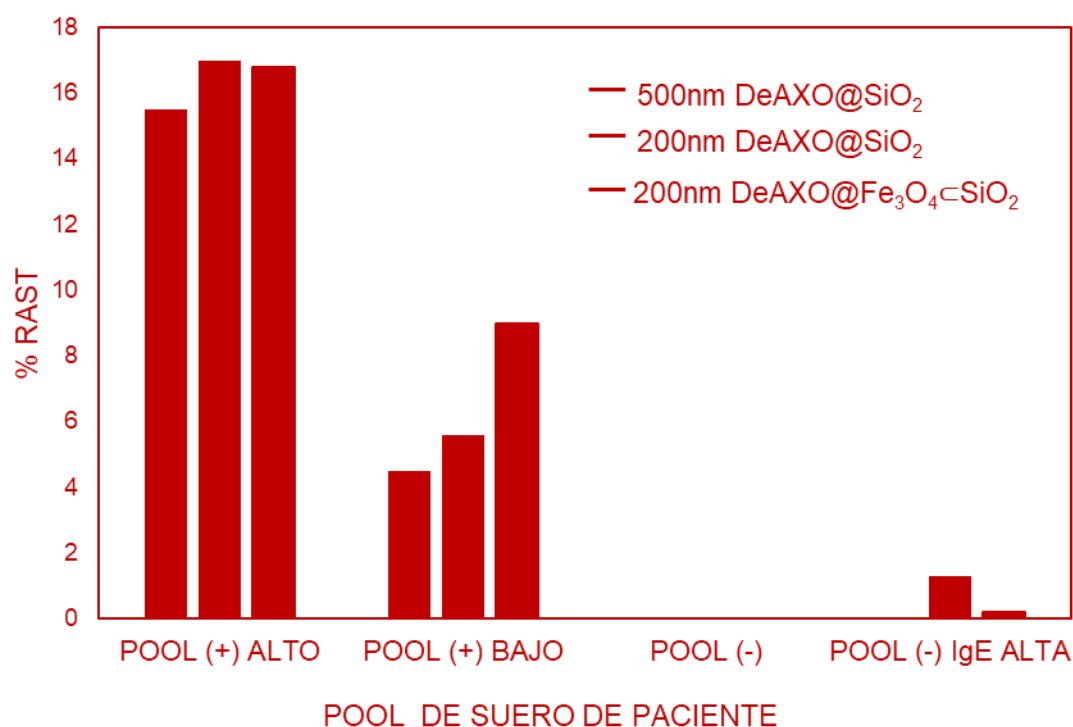


Figura 52. Comparación del %RAST de las partículas 500 nm DeAXO@SiO₂, 200 nm DeAXO@SiO₂, y 200 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ agitando a 700 rpm. Valores en la Tabla 38 del apéndice.

Se ha observado como el %RAST aumenta en las partículas Fe₃O₄@SiO₂ cuando se agita a 700 rpm hasta llegar a valores similares a las partículas de SiO₂. Este hecho pone de manifiesto que el contacto entre la superficie de la partícula y el suero en este caso ha sido total y que por lo tanto esta velocidad de agitación es óptima para este tipo de partículas.

Sin embargo, para el pool (+) bajo el % de RAST es mayor en las nuevas partículas de óxido de hierro que en las partículas de sílice. Este hecho muestra el gran potencial que presenta este tipo de material para reconocer IgE específica incluso en pacientes en los que la cantidad de IgE total es baja (Figura 52).

2. Concentración óptima de las partículas de Fe_3O_4 .

Una vez que se ha comprobado el potencial del nuevo material sintetizado y con el objetivo de llevar a cabo una validación técnica del nuevo material sintetizado para llevarlo a la práctica clínica, se han realizado experimentos con todas las nanopartículas de hierro sintetizadas y funcionalizadas con el determinante antigénico amoxicilina (**200 nm DeAXO@ Fe_3O_4 @ SiO_2** , **50 nm DeAXO@ Fe_3O_4 @ SiO_2** , **30 nm DeAXO@ Fe_3O_4 @ SiO_2** y **15 nm DeAXO@ Fe_3O_4 @ SiO_2**) a diferentes concentraciones (1.5 mg/20 μL , 2 mg/20 μL y 2.5 mg/20 μL) para determinar el tamaño óptimo de partícula y la concentración de estas en el ensayo RAST.

Estos ensayos se han realizado de nuevo utilizando pool de sueros de pacientes alérgicos a amoxicilina y de pacientes control.

Normalmente, el número de sueros a la hora de realizar el ensayo RAST en la práctica clínica de rutina es muy alto. Y es por eso que es necesario que el tiempo de realización del test sea lo más rápido posible.

Sin embargo, se ha visto en el apartado anterior, que, con una cantidad alta de sueros, y teniendo que hacer las muestras por duplicado, las partículas de sílice alargan los tiempos de realización del test debido a las etapas de lavado mediante centrifugación.

En este sentido, estas nuevas partículas sintetizadas resultan ser prometedoras ya que las etapas de lavado se realizan mediante imantación, acortando así las etapas de lavado a tiempos 10 veces menores que las partículas de sílice (Figura 53).

Este hecho se traduce en la capacidad de realizar un mayor número de sueros por ensayo, es decir un mayor número de diagnósticos, lo cual es imprescindible para llevar a la práctica clínica de rutina el ensayo RAST con partículas.

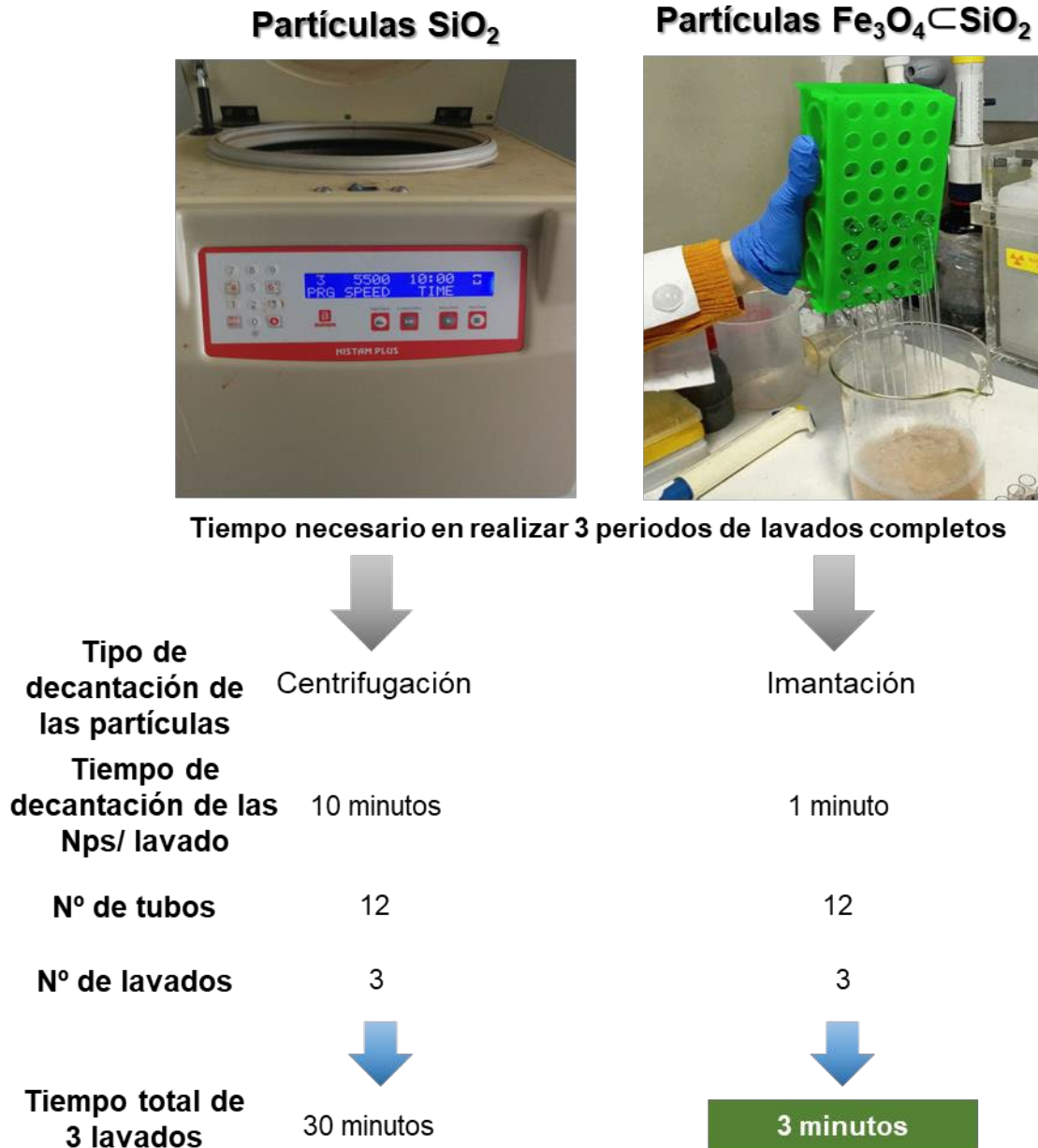


Figura 53. Comparación de los tiempos de lavado con las partículas de sílice y de óxido de hierro

Los resultados obtenidos después de realizar el ensayo el RAST con los diferentes tamaños de partículas y a diferentes concentraciones se representan en la figura 54 y tablas 39, 40, 41 y 42 del apéndice.

Se ha observado que todos los tamaños de partículas son capaces de reconocer IgE específica.

También, se ha observado que, dentro de un mismo tamaño de partícula, un aumento de la concentración de esta de 1,5 mg a 2 mg de partícula en 20µL de PB aumenta el % de RAST.

Sin embargo, cuando se aumenta la concentración a 2,5 mg en 20µL llega a un umbral donde el aumento de la concentración de partícula no se traduce en un mayor reconocimiento.

Por otro lado, se ha observado que para todas las partículas el pool (-) presenta valores de % de RAST de cero como cabía esperar. Sin embargo, en el caso del pool (-) IgE alta las partículas de 50 y de 30 nm presentan valores de % RAST menores que las partículas de 15 nm. Por lo que a la hora de elegir una concentración adecuada este hecho es muy importante.

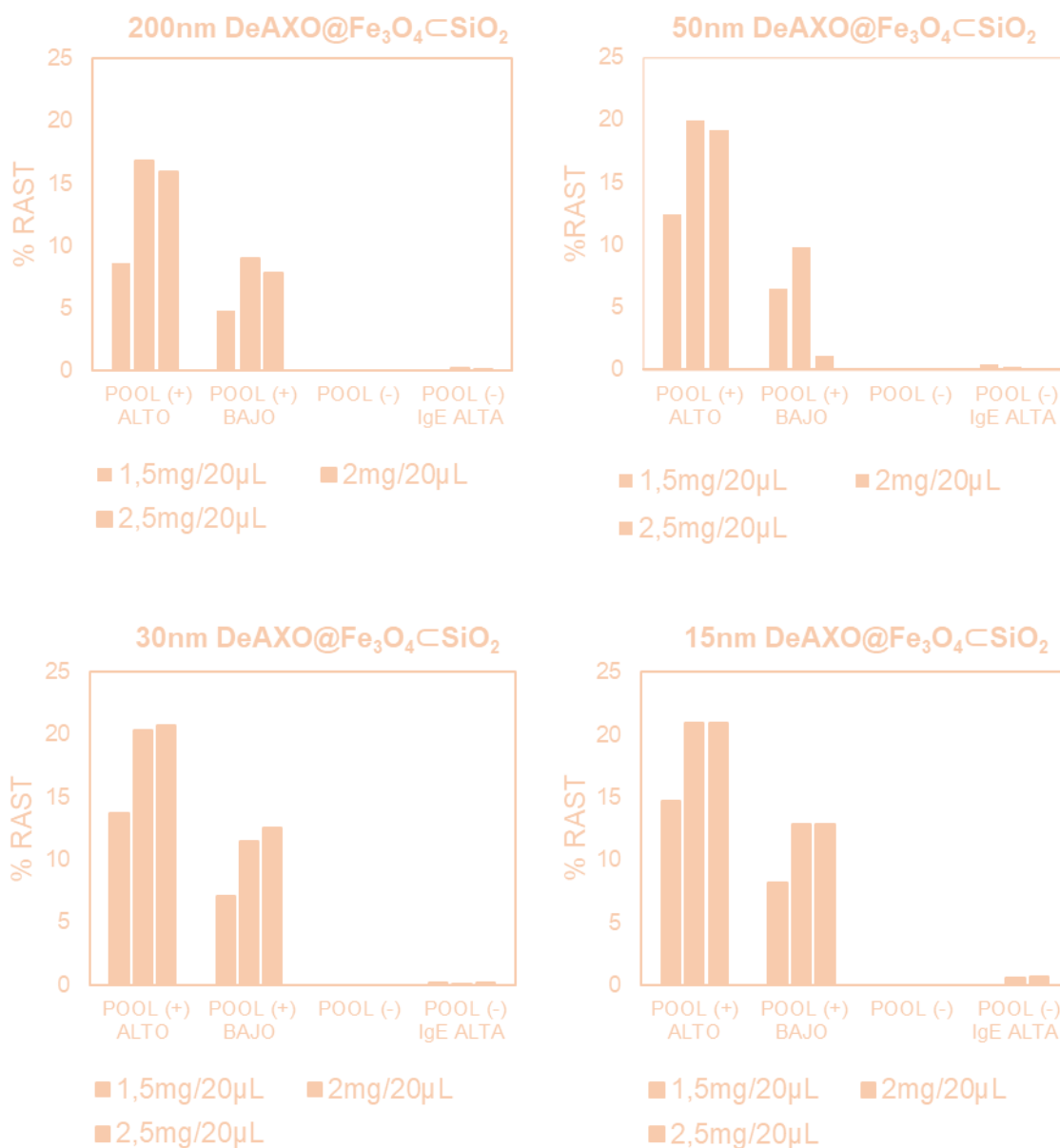


Figura 54. Optimización de la concentración y el tamaño de partícula. Valores en las Tablas 39, 40, 41 y 42 del apéndice.

No obstante, a la hora de elegir un tamaño óptimo para la práctica clínica de hospitales, no solo hay que tener en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo RAST. Si no que también hay que tener en cuenta la dificultad sintética y el rendimiento presente en la síntesis de este tipo de partículas.

En este sentido, es importante resaltar que cuanto menor es el tamaño de partícula sintetizado, mayor es la dificultad sintética, obteniendo como resultado un rendimiento menor.

En la figura 54 se observa como el % de RAST en las partículas de 15 nm es algo mayor que para las partículas de 50 y de 30 nm, sin embargo, la dificultad sintética que presentan las partículas de 15 nm es mucho mayor que las de 50 o 30 nm.

Por lo que para elegir un tamaño y concentración de partícula para seguir realizando ensayos hay que llegar a un compromiso entre la dificultad sintética y los resultados obtenidos mediante RAST.

Basándonos en estas dos observaciones y teniendo en cuenta el compromiso entre rendimiento de la síntesis y capacidad de reconocimiento se ha decidido seguir realizando ensayos con los tamaños de partícula de 50 nm y 30 nm a una concentración de 2 mg de partícula/20 μ L de PBS y 30 μ L de suero.

3. Tamaño óptimo de las partículas de Fe_3O_4 .

Para elegir un tamaño de partícula óptimo entre los dos tamaños que se han seleccionado en el experimento anterior, se han realizado ensayos con ambos materiales funcionalizados tanto con amoxicilina como con bencilpenicilina (**50nm DeAXO@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, 30nm DeAXO@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, 50nm DeBPO@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, 30nm DeBPO@ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) y el blanco (**$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$**) a la concentración establecida en el experimento anterior (2 mg de partícula en 20 μ L de PBS) con 15 sueros de pacientes, de los cuales 10 eran alérgicos a amoxicilina, 5 alérgicos a amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada y 5 pacientes control usando como blanco las partículas **$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$** .**

Los resultados obtenidos después de realizar el ensayo el RAST con las partículas de 50 y 30 nm funcionalizadas con AXO y BPO se representan en la figura 55 y tabla 43 del apéndice.

Se ha observado que las partículas de ambos tamaños presentan un nivel de reconocimiento para pacientes alérgicos similar. Sin embargo, el % de RAST para los pacientes control es menor en las partículas de tamaño 30 nm que en las partículas de 50 nm, motivo por el cual el tamaño final elegido para la realización técnica de este material ha sido 30 nm y concentración 2 mg de partícula/20 μ L de PBS.

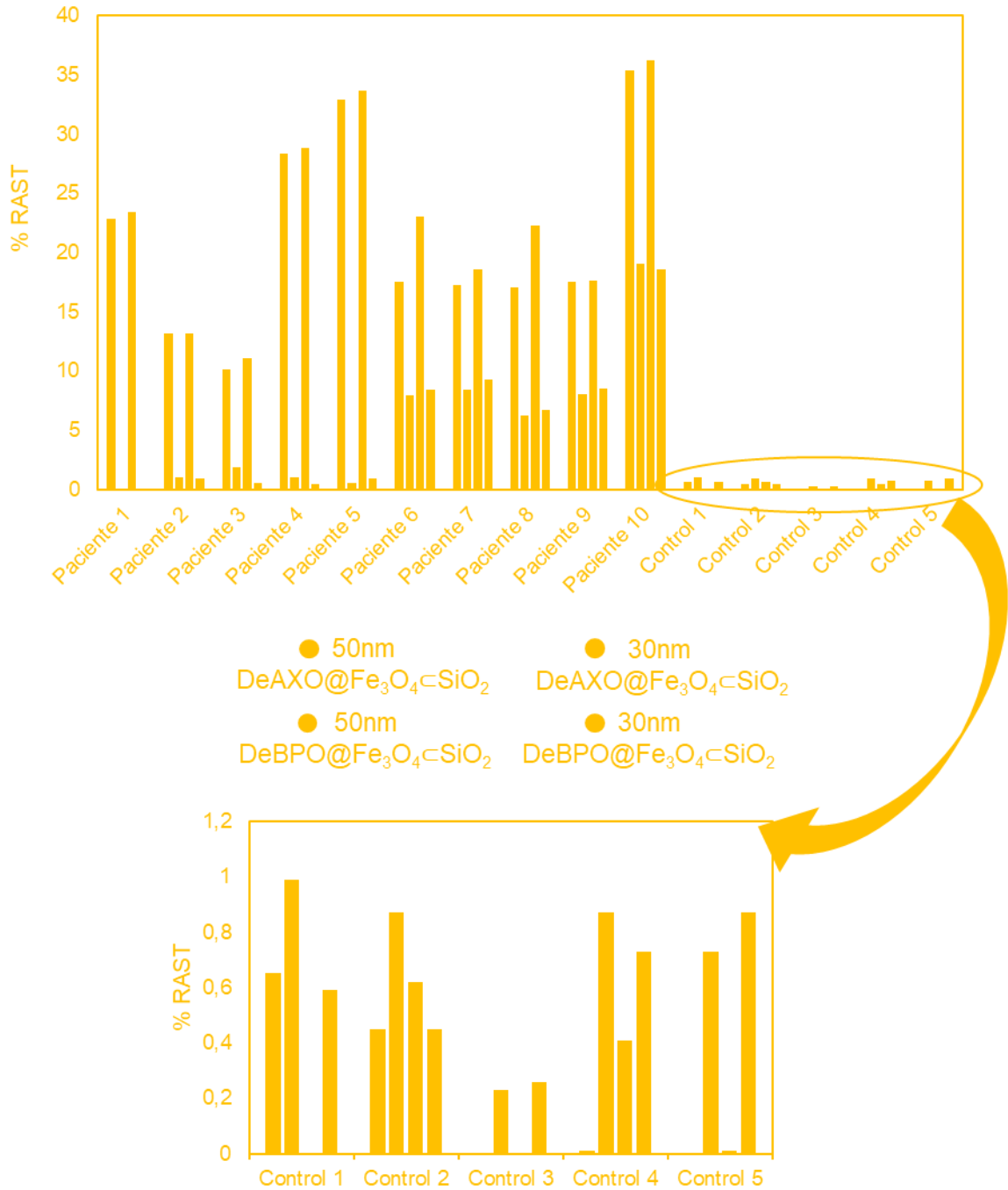


Figura 55. Evaluación de la capacidad de reconocimiento de IgE específica en materiales de núcleo de hierro cubiertos por una capa de sílice de 50 y 30 nm. Valores en la Tabla 43 del apéndice.

4. Tiempo óptimo de las partículas de Fe₃O₄.

Una vez que se ha elegido el tamaño óptimo de partículas nos planeamos acortar los tiempos de incubación de las partículas con el suero del paciente, con el fin de comprobar si a menor tiempo de incubación el reconocimiento de la IgE por el conjugado H-P es total y poder así acortar los tiempos del ensayo RAST.

Para ello se ha llevado a cabo un experimento donde se han incubado las partículas **30 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂** con pool de suero de pacientes a diferentes tiempos. El tiempo de incubación del anticuerpo fue el mismo, 16h.

Los resultados obtenidos después de realizar este ensayo se presentan en la figura 56 y tabla 44 del apéndice.

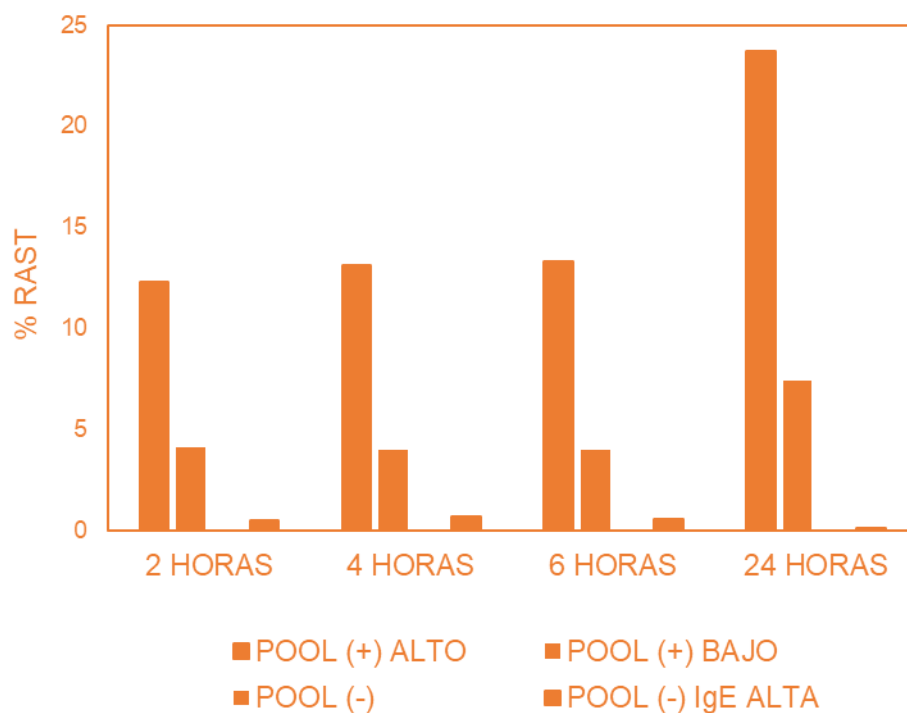


Figura 56. Comparación de los diferentes tiempos de incubación de las partículas de 30 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ a diferentes tiempos de incubación con los pool de suero. Valores en la Tabla 44 del apéndice.

Se puede observar cómo a mayor tiempo de incubación el % de RAST aumenta tanto para pool (+) alto como para pool (+) bajo. Por lo que no se ha podido reducir el tiempo de incubación de las partículas con el suero con respecto a los ensayos anteriores, siendo el tiempo de incubación óptimo de 24h.

5. Validación técnica.

Una vez que se ha optimizado el tamaño y la concentración adecuada para el reconocimiento de la IgE específica de este tipo de partícula, se ha procedido a hacer una validación técnica del material, ampliando el número de sueros a estudiar.

Para ello se han llevado a cabo ensayos con 44 sueros de pacientes alérgicos tanto a amoxicilina selectivos como a amoxicilina bencilpenicilina reactividad cruzada y 37 sueros de pacientes control, es decir tolerantes a β-lactámicos.

En todos los pacientes alérgicos se ha confirmado la reacción alérgica inmediata a AX, por una prueba cutánea (PC) positiva a AX o por la presencia de IgE específica a AX mediante ImmunoCAP.⁹⁰ Los valores de ImmunoCAP se muestran en la Tabla 47 del apéndice.

Los pacientes se han clasificado como selectivos a AX (28 sujetos, Grupo A) o reactividad cruzada a BP (16 sujetos, Grupo B), según los resultados de PC o IgE a BP, determinada por ImmunoCAP (negativo para el Grupo A y positivo para el Grupo B).

Tantos los sueros de pacientes como los controles se han evaluado, empleando cada una de las partículas de 30 nm sintetizadas anteriormente, **DeAXO@Fe₃O₄◁SiO₂** y **DeBPO@Fe₃O₄◁SiO₂**, usando como blanco el material **Fe₃O₄◁SiO₂-De** a la concentración establecida 2 mg de partícula/20 µL de PBS y 30 µL de suero.

Para analizar correctamente los resultados obtenidos después de realizar el ensayo RAST hay que realizar una Curva ROC para establecer un punto de corte al igual que en el apartado anterior. La elección del punto de corte elegido se ha basado en un compromiso entre especificidad y sensibilidad.¹⁴⁹

En la figura 57 se representa la curva ROC gráfica para los valores obtenidos después de realizar el ensayo RAST. Los valores pueden observarse en las tablas 45 y 46 del apéndice.

Se observa que existe un punto donde cortan ambos ejes para el cual se obtiene un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad en todas las partículas, siendo este $\geq 5,5$ para **DeAXO@Fe₃O₄◁SiO₂** y $\geq 1,2$ para **DeBPO@Fe₃O₄◁SiO₂**. Por lo que, siguiendo el compromiso marcado anteriormente entre especificidad y sensibilidad, los puntos de cortes seleccionados para las partículas serán estos respectivamente.

Figura 57. Curva ROC de 30 nm DeAn@Fe₃O₄@SiO₂. Valores en las tablas 45 y 46 del apéndice.
Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

Una vez establecido el punto de corte, se ha procedido a analizar los datos de los 44 sueros de pacientes ensayados para validar técnicamente el método y comprobar su sensibilidad.

Los valores obtenidos después de realizar el ensayo RAST se pueden observar en la figura 58 y tabla 47 del apéndice.

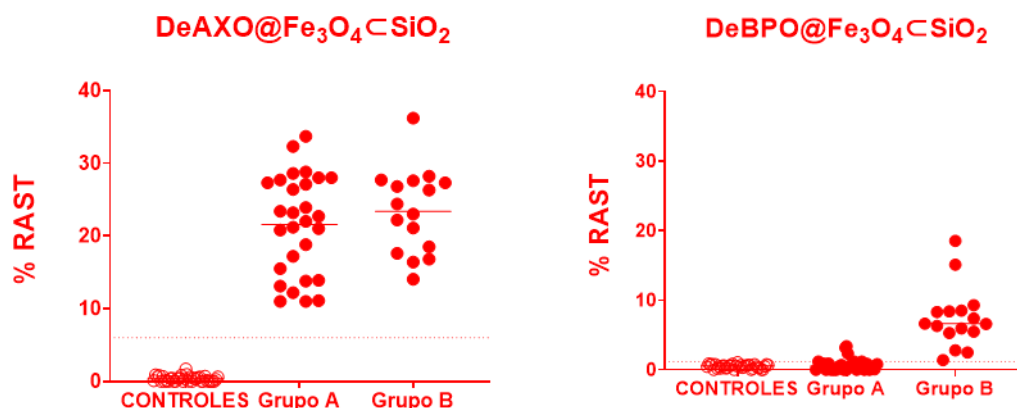


Figura 58. Resultados de % de RAST en 44 pacientes alérgicos con 30nm DeAn@Fe₃O₄@SiO₂. Valores en Tabla 47 del apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

Según los puntos de corte elegido anteriormente, se observan valores de RAST positivos con DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ en 44 de 44 (100%) de los pacientes con reacciones inmediatas a AX (grupo A y B).

Con las partículas DeBPO@Fe₃O₄@SiO₂ se observan valores positivos de IgE para AX en 4 de 28 (14 %) de los pacientes del Grupo A, lo que se traduce como falsos positivos. Y valores positivos de IgE para BP en 16 de 16 (100 %) de los pacientes con reactividad cruzada a BP (Grupo B).

En los controles (sujetos tolerantes a las BL), el porcentaje de RAST fue negativo en el 100% de los casos para los dos tipos de partículas.

Este hecho ha confirmado la validez de reconocimiento de estos materiales para reconocer anticuerpos IgE específicos tanto a amoxicilina, como a amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada y por lo tanto para poder usarse en métodos de detección *in vitro*.

Los resultados obtenidos se han comparado con los ensayos RAST con discos de celulosa funcionalizados con PLL y el fármaco a estudiar (AX y BP).

Los puntos de corte establecidos para los discos BL-PLL han sido $\geq 4\%$ para AX con discos AXO-PLL y $\geq 2,3\%$ para BP con discos BPO-PLL.

En la figura 59 y tabla 47 del apéndice se representan los valores de RAST obtenidos al realizar los ensayos con los discos funcionalizados con el determinante antigénico (AXO-PLL y BPO-PLL).

Según los puntos de corte seleccionados, se pueden observar valores positivos de RAST con discos AXO-PLL en 5 de 28 (12 %) de los pacientes del Grupo A y en 3 de 16 (19 %) de los pacientes del Grupo B; por lo tanto, en general el porcentaje de positivos fue del 15% de todos los pacientes con reacciones inmediatas a AX (Grupo A más Grupo B).

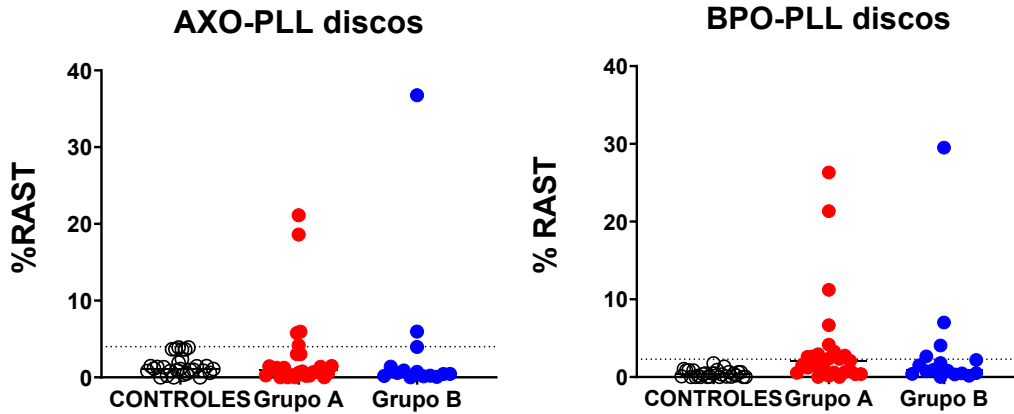


Figura 59. Resultados de % de RAST en 44 pacientes alérgicos con discos de celulosa funcionalizado con AXO-PLL y BPO-PLL. Valores en Tabla 47 del apéndice. Datos tratados con el programa GraphPad Prism 8.4.2.

Se pueden observar también valores positivos de IgE para AX con discos BPO-PLL en 11 de 28 (40 %) de los pacientes del Grupo A, lo que se traduce como falsos positivos. Y valores positivos de IgE para BP con discos BPO-PLL en 4 de 16 (25 %) de los pacientes con reactividad cruzada a BP (Grupo B). En los controles (sujetos tolerantes a las BL), el RAST fue negativo en el 100% de los casos para los dos tipos de discos.

En conclusión, las partículas sintetizadas en este trabajo aumentan la sensibilidad con respecto a los discos de celulosa funcionalizados, obteniéndose un menor número de falsos positivos. Por lo que el nuevo material sintetizado con su correcta funcionalización es un método prometedor para la práctica clínica de detección de alergias *in vitro*.

6. Interensayo.

Uno de los indicadores fundamentales para la validación de inmunoensayos es la medida de la precisión, la cual se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces.

Esta puede clasificarse en dos tipos:

- ◆ **Precisión intraensayo:** Es el que se obtiene cuando se procesan varias réplicas de diferentes muestras en un mismo ensayo; es decir, la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (repetibilidad). De aquí que las muestras al realizar los ensayos Rast se realicen por duplicado.
- ◆ **Precisión interensayo:** Es la que se obtiene entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Se evalúan varias muestras representativas y diferentes del estudio. De cada muestra se hacen entre tres a diez replicados, repitiendo este procedimiento al menos dos veces en días diferentes para un total de tres ensayos.

Los datos que se obtienen permiten conocer la reproducibilidad del trabajo de un laboratorio durante un período de tiempo determinado; para evaluar la ejecución entre los técnicos, la variación entre laboratorios o lotes de reactivos.¹⁶²

Para comprobar la reproducibilidad tanto de las partículas de 30 nm funcionalizadas con el alérgeno, como del ensayo RAST con este tipo de partículas se ha realizado un interensayo con 5 sueros de pacientes, 3 selectivos a amoxicilina (paciente 1, 2 y 3, Figura 60) y 2 reactividad cruzada (paciente 4 y 5, Figura 60), en 5 días diferentes y con 2 anticuerpos marcados en días diferentes.

El experimento de interensayo se ha diseñado así para representar a los dos tipos de muestras presentes en el ensayo, los pacientes AX selectivos y los pacientes AX:BP reactividad cruzada. A

Además, el experimento se ha realizado empleando 2 anticuerpos marcados en días diferentes, para poder comprobar la reproducibilidad del marcaje de anticuerpos, ya que para llevar a cabo el ensayo RAST, primero hay que marcar un anticuerpo con I¹²⁵.

El procedimiento de marcaje se lleva a cabo por el personal del grupo de investigación de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga, (HRUM), liderado por la Dra. M.J. Torres, en la unidad de radioisótopos de la Universidad de Málaga.

El marcaje del anticuerpo 1 se hizo el día 11 de febrero de 2021, correspondiente al día 1 de interensayo y el marcaje del anticuerpo 2 se hizo el día 2 de marzo de 2021, correspondiente a los demás días de interensayo.

Los resultados obtenidos después de realizar el interensayo se presentan en la figura 60. Los valores pueden observarse en las tablas 48 y 49 del apéndice.

Se ha observado cómo los valores del %RAST de todos los pacientes ensayados es similar a pesar de hacerlo en diferentes días y con dos anticuerpos marcados en días diferentes. Por lo que este hecho indica la reproducibilidad de las partículas, del anticuerpo marcado y del ensayo en sí.

Figura 60. % RAST del interensayo con $DeAn@Fe_3O_4@SiO_2$ en 5 pacientes y 5 días diferentes. Valores en la Tabla 48 y 49 del apéndice.

7. Ensayos de inhibición de RAST.

Por último, se han hecho ensayos de inhibición de RAST para estudiar más a fondo el grado de reconocimiento de los anticuerpos de pacientes a diferentes estructuras, es decir, para estudiar los casos de reactividad cruzada.

Una Inhibición competitiva se basa en la competición de un sustrato y un inhibidor que tienen afinidad por el mismo sitio de unión del anticuerpo.

Este tipo de inhibición se puede superar con concentraciones suficientemente altas del sustrato, es decir, dejando fuera de competición al inhibidor. Los inhibidores competitivos son a menudo similares en estructura al sustrato verdadero.

En base a esto, se han utilizado como sustrato las partículas **DeAn@Fe₃O₄-SiO₂** de 30 nm y como inhibidores amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO), frente a 17 sueros de pacientes alérgicos (3 amoxicilina selectivos y 14 amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada).

El ensayo de inhibición de RAST consta de varias etapas:

- ◆ Una primera etapa de incubación del suero del paciente a diagnosticar y el inhibidor correspondiente.
- ◆ Una segunda etapa de incubación de las partículas funcionalizadas con el determinante antigénico con la mezcla de suero e inhibidor incubada anteriormente, permitiendo que suceda la competición entre sustrato e inhibidor. Esta incubación se realiza mediante agitación en cámara húmeda (700 rpm) durante 16 horas.
- ◆ Una primera etapa de lavado con una disolución de PBS con un 0,05% de Tween 20 mediante tres periodos de imantación, para separar la fase sólida del sobrenadante.
- ◆ Una tercera etapa de incubación de las partículas incubadas anteriormente, con un anti-anticuerpo humano policlonal IgE marcado radiactivamente con I¹²⁵. Esta incubación se vuelve a realizar en cámara húmeda mediante agitación (700 rpm) durante 16 horas.
- ◆ Una segunda etapa de lavado con una disolución de PBS con un 0,05% de Tween 20 mediante tres periodos de imantación, para separar la fase sólida del sobrenadante.
- ◆ Finalmente se mide la radioactividad de las partículas en un contador gamma.

Los 3 pacientes alérgicos selectivos a amoxicilina se han ensayado con las nanopartículas **DeAXO@Fe₃O₄-SiO₂** frente a los inhibidores amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y amoxicilina-bencilpenicilina (Bu-BPO) a dos concentraciones 10 mM y 1 mM.

Los resultados obtenidos después de realizar la inhibición de RAST a los 3 pacientes AX selectivos se puede observar en la Figura 61 y tabla del apéndice 50.

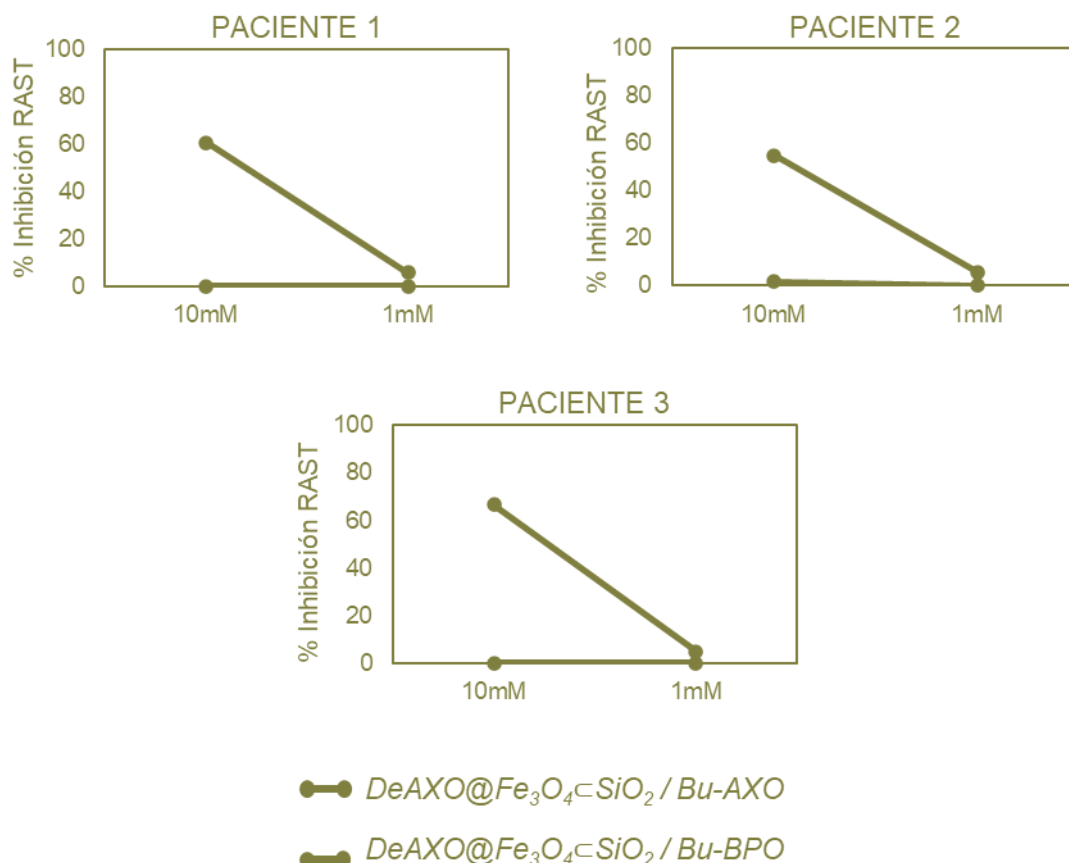


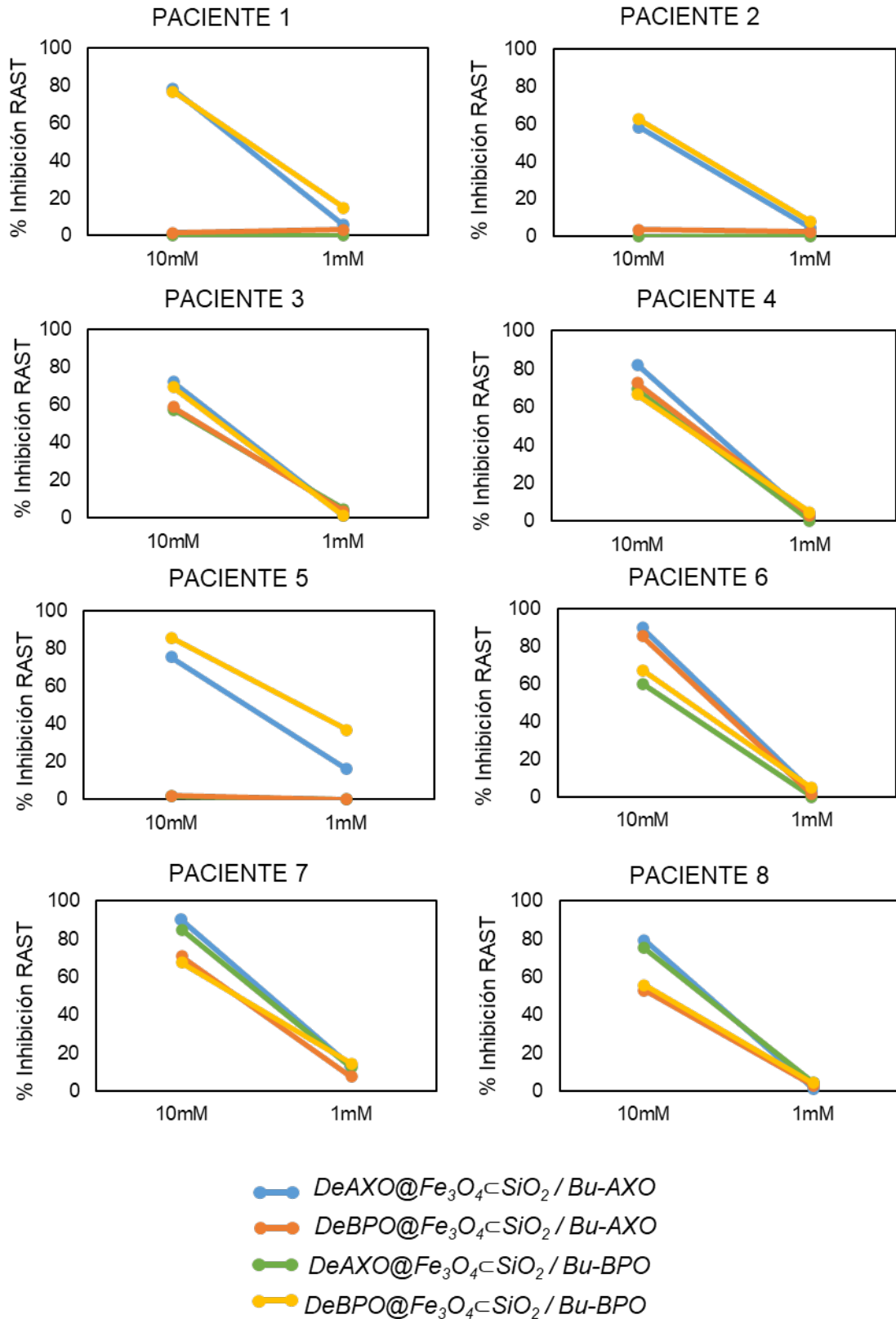
Figura 61. % de inhibición de RAST de 3 paciente alérgicos selectivos a amoxicilina ensayados con el material $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$. Valores en la Tabla 50 del apéndice.

Se puede observar que cuando se añade el inhibidor Bu-AXO a mayor concentración, este compite con las partículas $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ inhibiendo el reconocimiento de la IgE por las partículas. Sin embargo, cuando la concentración de inhibidor es baja, las partículas desplazan al inhibidor, dejándolo fuera de competición.

En el caso del inhibidor Bu-BPO con las partículas $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ no se observa ningún % de inhibición a ninguna concentración de inhibidor.

Estos valores muestran la especificidad del proceso de reconocimiento para pacientes alérgicos selectivos a amoxicilina, ya que las IgE de los 3 pacientes reconocieron el material $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$, pero no se mostró ningún reconocimiento para el material a $\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$.

Los 14 pacientes alérgicos a amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada se han ensayado con las nanopartículas $\text{DeAXO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ y $\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ frente a los inhibidores amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO) a dos concentraciones 10 mM y 1 mM.



- DeAXO@Fe₃O₄-SiO₂/Bu-AXO
- DeBPO@Fe₃O₄-SiO₂/Bu-AXO
- DeAXO@Fe₃O₄-SiO₂/Bu-BPO
- DeBPO@Fe₃O₄-SiO₂/Bu-BPO

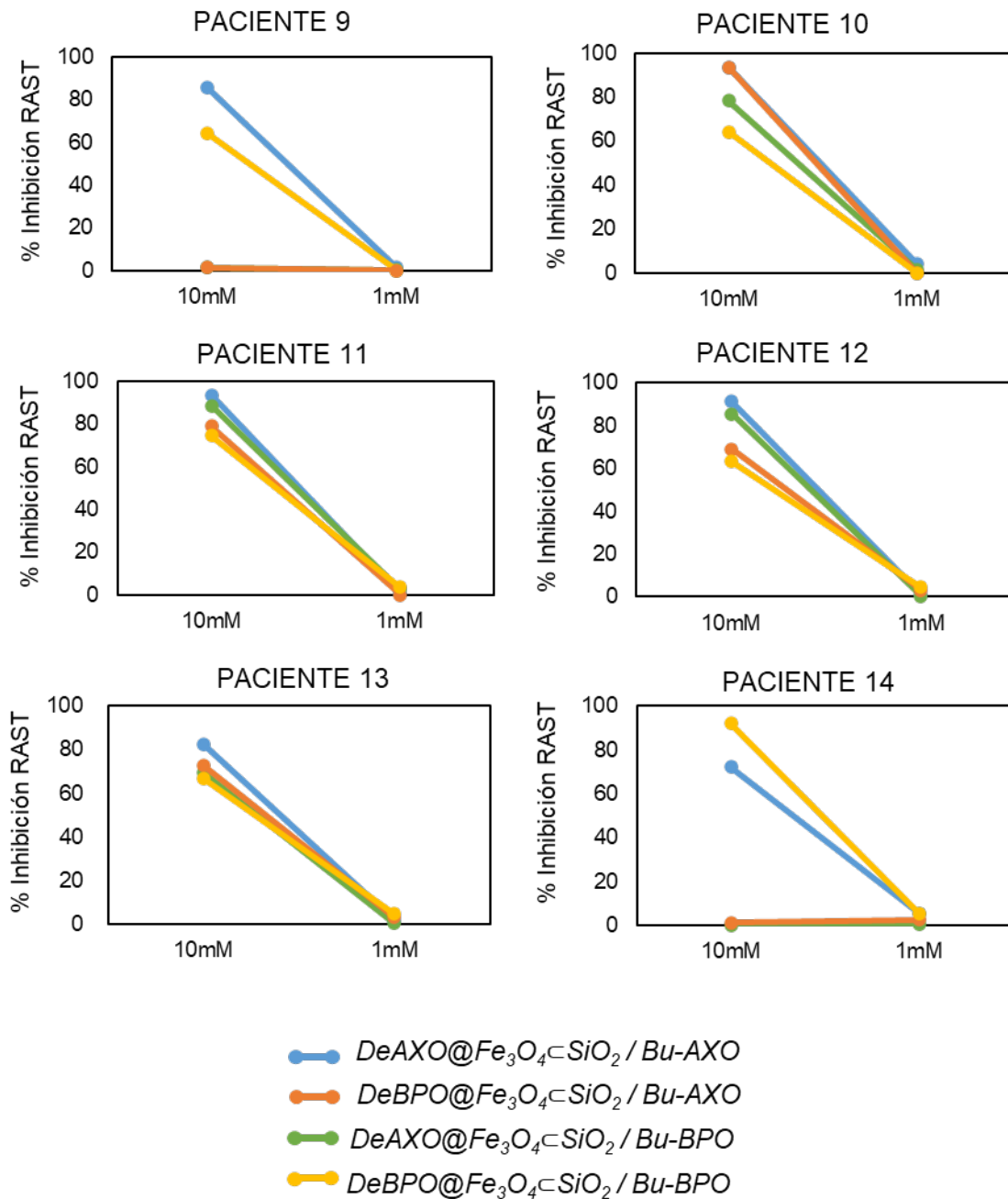


Figura 62. Porcentaje de inhibición de RAST de 14 pacientes alérgicos reactividad cruzada a amoxicilina/bencilpenicilina ensayados con el material $DeAXO@Fe_3O_4/SiO_2$ y $DeBPO@Fe_3O_4/SiO_2$ Valores en la Tabla 51 del apéndice.

Para evaluar los resultados de estos 14 pacientes es importante explicar las dos hipótesis que existen actualmente sobre la naturaleza de las IgE de pacientes con reactividad cruzada a fármacos (Figura 62).

La hipótesis 1 correspondiente al modelo I, implica la coexistencia de dos poblaciones de IgE selectivas para cada fármaco. Mientras que la hipótesis 2, correspondiente al modelo II propone la presencia de una única IgE que reconoce ambos fármacos.

Los resultados obtenidos después de realizar la inhibición de RAST a los 14 pacientes AX:BP reactividad cruzada (Figura 62 y tabla del apéndice 51), indican que existen dos tendencias diferentes, una primera que corresponde a los pacientes 1, 2, 5,9 y 14 de la Figura 62.

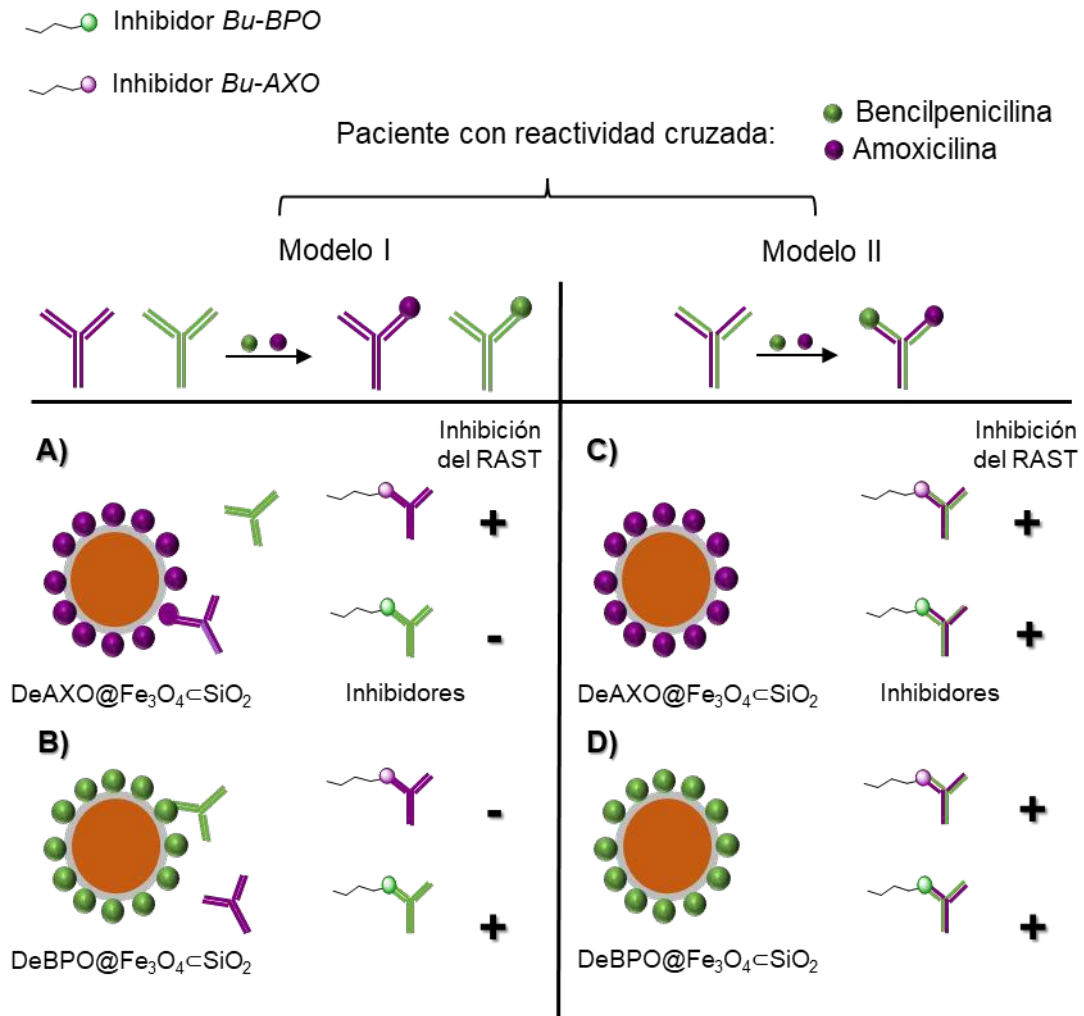


Figura 63. Representación esquemática de ensayos de inhibición RAST para dos hipótesis que explican la reactividad cruzada con bencilpenicilina y amoxicilina.¹⁴⁷ El modelo 1 implica la presencia de dos anticuerpos coexistentes específicos para cada fármaco: A) La fase sólida funcionalizada con amoxicilina (DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂). La IgE reconoce al inhibidor amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) pero no al inhibidor bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO). B) La fase sólida funcionalizada con bencilpenicilina (DeBPO@Fe₃O₄⊂SiO₂). La IgE reconoce al inhibidor bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO) pero no al inhibidor amoxicilina-butilamina (Bu-AXO). El modelo II implica la existencia de una única IgE capaz de reconocer ambos antibióticos: C) La fase sólida funcionalizada con amoxicilina (DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂). La IgE reconoce ambos inhibidores amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO). D) La fase sólida funcionalizada con amoxicilina (DeBPO@Fe₃O₄⊂SiO₂). La IgE reconoce ambos inhibidores amoxicilina-butilamina (Bu-AXO) y bencilpenicilina-butilamina (Bu-BPO).

Estos pacientes presentan anticuerpos IgE específicos para cada uno de los antibióticos β -lactámicos, ya que los valores de inhibición obtenidos con el inhibidor Bu-AXO y las partículas **DeAXO@Fe₃O₄◁SiO₂** ha sido positiva, sin embargo, la inhibición con el inhibidor Bu-BPO con las mismas partículas ha sido negativa. Y totalmente al contrario para las partículas **DeBPO@Fe₃O₄◁SiO₂**.

Y otra segunda que corresponde a los pacientes 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, y 13 de la Figura 62.

Estos pacientes presentan anticuerpos IgE específicos para ambos antibióticos β -lactámicos, ya que los valores de inhibición obtenidos con el inhibidor Bu-AXO y Bu-BPO y las partículas **DeAXO@Fe₃O₄◁SiO₂** ha sido positiva, y además los valores de inhibición obtenidos con el inhibidor Bu-AXO y Bu-BPO y las partículas **DeBPO@Fe₃O₄◁SiO₂** también ha sido positiva.

Por lo que siguiendo las hipótesis expuestas anteriormente se observa que existen dos poblaciones de pacientes con alergia a amoxicilina/bencilpenicilina reactividad cruzada claramente diferenciada, la primera correspondiente al modelo I de la figura 63 (Pacientes 1, 2, 5,9 y 14) y la segunda que corresponde al modelo II de la figura 63 (Pacientes 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, y 13).

Como conclusión, en este capítulo se ha optimizado la síntesis de nanopartículas de núcleo magnético (Fe₂O₃) recubiertas de una capa de SiO₂ uniforme de forma reproducible. Se han preparado NPs de 200, 50, 30 y 15 nm de tamaño del núcleo de Fe₂O₃ y una capa exterior de SiO₂ de aproximadamente 10 nm de grosor, que ha permitido su modificación superficial siguiendo los protocolos de síntesis y monitorización empleados en el capítulo anterior.

La evaluación de dichas nanopartículas en radioinmunoensayos RAST ha proporcionado resultados muy prometedores, observándose de nuevo una sensibilidad y especificidad del 100 %, mostrando una mejora sustancial en comparación con la técnica comercial ImmunoCAP. En este caso, se ha reducido considerablemente el tiempo empleado en la realización de los ensayos con respecto a las NPs de SiO₂, lo facilita el uso de estos sistemas en la práctica clínica. En este sentido, se ha ampliado el número de muestras evaluadas y se ha realizado una validación técnica de dichas nanopartículas en RAST, obteniéndose excelentes resultados.

CAPÍTULO IV
NANOPARTÍCULAS DE SILICE PARA BAT



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV.1. Introducción.

El test de activación de basófilos (BAT) se basa en la determinación de los marcadores de activación expresados en la superficie de los basófilos tras la interacción del fármaco con la IgE específica.⁹⁰

No obstante, el desconocimiento de los mecanismos de activación ha dificultado una aplicación clínica más amplia de este test, ya que los antibióticos β -lactámicos no son capaces de activar los basófilos por sí mismos, si no que requieren de la conjugación con una molécula portadora, generalmente presente en la sangre, que sea lo suficientemente grande como para permitir la reticulación de dos IgE específicas unidas a la superficie del basófilo. Esto induce la degranulación de las células efectoras, lo que lleva a la liberación de mediadores inflamatorios responsables de la reacción alérgica. Sin embargo, actualmente no se dispone de información sobre el tamaño y la composición de estos conjugados (Figura 64).¹⁶³⁻¹⁶⁵

En el escenario del BAT, se supone que los fármacos libres (AX o BP) se unen a las proteínas presentes en la sangre de forma covalente a través de la reactividad del anillo de β -lactama, formando un conjugado lo suficientemente grande como para lograr la reticulación. Este enfoque intenta emular las condiciones *in vivo*, pero carece de información sobre la composición química del conjugado que induce la activación.

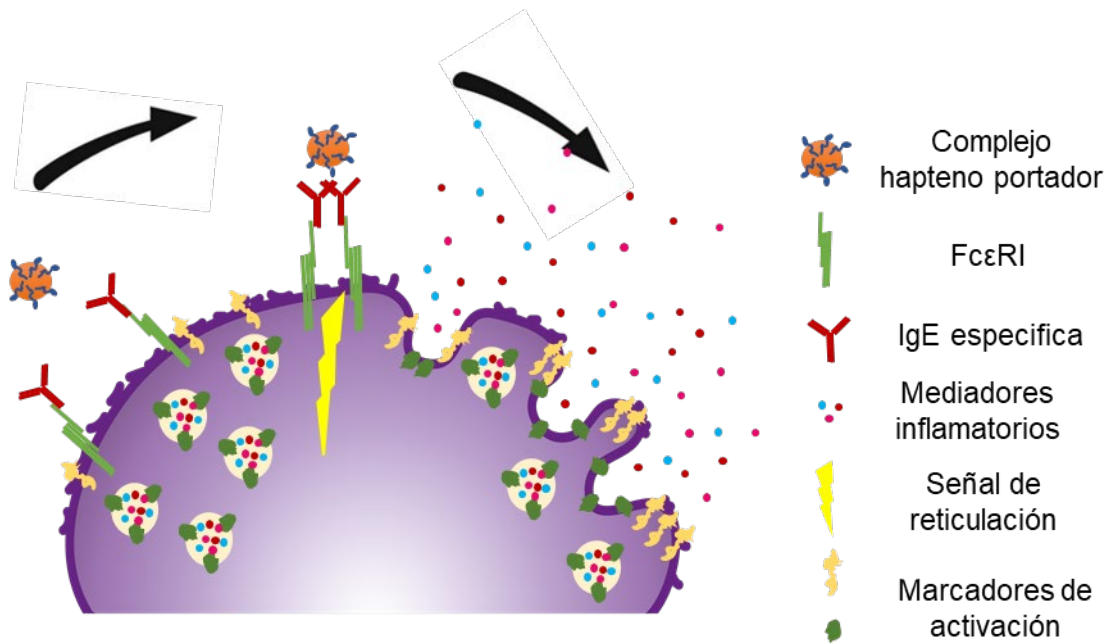


Figura 64. Mecanismo de activación del basófilo.

Estas relaciones entre la activación celular y la estructura del inmunógeno se han explorado recientemente en estudios *in vitro* realizados en modelos animales utilizando el 2,4-dinitrofenilo (DNP) como hapteno modelo. Se descubrió que el número de epítomos y la distancia entre ellos en las nanoestructuras sintéticas tienen diferentes efectos sobre la degranulación de los mastocitos.^{164,166–168} Uno de estos estudios, en el que se utilizaron dendrímeros decorados con epítomos de DNP, demostró que los dendrímeros de DNP16 más grandes (64 Å) desencadenan la degranulación de los mastocitos mediante la reticulación de los complejos IgE-receptor, mientras que los dendrímeros de DNP más pequeños son inhibidores.¹⁶⁸ Otros estudios han analizado estas relaciones en antibióticos β-lactámicos utilizando haptenos monovalentes, que podrían ser reconocidos por IgE pero incapaces de unirse a dos anticuerpos adyacentes simultáneamente.

Se ha demostrado que estas estructuras inhiben el desarrollo de una reacción alérgica, tanto *in vitro* como *in vivo* en pacientes alérgicos a BP, sin embargo, este hallazgo no se ha explorado más en un entorno clínico. La mayor parte de los conocimientos actuales sobre la activación de las nanoestructuras en la degranulación de las células efectoras se basa en estudios realizados con ligandos modelo y mastocitos animales. Por lo que no se conocen ningún estudio que emplee esta estrategia con haptenos reales o en muestras humanas.^{169–171}

En este sentido, estudios realizados por el grupo de investigación con estructuras DeAns han demostrado que este tipo de nanoestructuras son adecuadas para la reticulación intramolecular de IgE unida a los receptores de los basófilos en muestras reales. Estos estudios han permitido por primera vez realizar el BAT con moléculas distintas al fármaco libre, mejorando la respuesta del método en términos de reproducibilidad respecto al tamaño del inmunógeno y la densidad de epítomos.¹⁷²

La información proporcionada por estos estudios sobre los requisitos necesarios para activar las células efectoras, que no pueden deducirse utilizando únicamente el fármaco libre ha sido muy necesaria. De hecho, se sabe poco sobre la naturaleza del aducto que activa a los basófilos en el ensayo. En este contexto, el tamaño de la proteína portadora real, el número de sitios reactivos y la proximidad entre ellos se consideran factores clave que influyen en el proceso de reticulación, siendo su evaluación muy compleja.

Por lo que en este trabajo de tesis se propone el uso de nanopartículas con estructuras DeAns en su superficie, las cuales proporcionarían más control sobre el tamaño del conjugado, la multivalencia y la estructura de los determinantes antigénicos periféricos, permitiendo realizar ensayos más reproducibles. Dando lugar a la interacción óptima entre los restos del fármaco y la IgE específica en la superficie del basófilo, induciendo una degranulación más potente del basófilo y mejorando la sensibilidad de esta técnica.¹⁷²

IV.2. Síntesis de nanopartículas de sílice 50nm y 20nm SiO₂.

En este trabajo nos hemos planteado la síntesis de nanopartículas de sílice de menor tamaño, 50 y 20 nm de diámetro con el fin de valorar la capacidad activar basófilos que presentan ambos tamaños de partículas.

La elección de los tamaños de las nanopartículas se ha decidido en base a estudios de entrecruzamiento de anticuerpos con nanopartículas en mastocitos, procedimiento equivalente a lo que ocurre en el proceso de activación de basófilos. En estos estudios se ha observado que tamaños de nanopartículas entre 20 y 50 nm son suficientes para activar los basófilos.¹⁷³

Se han elegido partículas de sílice, debido a que la citometría de flujo, técnica usada en la detección de basófilos, presenta problemas técnicos de incompatibilidad con las partículas de óxido de hierro.

La síntesis de las nanopartículas de sílice para ensayos de test de activación de basófilos se ha llevado a cabo utilizando el método de Stöber¹³⁰.

◆ Síntesis de partículas de 50 nm.

Para la síntesis de las nanopartículas de 50 nm se han realizado diferentes pruebas hasta llegar al tamaño deseado.

Los factores determinantes en este tipo de síntesis son la proporción entre la cantidad de NH₄OH y TEOS, el volumen final de disolvente, el tiempo de reacción y la temperatura.

En la tabla 10 se muestran las condiciones utilizadas en las diferentes pruebas realizadas para la síntesis de nanopartículas de 50 nm.

Tabla 10. Diferentes pruebas para la síntesis de nanopartículas de 50 nm.

| Nº de prueba | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|------|------|------|------|---------|
| NH ₄ OH (mL) | 0,93 | 0,47 | 0,35 | 0,16 | 12 |
| TEOS (mL) | 3,2 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 4 |
| H ₂ O (mL) | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | - |
| Tiempo de reacción | 16 h | 16 h | 16 h | 16 h | 6 días |
| Temperatura (°C) | 25 | 25 | 25 | 25 | 30 |
| Disolvente | EtOH | EtOH | EtOH | EtOH | EtOHabs |
| V Final Disolvente (mL) | 50 | 50 | 100 | 100 | 114 |
| Tamaño final (nm) | - | 200 | 100 | 50 | 50 |

Cuando se sintetizaron las nanopartículas siguiendo las condiciones establecidas en bibliografía para la prueba 1, se pudo observar que no había formación de partículas.¹⁷⁴

Siguiendo el protocolo de bibliografía establecido en la prueba 2, se observa la formación de partículas, de tamaño heterogéneo, pero con una población mayor de partículas de 200 nm (Figura 65, Prueba 2).¹⁷⁵ En el caso de la prueba 3 se utilizó un protocolo diferente obteniendo unas partículas sin forma definida y de tamaño 100 nm (Figura 65, Prueba 3).¹⁷⁵

Siguiendo las condiciones establecidas para la prueba 4 se obtuvieron partículas de tamaño 50 nm y forma esférica. Sin embargo, este tipo de nanopartículas se obtuvieron como dispersión coloidal. Esta forma de obtención de partícula presenta algunas dificultades a la hora de su posterior manipulación en las reacciones de modificación superficial. Por lo que se planteó el desafío de sintetizar nanopartículas de 50 nm en forma sólida (Figura 65, Prueba 4).¹⁷⁶

Finalmente, con las condiciones de reacción de la prueba se obtuvieron las partículas del tamaño deseado, de forma esférica y sólidas.¹⁷⁷ Estas partículas presentan la ventaja de una manipulación más fácil a la hora de llevar a cabo los procesos de pesada y cambio de disolvente en las diferentes reacciones de modificación superficial posteriores.



Figura 65. Imágenes de TEM de las partículas obtenidas en las diferentes pruebas realizadas en la síntesis de las partículas de 50 nm.

♦ **Síntesis de partículas de 20 nm.**

En el caso de la síntesis de las partículas de 20 nm, y con la experiencia obtenida en la síntesis de las partículas de 50 nm, únicamente se hicieron dos pruebas para llegar al tamaño deseado.

En la tabla 11 se muestran las condiciones utilizadas en las diferentes pruebas realizadas para la síntesis de nanopartículas de 20 nm.

Tabla 11. *Diferentes pruebas para la síntesis de nanopartículas de 20 nm.*

| Nº de prueba | 1 | 2 |
|--------------------------------|----------|----------------|
| NH₄OH (mL) | 0,75 | 0,75 |
| TEOS (mL) | 1 | 0,5 |
| Tiempo de reacción | 16 h | 16 h |
| Temperatura (°C) | 25 | 25 |
| Disolvente | EtOHabs | MeOH/ButOH 4:1 |
| V Final Disolvente (mL) | 100 | 60 |
| Tamaño final (nm) | - | 20 |

Figura 66. *Imágenes de TEM de las partículas obtenidas en las diferentes pruebas realizadas en la síntesis de las partículas de 20 nm.*

Siguiendo el protocolo de síntesis de las nanopartículas siguiendo las condiciones establecidas en la prueba 1, se pudo observar la formación de un sólido blanco.¹⁷⁸

Por lo que para comprobar que las partículas tenían el tamaño deseado se le realizaron imágenes de TEM. Se pudo observar que se habían formado pocas partículas y que tenían un tamaño mayor a 20 nm (Figura 66, prueba 1).

Con las condiciones utilizadas en la prueba 2 se obtuvieron las partículas de forma esférica y homogénea y tamaño 20 nm.¹⁷⁹ Estas partículas se han obtenido en forma de dispersión coloidal (Figura 66, prueba 2).

Las partículas obtenidas se han evaluado mediante diferentes técnicas de caracterización.

◆ Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

El espectro FTIR de las partículas SiO₂ presenta bandas vibracionales características de los enlaces Si-O-Si y Si-OH (1100 $\nu_{\text{asimétricaSi-O-Si}}$, 950 $\nu_{\text{simétricaSi-OH}}$ 795 $\nu_{\text{asimétricaSi-O-Si}}$ cm⁻¹) (Figura 67).¹³²⁻¹³⁴

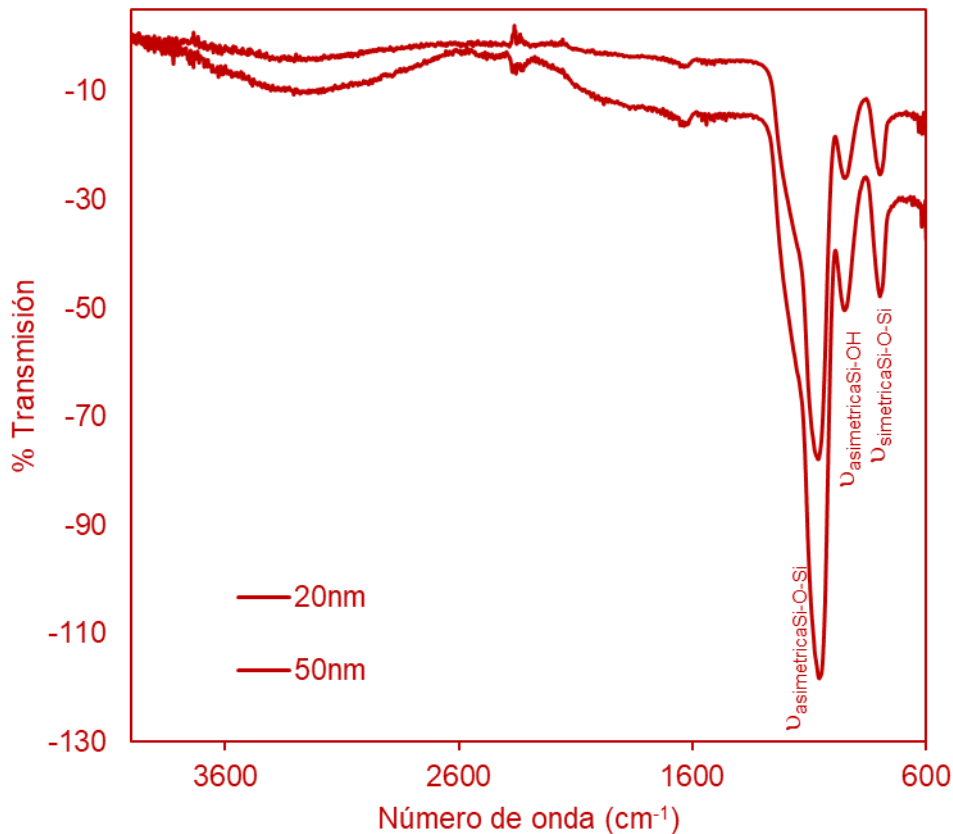


Figura 67. FTIR de las partículas de sílice de 50 y 20nm.

◆ Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las micrografías obtenidas mediante TEM muestran una morfología esférica de las partículas y un diámetro de tamaño 50 y 20 nm (Figura 68 b) y d)).

◆ **Dispersión de luz dinámica (DLS).**

El espectro de DLS presenta una banda a 71 nm en el caso de las partículas de 50 nm y a 30 nm en el caso de las partículas de 20 nm, lo que indica el tamaño deseado y la homogeneidad de las partículas SiO₂ obtenidas (Figura 68 a) y c)). El valor de PDI para las partículas de 50 nm ha sido de 0,30 y 0,24 para las partículas de 20

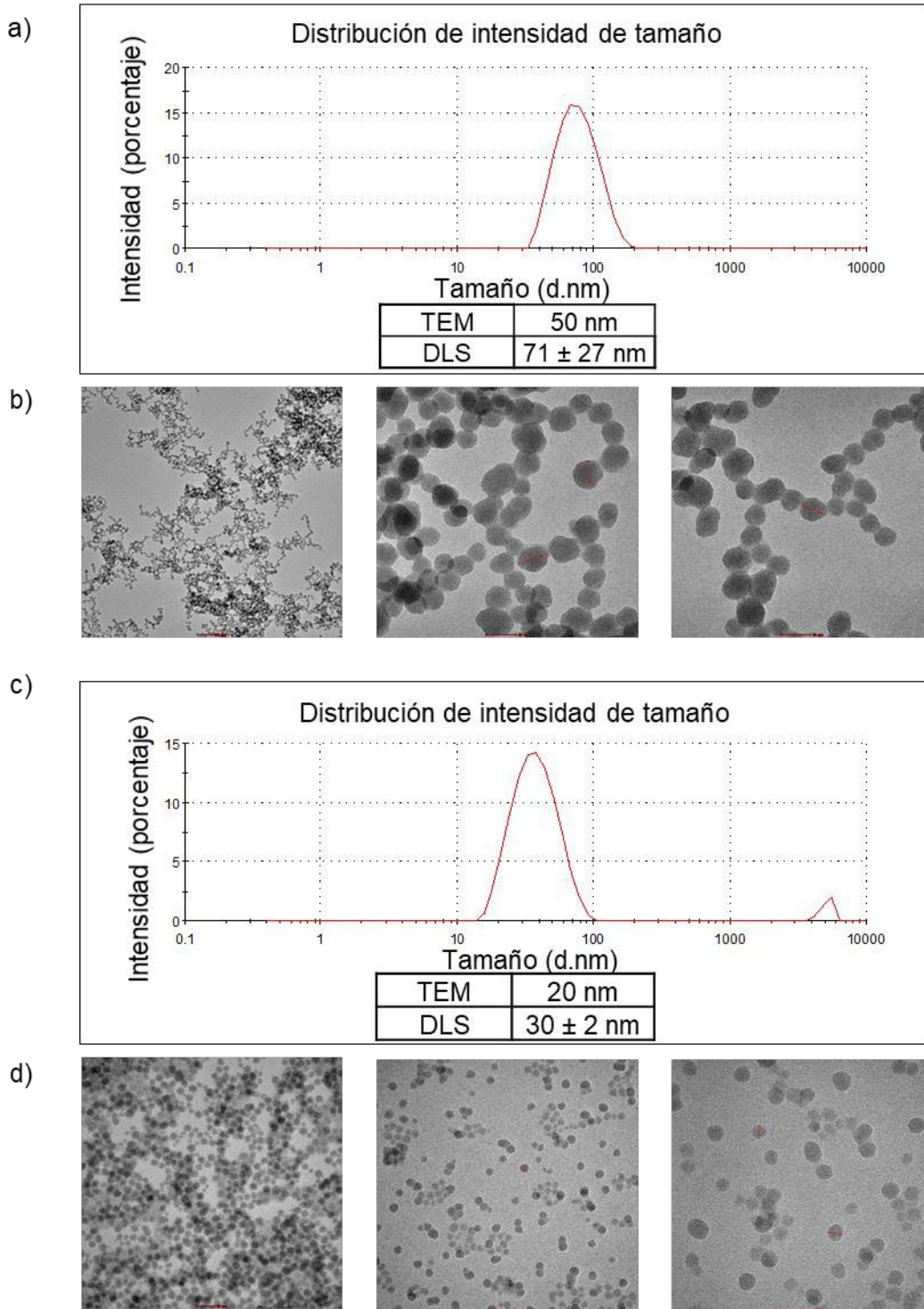


Figura 68. a) DLS de las partículas de sílice de 50 nm, b) TEM de las partículas de sílice de 50 nm, c) DLS de las partículas de sílice de 20 nm, d) TEM de las partículas de sílice de 20 nm.

IV.3. Modificación química de la superficie de las partículas de sílice de 50 y 20 nm, SiO₂-De.

La funcionalización superficial de las nanopartículas se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito en los capítulos anteriores. Se muestra un esquema en la figura 69.

Figura 69. Funcionalización superficial de las partículas de sílice de 50 y 20 nm

IV.4. Funcionalización de las partículas de sílice de 50 y 20nm con el determinante antigénico, DeAn@SiO₂.

Para iniciar los estudios de BAT con nanopartículas, en este trabajo se ha sintetizado un único material (**DeAn@SiO₂**) para cada tamaño de partícula utilizando amoxicilina como β -lactámicos.

Se ha elegido amoxicilina como fármaco, ya que actualmente es el antibiótico más recetado para combatir enfermedades bacterianas y por lo tanto el mayor causante de alergias. Por lo que hay una mayor cantidad de pacientes alérgicos a este antibiótico, y una mayor disponibilidad de sueros para realizar los ensayos.

Para ello se ha hecho reaccionar el material modificado con el dendrímero (SiO₂-De) con amoxicilina, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior, y obteniéndose compuesto final **DeAXO@SiO₂** (Figura 70).

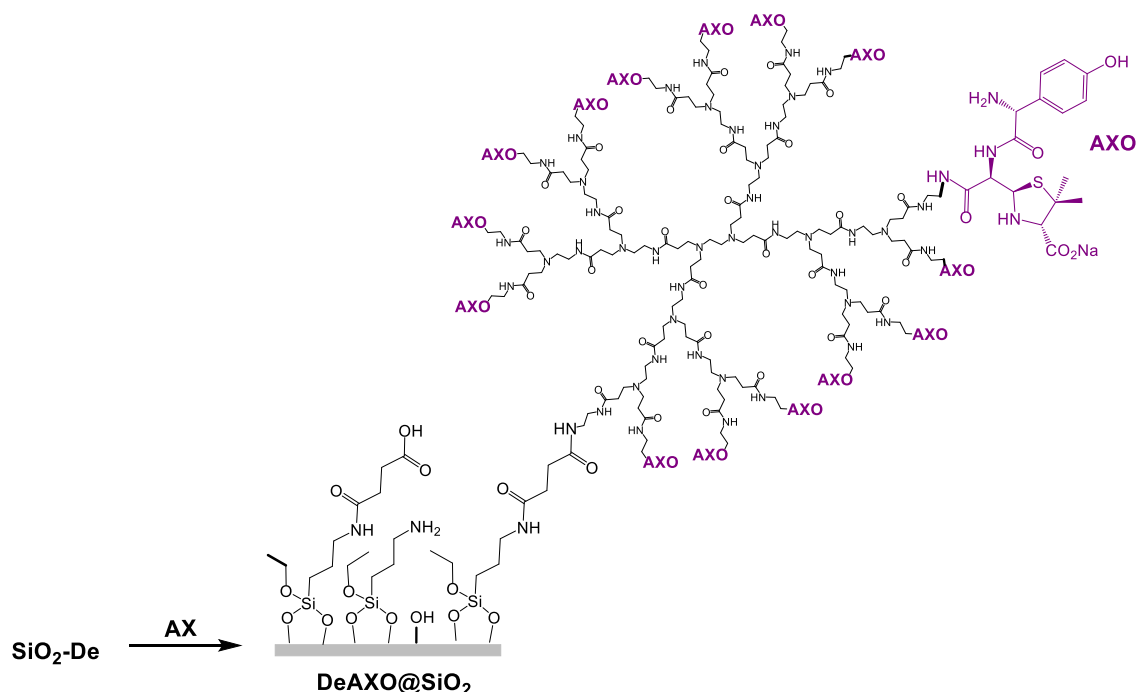


Figura 70. Síntesis de 50 y 20nm DeAXO@SiO₂.

IV.5. Caracterización:

Para llevar a cabo la caracterización de estas partículas se han empleado diferentes técnicas que se detallan a continuación:

◆ Potencial-Z.

Las medidas de Potencial-Z se han utilizado para hacer un seguimiento de cada etapa de funcionalización, mediante el cambio de la carga superficial de la superficie de la partícula ya que se espera que esta cambie en cada etapa, corroborando la modificación química al igual que en el apartado anterior.

Las medidas de Potencial-Z se han realizado por triplicado y en PBS para emular el pH fisiológico.

Se ha podido observar como la tendencia de los valores de potencial-Z de los diferentes pasos de reacción ha sido la esperada para las partículas sintetizadas, siendo estos valores similares en ambos tamaños de partículas (Figura 71 y Tabla 12).

Tabla 12. Potencial-Z de las partículas SiO₂ de 50 y 20nm funcionalizadas

| ξ (mV) | 50 nm | 20 nm |
|-------------------------------------|---------|---------|
| SiO ₂ | -36 ± 4 | -38 ± 4 |
| SiO ₂ -NH ₂ | 34 ± 4 | 20 ± 3 |
| SiO ₂ -CO ₂ H | -29 ± 4 | -25 ± 3 |
| SiO ₂ -De | 40 ± 5 | 43 ± 6 |
| DeAXO@SiO ₂ | -10 ± 3 | -7 ± 2 |

Figura 71. Representación gráfica de los valores de Potencial-Z de las partículas funcionalizadas.

◆ Test de Ninhidrina.

Para llevar a cabo una estimación del grado de funcionalización de las partículas se ha realizado el test de Ninhidrina, y así cuantificar el número de grupos amino primarios libres presentes en la superficie de la misma.¹⁴²

Al igual que en el apartado anterior, previamente a las medidas de la muestra se ha realizado una recta de calibrado con butilamina en medio acuoso en un rango de concentraciones conocidas entre 300 y 900 μ M, siguiendo el mismo protocolo descrito.^{144,145}

Se observa cómo los valores del test de Ninhidrina de las partículas funcionalizadas con APTES, Anhídrido succínico y PAMAM-G2 son coherentes con los valores obtenidos en las partículas sintetizadas en el capítulo anterior (Figura 72 y Tabla 13).

Tabla 13. Valores de Test de Ninhidrina expresados en $\mu\text{mol-NH}_2/\text{g}$ de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ funcionalizadas.

| Partículas | 50 nm | 20 nm |
|------------------------------------|-------|-------|
| $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 194 | 200 |
| $\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 66 | 66 |
| $\text{SiO}_2\text{-De}$ | 270 | 287 |

Figura 72. Representación gráfica de los valores de Test de Ninhidrina las partículas funcionalizadas.

Se ha observado, además, que la cantidad de grupos amino aumenta cuanto menor es el tamaño de partícula cuando la partícula está funcionalizada tanto con APTES y como con PAMAM-G2, hecho que se explica ya que cuanto menor es el tamaño de partícula, mayor es el área superficial por gramo de partícula, lo que se traduce directamente en una mayor cantidad de grupos amino por gramo de partícula en ambos casos.

Asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres al igual que en el apartado anterior, se ha estimado para todos los tamaños de partículas los μmoles de PAMAM-G2 por gramo de partícula de **$\text{SiO}_2\text{-De}$** .

◆ 50 nm SiO₂

En el caso de las partículas de 50 nm SiO₂ el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina expresado en μmol de grupo amino por gramo de partícula, indica la introducción de **194 μmol de grupos amino por gramo** de partículas en ambos casos cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES.

Cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos se detecta una disminución del valor obtenido siendo este **66 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, lo que indica que aproximadamente el 66% de los grupos aminos de la superficie de la partícula reaccionaron con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 128 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas.

Después del acoplamiento covalente del dendrímero PAMAM-G2 sobre la superficie de las partículas, se ha obtenido un valor de **270 μmol de grupos amino por gramo** de partículas funcionalizadas con el dendrímero. Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 66 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 204 μmol NH₂/g de partículas.

***Figura 73.** Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 200 nm en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula*

Esto implica la introducción de 14 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas funcionalizada con dendrímero, asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 11% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 73).

Para estimar la cantidad de amoxicilina anclada covalentemente a la superficie se asume que los 15 grupos amino libre del dendrímero PAMAM-G2 anclado a la superficie de la partícula reaccionan con unidades de fármaco.^{107,125}

Sabiendo la contribución de grupos amino según los cálculos realizados después de obtener el valor del test de ninhidrina en la superficie de la partícula correspondiente al dendrímero (SiO₂-De) es de 204 μmol de -NH₂/g, y asumiendo que los 15 aminos libres del dendrímero reaccionan con la AX, la cantidad de esta anclada covalentemente SiO₂-De será de 204 μmol de AX/g de partícula de **DeAXO@SiO₂**.

♦ **20 nm SiO₂.**

En el caso de las partículas de 20 nm SiO₂ el valor que se ha obtenido del test de Ninhidrina cuando la superficie de la partícula está funcionalizada con APTES es de **200 μmol de grupos amino por gramo** de partículas.

Sin embargo, cuando la superficie está funcionalizada con grupos carboxílicos el valor obtenido es de **66 μmol de grupos amino por gramo** de partículas, por lo que han reaccionado el 67% de los grupos aminos de la superficie con anhídrido succínico y, como consecuencia, se han insertado 134 μmol de unidades carboxílicas por gramo de partículas de SiO₂-CO₂H.

Después de la funcionalización con PAMAM-G2, se ha obtenido un valor de **287 μmol de grupos amino por gramo** de partículas de SiO₂-De.

Teniendo en cuenta que ya estaban presentes 66 μmol de grupos amino por gramo de partículas, los dendrímeros contribuyen con 221 μmolNH₂/g de partículas.

***Figura 74.** Estimación del grado de funcionalización con PAMAM durante el procedimiento de modificación de la superficie de las partículas de 200 nm en base a los valores obtenidos mediante el test de Ninhidrina. Todos los valores están referidos por gramo de partícula.*

Esto implica la introducción de 15 μmol de PAMAM-G2 por gramo de partículas de Fe₃O₄@SiO₂-De, asumiendo que cada PAMAM-G2 posee 15 grupos amino libres, es decir reaccionan aproximadamente el 12% de los grupos carboxílicos de la superficie de la partícula (Figura 74).

De la misma forma la cantidad de amoxicilina anclada covalentemente al dendrímero ha sido de 221 μmol de fármaco/g de partícula de DeAXO@SiO₂ respectivamente

♦ **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).**

El espectro FTIR de las partículas después de la modificación superficial muestra una banda intensa alrededor de 1050 cm⁻¹, característica de los enlaces Si-O (ν_{Si-O}), presente en todos los espectros y, además, aparecen dos nuevos picos en el espectro de SiO₂-De y DeAn-SiO₂.

Estas nuevas bandas, a 1635 y 1540 cm^{-1} , son típicas de los grupos amida ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$ y $\nu_{\text{N-H}}$ respectivamente) y se observan en todas las partículas donde el dendrímero está unido covalentemente (Figura 75). Por lo tanto, se ha podido confirmar la correcta funcionalización de la superficie de las partículas.

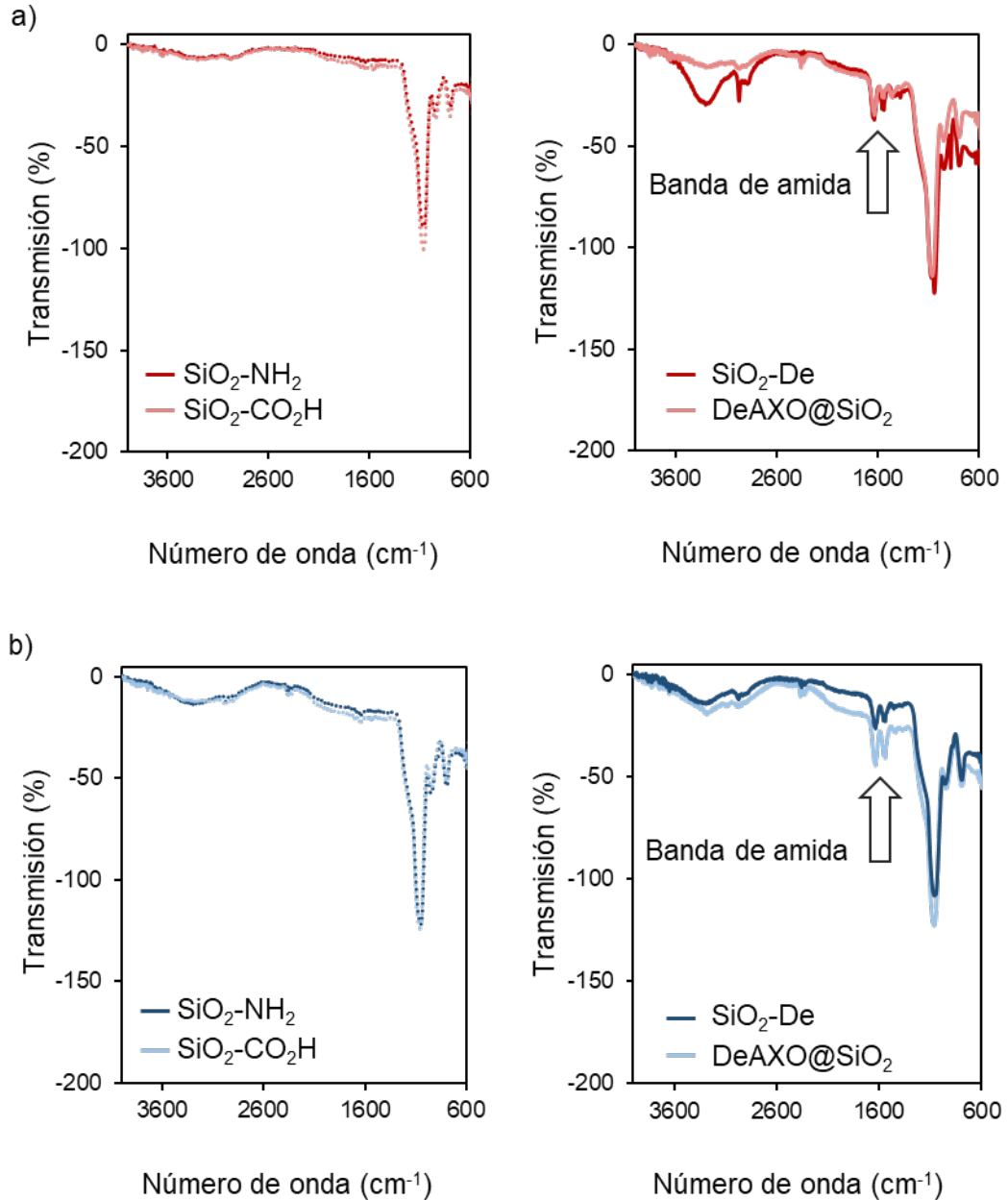


Figura 75. FTIR de las partículas funcionalizadas a) 50 nm SiO_2 , b) 20 nm SiO_2

◆ Resonancia magnética nuclear de sólido (^1H -RMN).

Se ha realizado el espectro de ^1H -RMN de sólido de las partículas DeAXO@SiO_2 de 50 nm al igual que las partículas de sílice del capítulo anterior. Sin embargo, esta técnica no se ha podido usar con las partículas DeAXO@SiO_2 de 20 nm debido a la dificultad de formar una dispersión coloidal de partículas en agua deuterada.

Capítulo IV

Como modelo se ha utilizado el espectro ^1H -RMN del conjugado amoxicilina-butilamina (Bu-AXO).¹⁰¹

En el espectro DeAXO@SiO₂ se han podido observar los picos característicos de la unidad de AXO. Las señales correspondientes al anillo de β -lactama abierto se han observado a 4,94 y 4,32 ppm (H-5 y H-6), respectivamente. Cuando este anillo está cerrado en AX, H-5 y H-6 aparecen alrededor de 5,5 ppm. La ausencia de señal en ese rango del espectro indica que no se ha adsorbido en la superficie de la partícula y que toda está como AXO unida al dendrímero. Son característicos también los picos en la región aromática a 7,34 y 6,89 ppm ya que no existen otras estructuras aromáticas en el material (Figura 76).¹⁴⁷

La presencia del dendrímero PAMAM se ha confirmado en todos los espectros por la señal entre 3,7 y 2,0 ppm, típica de este tipo de dendrímeros.

Figura 76. a) Espectro de ^1H -RMN de DeAXO@SiO₂ (suspendido en D₂O) y b) Conjugado Amoxicilina-Butilamina (Bu-AXO)

En el caso de las partículas de 20 nm no se ha podido obtener un espectro de RMN, pero hay que tener en cuenta que el proceso de funcionalización ha sido el mismo y los datos obtenidos en este proceso de funcionalización son coherentes, siendo el valor de Z-potencial coherente en el caso de la funcionalización con amoxicilina.

Y que, además, la reacción se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de reacción establecido y reproducible para las demás partículas. Se ha podido asumir que la funcionalización del dendrímero de la superficie de la partícula con la amoxicilina ha sido correcta.

Actualmente estas estructuras se están usando para realizar ensayos de test de activación de basófilos en colaboración con el grupo de investigación de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga (HRUM), liderado por la Dra. M.J. Torres.

En este capítulo se ha optimizado tanto la síntesis de partículas de SiO₂ de 50 y 20 nm como el proceso de funcionalización de las mismas con diferentes fármacos (Amoxicilina, Bencilpenicilina). La obtención de estos nanosistemas de forma reproducible ha supuesto un reto importante debido a los problemas de aglomeración que tienen lugar. En este caso, se han obtenido muestras sólidas que pueden ser re-suspendidas fácilmente en medios acuosos, lo que facilita en gran medida su aplicación en ensayos clínicos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.- Se ha diseñado una metodología eficaz y reproducible para la modificación superficial de las partículas de SiO_2 que permite el anclaje covalente de los Dendrimeros-Antigénicos. Este diseño ha permitido la monitorización de las etapas sintéticas empleando técnicas convencionales, así como realizar una estimación cuantitativa del grado de modificación química conseguido.

Los materiales preparados, DeAn@SiO_2 , han sido evaluados por ensayos tipo RAST, mejorando la sensibilidad y selectividad de las técnicas convencionales empleadas en la práctica clínica, sin obtener falsos positivos o negativos que dificultan el diagnóstico.

2.- Se han preparado partículas de Fe_3O_4 de diferentes diámetros de una forma eficaz y reproducible. Estas partículas se han recubierto de una capa de SiO_2 de forma efectiva, permitiendo así su modificación química empleando los protocolos previamente establecidos. Los materiales así preparados, $\text{DeAn@Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, han sido evaluados por ensayos tipo RAST, mejorando considerablemente los tiempos de realización del test. Se ha ampliado considerablemente el número de muestras de suero evaluadas, obteniendo una sensibilidad y selectividad mayor que las técnicas convencionales empleadas en la práctica clínica.

Se han iniciado los ensayos necesarios para la validación clínica del material diseñado con objeto de su traslado a la práctica hospitalaria.

3.- Se han preparado partículas de SiO_2 de 50 y 20 nm de diámetro. Se han modificado superficialmente con Dendrimeros-Antigénicos de manera eficaz y reproducible, con objeto de su aplicación en técnicas de diagnóstico tipo BAT.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO VI EXPERIMENTAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI.1. Reactivos, disolventes y técnicas analíticas.

Los productos químicos se han comprado a Sigma-Aldrich, VWR o Alfa Aesar y se han usado sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Los disolventes se han comprado a VWR. El agua se ha purificado mediante un sistema de purificación Mili-Q de Milipore.

A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones se han realizado al aire. Todas las reacciones que necesitaban condiciones anhidras se han llevado a cabo utilizando técnicas estándar en una atmósfera inerte de argón o nitrógeno sin oxígeno, a menos que se indique lo contrario.

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se han realizado en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología, BIONAND. Las imágenes y las medidas de tamaño y morfología de los materiales sintetizados se han realizado utilizando un microscopio Thermo Fisher Scientific Tecnai G2 20 Twin.

Para las medidas de TEM una gota de 5 μL de una suspensión de 1 mg/mL de partículas en agua Mili-QTM se ha colocado sobre una rejilla de cobre de tamaño de malla 200 cubierta con una película Formvar-Carbon y se ha dejado secar durante 16 horas a temperatura ambiente. No se ha utilizado agente de contraste para estas muestras. El voltaje utilizado ha sido de 120 kilovoltios (Kv) y el haz de electrones ha sido de entre 6 y 8.8 microamperios (μA). Las imágenes digitales se han capturado con una cámara Olympus Veleta de 2k x 2k megapíxeles (MP) o con una cámara Thermo Fisher Scientific Eagle de 4k x 4k MP

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión con espectroscopia de rayos X con energía dispersiva (TEM-EDX) se han realizado en los Servicios Centrales de Investigación (SCAI) en la Universidad de Málaga.

Capítulo VI

Los datos se han obtenido de un microscopio de transmisión (TEM/STEM) FEI Talos F200X con un voltaje de aceleración de 200 Kv y con sistema de microanálisis EDX Super-X.

Los experimentos para determinar el diámetro hidrodinámico y la estabilidad de las partículas en soluciones acuosas se han realizado en un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS90. El instrumento está equipado con un "láser rojo" ($\lambda = 300\text{nm}$) y las medidas se han realizado con un ángulo de detección de 90°C . Las muestras se han preparado suspendiendo 1 mg de las partículas correspondientes en 3 mL de agua Mili-QTM.

Las medidas de potencial Z se han llevado a cabo utilizando una combinación de técnicas electroforéticas y de velocimetría de láser Doppler en un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS90 usando la aproximación de Smoluchowski. Las muestras se han preparado suspendiendo 1 mg de las partículas correspondientes en 3 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Todas las medidas se han realizado por duplicado.

Los espectros infrarrojos (IR) se han registrado utilizando un espectrofotómetro FT/IR JASCO 4100 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) a temperatura ambiente en BIONAND. Las medidas se han llevado a cabo con 5 mg de las correspondientes partículas.

Las medidas de ultravioleta (UV-Visible) se han llevado a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible VARIAN CARY 100BIO en BIONAND.

Los espectros de ^1H -RMN se han adquirido en BIONAND en un espectrómetro Bruker Avance de 600 MHz equipado con una sonda TXI HR-MAS de 4mm utilizando la secuencia zgpr (es decir un pulso de presaturación de baja potencia seguido de un pulso de alta potencia de 90°C). Se han obtenido un total de 32k puntos de datos en 64 escaneos a 25°C a una velocidad de giro de 5kHz. Las muestras se han preparado suspendiendo 20mg de las correspondientes partículas en 600 μL de D_2O y transfiriéndola a un rotor de circonio HR-MAS.

Los datos XPS se han obtenido en los Servicios Centrales de Investigación (SCAI) en la Universidad de Málaga, en un PHI VERSAPROBE II de Physical Electronics con un analizador de electrones hemisférico multicanal. Como fuente de excitación se ha utilizado radiación monocromática $\text{AlK}\alpha$ (1486.6 eV). El área analizada de la muestra ha sido de 100 micrómetros de diámetro. La escala de energía del espectrómetro se ha calibrado utilizando las líneas fotoelectrónicas Cu 2p_{3/2}, Ag 3d_{5/2} y Au 4f_{7/2} a las energías de ligadura (B.E.) 932.7, 368.3 y 84.0 eV, respectivamente. Las muestras se han montado en un porta-muestras con cinta adhesiva y se han mantenido a alto vacío en la cámara de preparación antes de transferirlas a la cámara de análisis. La presión residual en la cámara de análisis se ha mantenido por debajo de 2.0×10^{-7} Pa durante la adquisición de espectros. Los porcentajes de concentración atómica (A.C.%) de los elementos característicos se han determinado a partir de los espectros después de restar un fondo de tipo Shirley, y teniendo en cuenta el factor de sensibilidad del área correspondiente para cada línea fotoelectrónica.

Las medidas de radioactividad del RAST e Inhibición de RAST se han llevado a cabo en un contador gamma Multri Crystal LB 2111 RIA Counter en los servicios centrales a la investigación (SCAI) en la unidad de radioisótopos.

VI.2. Procedimientos generales.

VI.2.1. Test de Ninhidrina: cuantificación de los grupos aminos primarios.

La cuantificación de grupos amino primarios libres presentes en la superficie de la partícula se llevan a cabo mediante el test de Ninhidrina^{100,145,180}.

La disolución de Ninhidrina se prepara disolviendo ninhidrina (300mg) e hidrantina (45mg) en DMSO anhidro (11.25 mL). A continuación, se añade un tampón de acetato de litio 4M en agua a pH= 5.3 (3.75 mL) para finalmente pasar una corriente de N₂ y desoxigenar la disolución.

Las partículas correspondientes (1 mL de una suspensión en agua Mili-Q™ de 3mg/mL) se colocan en un tubo sellado y posteriormente se añade 1 mL de la disolución de ninhidrina previamente preparada. A continuación, se calienta la mezcla a una temperatura de 100°C durante 15 minutos. Posteriormente, se agregan 5 mL de agua/etanol al 50%.

La mezcla de reacción se filtra mediante un filtro de poliamida de 0.20 µm y se mide la absorbancia de la disolución obtenida ($\lambda = 570\text{nm}$; $\epsilon=26416 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con un espectrofotómetro UV-Visible.

Previamente a la realización del protocolo con las partículas se realiza una recta de calibrado siguiendo el mismo protocolo con disoluciones acuosas de n-butilamina en un rango de concentraciones entre 100 y 900 µM. Las medidas se realizan por triplicado en todos los casos.

VI.2.2. Protocolo RAST con partículas.

El protocolo RAST se lleva a cabo en los servicios centrales a la investigación (SCAI) en la unidad de Radiosótopos y en el Hospital Civil de Málaga en la unidad de Alergia.

Para llevar a cabo estos ensayos, se pesan 2mg de partículas funcionalizadas con el determinante antigénico a estudiar y se resuspenden en 20 µL de PBS 1X. Posteriormente se añaden 30 µL del suero del paciente y se agita durante 24h en una cámara húmeda. Pasado este tiempo se lavan las partículas con una disolución de PBS 1X Tween 80 al 0.05% (x 3 veces) y se añaden 25 µL del antianticuerpo marcado con I¹²⁵ dejándolo en agitación durante 24h en cámara húmeda. Finalmente, se lavan las partículas con la disolución de PBS 1X Tween 80 al 0.05% (x 3 veces), y se mide la radioactividad en un contador gamma.

VI.2.3. Protocolo Inhibición de RAST con partículas.

El protocolo de inhibición de RAST se lleva a cabo en los servicios centrales a la investigación (SCAI) en la unidad de Radiosótopos y en el Hospital Civil de Málaga en la unidad de Alergia.

Para llevar a cabo estos ensayos, se introducen 15µL del inhibidor y 30µL del suero del paciente en el tubo de ensayo y se incuban durante 24 horas en una cámara húmeda. Posteriormente, se añaden las partículas funcionalizadas con el determinante antigénico (2 mg/20 µL de PBS 1X) y se incuban durante otras 24h en la cámara húmeda. Pasado este tiempo se lavan las partículas con una disolución de PBS 1X Tween 80 al 0.05% (x 3 veces) y se añaden 25 µL del anticuerpo marcado con I¹²⁵ dejándolo en agitación durante 24h. Finalmente, se lavan las partículas con la disolución de PBS 1X Tween 80 al 0.05% (x 3 veces), y se mide la radioactividad en un contador gamma.

VI.2.4. Protocolo de marcaje del anticuerpo I¹²⁵.

El protocolo de marcaje del anticuerpo se lleva a cabo en los servicios centrales a la investigación (SCAI) en la unidad de Radiolsótopos.

Para llevar a cabo el marcaje se diluye a 1mg/ml una mezcla de 2 mAB anti-IgE humana proporcionada por Thermo Fisher Scientific iNc (Phadia AB, Uppsala, Suecia) en PBS (pH=7.4). Se prepara una alícuota de 15 mL (15 mg) de la disolución madre y se completa el volumen hasta 45 mL con PBS. La mezcla preparada se añade al fondo de un tubo de yodación prerrevestido Pierce (Thermo Fisher Scientific) inmediatamente después, 2.4 mL (250 mCi) de NaI¹²⁵ (NEZO33A001MC, PerkingElmer, Madrid, España) con concentración 23 mCi/mL y 17 Ci/mg de actividad específica y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo se saca la mezcla del tubo de yodación y se completa el volumen con PBS hasta 500 mL para detener la reacción. Se mantienen 5 mL para medir el máximo como referencia para los cálculos.

Para la purificación de anticuerpos, se utiliza una columna sephadex PD Minitrap G-25 (Ge Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). Se recogen fracciones de 0.5 mL y se mide la radiactividad usando un contador gamma para la identificación de fracciones que contenían IgG radiomarcada. Las fracciones que contienen anticuerpo se combinan y se calcula el rendimiento de yodación, la actividad incorporada y la actividad específica.

VI.3. Síntesis de partículas de sílice y óxido de hierro funcionalizadas con determinantes antigénicos.

Síntesis de partículas de sílice de 200 y 500nm (SiO₂)

Síntesis de partículas de sílice de 500nm SiO₂.

A 55 mL de Etanol absoluto (55 mL, 2 mol) se le añade amoníaco (NH₃, 7.5 mL, 0.32 mmol) y se agita durante 15 minutos. Posteriormente, se añade tetraetilortosilicato (TEOS, 4.5 mL, 22.5 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16h para dar lugar a la reacción de formación de las partículas. Las partículas obtenidas se purifican lavando mediante periodos de centrifugación (15 min, 3500 rpm). Primero con HCl (x 1 vez) y después con Agua Mili-Q™ (x 2 veces). Finalmente obtiene 1 g de partículas de sílice (SiO₂)

Síntesis de partículas de sílice de 200nm-SiO₂.

A una mezcla de etanol absoluto (27 mL) en agua (90 mL, 3,2 mol) se añade amoníaco (NH₃, 5 mL, 0,21 mmol) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente se añade tetraetilortosilicato (TEOS, 2.4 mL, 12 mmol) y se deja agitando en el ultrasonido a temperatura ambiente durante 2h para dar lugar a la reacción de formación de las partículas. Las partículas obtenidas se purifican lavando mediante periodos de centrifugación (15 min, 3500 rpm). Primero con HCl (x 1 vez) y después con Agua Mili-Q™ (x 2 veces). Finalmente se obtiene 1.5 g de partículas de sílice (SiO₂)

Funcionalización de la superficie de 200nm y 500nm-SiO₂.**Funcionalización con grupos amino.**

SiO₂ (1 g) se resuspende en Tolueno (300 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente, se añade 3-(aminopropil)-triétoxosilano (APTES, 1 mL, 4.2 mmol), y se deja agitando en el ultrasonido una hora más. Por último, se añade un exceso de APTES (1 mL, 4.2 mmol) y se agita a temperatura de reflujo durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con tolueno (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm). Finalmente se liofiliza para obtener las partículas amino-funcionalizadas en estado sólido (SiO₂-NH₂).

Funcionalización con grupos ácido carboxílico.

Las partículas amino-funcionalizadas (SiO₂-NH₂, 900 mg), se resuspenden en dimetilformamida (DMF, 33 mL) y se deja agitando en el ultrasonido 15 minutos. Posteriormente, se añade anhídrido succínico (2.30 g, 22.9 mmol) disuelto en DMF (17 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más. Por último, se añade trietilamina (TEA, 286 µL, 2.5 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas carboxi-funcionalizadas (SiO₂-CO₂H).

Funcionalización con dendrímeros PAMAM-G2.

A las partículas funcionalizadas con grupos carboxilos (SiO₂-COOH, 800 mg) se les añade 1-(3-(dimetilamino) propil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreuro (EDCI, 276mg, 1.4 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 320 mg, 2.8 mmol) disueltos en dimetil-formamida anhidra (DMF, 13mL). La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos, para añadir posteriormente el dendrímero PAMAM-G2 (137 mg, 0.04 mmol) disuelto en DMF anhidra (12 mL). Esta mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas dendrímero-funcionalizadas (SiO₂-De).

Funcionalización de las partículas de 500nm SiO₂-De con antibióticos β-lactámicos (BLs).

Las partículas funcionalizadas con dendrímeros (500nmSiO₂-De, 150mg) se resuspenden en 4mL de una disolución acuosa 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH=10.2, 10mg/mL del correspondiente antibiótico (AX y BP) o de la mezcla 1:1 de ambos. La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos y se agita a una temperatura de 4°C durante 7 días, añadiendo cada 24 horas 10 mg del correspondiente BL. Las partículas obtenidas se lavan con PBS 1X (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas antigenodendrímico-funcionalizadas (DeAn@SiO₂).

Funcionalización de las partículas de 200nm SiO₂-De con antibióticos β-lactámicos (BLs).

Las partículas funcionalizadas con dendrímeros (200nm-SiO₂-De, 150mg) se resuspenden en 4mL de una disolución acuosa, 10mg/mL de amoxicilina, 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH=10.2. La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos y se agita a una temperatura de 4°C durante 7 días, añadiendo cada 24 horas 10 mg de amoxicilina. Las partículas obtenidas se lavan con PBS 1X (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas antigenodendrímico-funcionalizadas (200nmDeAn@SiO₂).

Síntesis de partículas magnéticas de 200, 50, 30 y 15nm (Fe₃O₄).

Síntesis de 200nm Fe₃O₄.

En un autoclave se añade etilenglicol (EG, 80 mL) y cloruro de hierro hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 2.7g, 10 mmol) agitando durante 15 minutos. Posteriormente se añade acetato sódico (NaOAC, 7.2g, 87.7 mmol) y polietilenglicol (PEG, 2g, 0.5 mmol). Se cierra el autoclave y se calienta a una temperatura de 200°C durante 16 horas. Las partículas obtenidas se purifican lavando con Agua Mili-Q™ (x 4 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente se obtienen 800 mg de partículas de hierro (Fe₃O₄).

Síntesis de 50nm Fe₃O₄.

En un autoclave se añade etilenglicol (EG, 80 mL) y cloruro de hierro hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 1.06g, 3.94 mmol) agitando durante 15 minutos. Posteriormente se añade acetato sódico (NaOAC, 5.25g, 64 mmol) y agua (H₂O, 5.4g, 300 mmol) Se cierra el autoclave y se calienta a una temperatura de 200°C durante 16 horas. Las partículas obtenidas se purifican lavando con Agua Mili-Q™ (x 4 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente se obtienen 600 mg de partículas de hierro (Fe₃O₄).

Síntesis de 30nm Fe₃O₄.

En un autoclave se añade etilenglicol (EG, 80 mL) y cloruro de hierro hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 0.79 g, 2.93 mmol) agitando durante 15 minutos. Posteriormente se añade acetato sódico (NaOAC, 5.25g, 64 mmol) y agua (H₂O, 5.4g, 300 mmol) Se cierra el autoclave y se calienta a una temperatura de 200°C durante 16 horas. Las partículas obtenidas se purifican lavando con Agua Mili-Q™ (x 4 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente se obtienen 500 mg de partículas de hierro (Fe₃O₄).

Síntesis de 15nm Fe₃O₄.

En un autoclave se añade etilenglicol (EG, 80 mL) y cloruro de hierro hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 0.53 g, 1.97 mmol) agitando durante 15 minutos. Posteriormente se añade acetato sódico (NaOAC, 5.25g, 64 mmol) y agua (H₂O, 5.4g, 300 mmol) Se cierra el autoclave y se calienta a una temperatura de 200°C durante 16 horas. Las partículas obtenidas se purifican lavando con Agua Mili-Q™ (x 4 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente se obtienen 300 mg de partículas de hierro (Fe₃O₄).

Síntesis de 200, 50, 30 y 15nm Fe₃O₄-SiO₂.**Síntesis del recubrimiento de sílice de Fe₃O₄.**

Fe₃O₄ (0,5 g) se deja agitando en el ultrasonido durante 5 minutos en una mezcla de etanol absoluto (45 mL), agua Milli-Q™ (15 mL) y amoniaco (NH₃, 1.25 mL) para resuspender las partículas. Posteriormente, se añade gota a gota y mediante agitación una disolución de TEOS (0.5 mL, 2.5 mmol) en etanol absoluto (15 mL). La reacción se deja a temperatura ambiente durante 16h. Las partículas obtenidas se purifican lavando con Agua Mili-Q™ (x 4 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente se obtienen 400 mg de partículas de hierro cubiertas por una capa de sílice (Fe₃O₄-SiO₂).

Funcionalización de la superficie de 200, 50, 30 y 15nm Fe₃O₄-SiO₂.**Funcionalización con grupos amino.**

Fe₃O₄@SiO₂ (350 mg) se resuspende en Tolueno (20 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente, se añade 3-(aminopropil)-triethoxisilano (APTES, 1.75 mL, 7.4 mmol), y se deja agitando en el ultrasonido durante una hora. Por último, se añade un exceso de APTES (1 mL, 4.2 mmol) y se agita a temperatura de reflujo de tolueno durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con tolueno (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente, se obtienen las partículas amino-funcionalizadas (Fe₃O₄-SiO₂-NH₂).

Funcionalización con grupos ácido carboxílico.

Las partículas amino-funcionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$, 300 mg), se resuspenden en dimetil-formamida (DMF, 11 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente se añade anhídrido succínico (660 mg, 6.6 mmol) disuelto en DMF (11 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más. Por último, se añade Trietilamina (TEA, 96 μL , 0.84 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente, se obtienen las partículas carboxi-funcionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$).

Funcionalización con dendrímeros PAMAM-G2.

A las partículas funcionalizadas con grupos carboxilos ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$, 250 mg) se le añade 1-(3-(dimetilamino) propyl)-3-etilcarbodiimida hidrocioruro (EDCI, 86.2 mg, 0.44mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 100 mg, 0.87 mmol) disuelto en DMF anhidra (4 mL). La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente, se añade el dendrímero PAMAM-G2 (42.8 mg, 1.3×10^{-2} mmol) disuelto en DMF anhidra (4mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más. Por último, se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente, se obtienen partículas dendrímero-funcionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$).

Funcionalización con antibióticos β -lactámicos (BLs).

Las partículas funcionalizadas con dendrímeros ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$, 150mg) se resuspenden en 4mL una disolución acuosa 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ a pH=10.2, 10mg/mL del correspondiente antibiótico. La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos y se agita a una temperatura de 4°C durante 7 días, añadiendo cada 24 horas 10 mg del correspondiente BL. Las partículas obtenidas se lavan con PBS 1X (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante procesos de imantación. Finalmente, se obtienen las partículas antígenodendrímérico-funcionalizadas ($\text{DeAn}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$).

Síntesis de nanopartículas de 50 y 20nm sílice (SiO_2).

Síntesis de partículas de sílice 50nm- SiO_2 .

A 114 mL de Etanol absoluto (114 mL) se le añade hidróxido amónico (NH_4OH , 7.12 mL) y se calienta a una temperatura de 50°C durante 6 h en agitación. Posteriormente se añade tetraetil ortosiliceto (TEOS, 4 mL, 20 mmol) y se baja la temperatura a 30°C. La disolución se agita a 30°C durante 6 días para dar lugar a la reacción de formación de las partículas. Las partículas obtenidas se purifican lavando mediante periodos de centrifugación (40 min, 6500 rpm), con HCl (x 1vez) y con Agua Mili-Q™ (x 2 veces). Finalmente se liofiliza para obtener 800 mg de partículas de sílice (SiO_2)

Funcionalización de la superficie de 50nm-SiO₂.

Funcionalización con grupos amino.

SiO₂ (800 mg) se resuspende en Tolueno (240 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente, se añade 3-(aminopropil)-triétoxissilano (APTES, 3.2 mL, 13.4 mmol), y se deja agitando en el ultrasonido durante una hora más. Por último, se añade un exceso de APTES (1 mL, 4.2 mmol) y se agita a temperatura de reflujo de tolueno durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con tolueno (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (40 min, 6500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas amino-funcionalizadas (SiO₂-NH₂).

Funcionalización con grupos ácido carboxílico.

Las partículas amino-funcionalizadas (SiO₂-NH₂, 750 mg), se resuspenden en dimetilformamida (DMF, 19 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente se añade anhídrido succínico (1.72 g, 16.9mmol) disuelto en DMF (28 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más. Por último, se añade Trietilamina (TEA, 216 µL, 1.8 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (40 min, 6500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas carboxi-funcionalizadas (SiO₂-CO₂H).

Funcionalización con dendrímeros PAMAM-G2.

A las partículas funcionalizadas con grupos carboxilos (SiO₂-CO₂H, 600 mg) se les añade 1-(3-(dimetilamino) propil)-3-etilcarbodiimida hidrocioruro (EDCI, 207mg, 1.1mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 240 mg, 2.1 mmol) disuelto en dimetil-formamida anhidra (DMF, 9 mL). La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Posteriormente, se añade el dendrímero PAMAM-G2 (103 mg, 3,1x10⁻² mmol) disuelto en DMF anhidra (9 mL) deja agitando en el ultrasonido ndo durante 15 minutos más. Se agita a temperatura ambiente durante16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (40 min, 6500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas dendrímero-funcionalizadas (SiO₂-De).

Funcionalización con antibióticos β-lactámicos (BLs).

Las partículas funcionalizadas con dendrímeros (50nm-SiO₂-De, 150mg) se resuspenden en 4mL de una disolución acuosa 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH=10.2, 10mg/mL de Amoxicilina. La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos y agita a una temperatura de 4°C durante 7 días, añadiendo cada 24 horas 10 mg de Amoxicilina. Las partículas obtenidas se lavan con PBS 1X (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (40 min, 6500 rpm). Finalmente, se liofiliza para obtener las partículas antigenodendrimérico-funcionalizadas (DeAn@SiO₂).

Síntesis de partículas de sílice 20nm-SiO₂.

A una mezcla de metanol y butanol 4:1 (60 mL) se le añade hidróxido amoniaco (NH₃, 0.75 mL) y se agita durante 15 minutos. Posteriormente se añade tetraetil ortosiliceto (TEOS,

0.5 mL, 2.5 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16h para dar lugar a la reacción de formación de las partículas. Las partículas obtenidas se purifican lavando mediante periodos de centrifugación (25 min, 3500 rpm), con HCl (x 1 vez) y con Agua Milli-Q™ (x 2 veces). Finalmente se obtienen 300 mL (750 mg) de una dispersión coloidal de partículas de sílice en agua (SiO₂)

Funcionalización de la superficie de 20nm-SiO₂.

Funcionalización con grupos amino.

A SiO₂ (120 mL, 300 mg) se le añade Tolueno (120 mL) y se centrifuga para cambiar el disolvente. Este paso se realiza 3 veces para retirar todos los restos de agua obteniendo así una dispersión coloidal de partículas en Tolueno. Posteriormente, se añade Tolueno (300 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se añade 3-(aminopropil)-triethoxisilano (APTES, 1.2 mL, 5 mmol), y se deja agitando en el ultrasonido durante una hora más. Finalmente se añade un exceso de APTES (1 mL, 4.2 mmol) y se agita a temperatura de reflujo de tolueno durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con tolueno (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (20 min, 6500 rpm) para obtener la dispersión coloidal de partículas aminofuncionalizadas (SiO₂-NH₂).

Funcionalización con grupos ácido carboxílico.

A las partículas aminofuncionalizadas (SiO₂-NH₂, 100mL, 250 mg), se les añade DMF (100 mL) y se centrifugan para cambiar el disolvente. Este paso se realiza 3 veces para retirar todos los restos de agua obteniendo así una dispersión de partículas en DMF. Posteriormente, se añade DMF (33 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añade anhídrido succínico (800mg g, 7.9 mmol) disuelto en DMF (13 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más. Finalmente, se añade Trietilamina (TEA, 100 µL, 0.8 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (20 min, 6500 rpm) para obtener la dispersión coloidal de partículas carboxi-funcionalizadas (SiO₂-COOH).

Funcionalización con dendrímeros PAMAM-G2.

A las partículas funcionalizadas con los grupos carboxilos (SiO₂-CO₂H, 80mL, 200 mg) se les añade DMF anhidro (80mL) y se centrifuga para cambiar el disolvente. Este paso se realiza 3 veces para retirar todos los restos de agua obteniendo así una dispersión de partículas en DMF anhidro. Posteriormente, se pasa una corriente de argón durante 10 minutos y se añade 1-(3-(dimetilamino) propil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreuro (EDCI, 70mg, 0.4mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 80 mg, 0.7mmol) disuelto en DMF anhidra (10mL). La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos. Finalmente, se añade el dendrímero PAMAM-G2 (35 mg, 1.7x10⁻³ mmol) disuelto en DMF anhidra (10 mL) y se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos más, para dejar agitando posteriormente a temperatura ambiente durante 16 horas. Las partículas obtenidas se lavan con DMF (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (20 min, 6500 rpm) para obtener la dispersión coloidal de partículas dendrímero-funcionalizadas (SiO₂-De).

Funcionalización con antibióticos β -lactámicos (BLs).

A las partículas funcionalizadas con dendrímero (20nm-SiO₂-De, 60mL, 150 mg) se les añade una disolución tampón 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH=10.2 (60mL) y se centrifuga para cambiar el disolvente. Este paso se ha realizado 3 veces para retirar todos los restos de agua obteniendo así una dispersión de partículas en tampón Na₂CO₃/NaHCO₃. Posteriormente se añade 4mL de una disolución acuosa 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH=10.2, 10mg/mL de amoxicilina. La mezcla se deja agitando en el ultrasonido durante 15 minutos y se agita a una temperatura de 4°C durante 7 días, añadiendo cada 24 horas 10 mg de amoxicilina. Las partículas obtenidas se lavan con PBS 1X (x 3 veces) y con agua Milli-Q™ (x 3 veces) mediante centrifugación (20 min, 6500 rpm) para obtener la dispersión coloidal de partículas antigenodendrimérico-funcionalizadas (DeAn@SiO₂).

VI.4. Cálculos.

Recta de calibrado del Test de Ninhidrina para las partículas SiO₂ de 500 nm funcionalizadas.

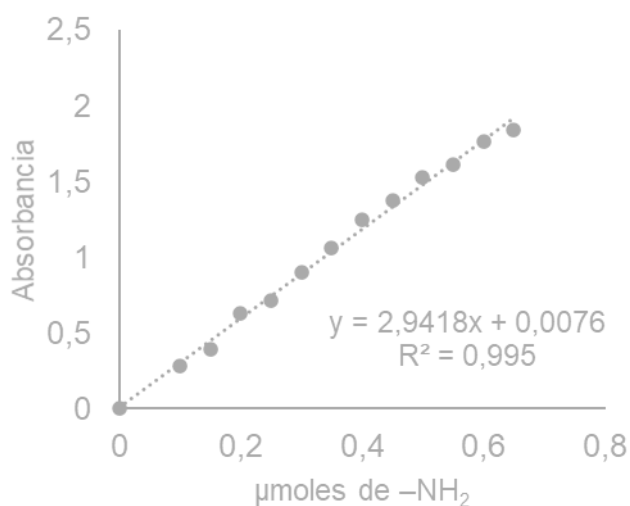


Figura 77. Recta de calibrado con butilamina en disolución acuosa entre las concentraciones 0 y 600 μM siguiendo el protocolo de Test de Ninhidrina.

Tabla 14. Valores de la recta de calibrado del test de Ninhidrina realizado con butilamina para las partículas SiO₂.

| µmoles de -NH₂ | Absorbancia |
|----------------------------------|--------------------|
| 0 | 0 |
| 0,1 | 0,283 |
| 0,15 | 0,393 |
| 0,2 | 0,632 |
| 0,25 | 0,713 |
| 0,3 | 0,896 |
| 0,35 | 1,058 |
| 0,4 | 1,250 |
| 0,45 | 1,376 |
| 0,5 | 1,523 |
| 0,55 | 1,609 |
| 0,6 | 1,760 |
| 0.65 | 1,840 |

Los datos de absorbancia que obtienen después de medir las tres muestras donde se ha formado el complejo de Ruherman para las partículas SiO₂-NH₂, SiO₂-COOH y SiO₂-De son los siguientes (Tabla 15):

Tabla 15. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas SiO₂-NH₂, SiO₂-COOH y SiO₂-De.

| Partículas | Absorbancia | | |
|--|--------------------|-------|-------|
| SiO₂-NH₂ | 1,011 | 1,013 | 1,011 |
| SiO₂-CO₂H | 0,518 | 0,512 | 0,514 |
| SiO₂-De | 1,509 | 1,515 | 1,515 |

Mediante la recta de calibrado y los datos de absorbancia obtenidos, se ha podido calcular los µmoles-NH₂/ g de partículas. Estos datos han sido los resultantes de hacer la media de las tres muestras medidas (Tabla 16).

Tabla 16. Cálculo de µmoles-NH₂/ g de partículas mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado

| Concentración | SiO₂-NH₂ | SiO₂-CO₂H | SiO₂-De |
|--|---------------------------------------|--|---------------------------|
| µmoles-NH₂/ 3 mg de partículas | 0.341 | 0.173 | 0.510 |
| µmoles-NH₂/ mg de partículas | 0.113 | 0.05 | 0.170 |
| µmoles-NH₂/ g de partículas | 113 | 57 | 170 |

Estimación de la cantidad de PAMAM-G2 por superficie (nm²) de SiO₂ de 500 nm.

Densidad de SiO₂ (**d**): 2.2 g/cm³

Radio de una esfera (**r**): 250 nm

Volumen de una esfera ($4/3\pi r^3$); $V = 4/3\pi (250 \text{ nm})^3 = 65,4 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$

Masa de una esfera ($d=m/V$): $M = 2,2 \cdot 10^{-21} \text{ g/nm}^3 \times 65,4 \cdot 10^6 \text{ nm}^3 = 1,4 \cdot 10^{-13} \text{ g}$

Área de una esfera ($4\pi r^2$); $A = 4\pi (250 \text{ nm})^2 = 78,5 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$

Número de partícula por gramo de muestra de SiO₂:

$1 \text{ g} \times 1 \text{ esfera} / 1,4 \cdot 10^{-13} \text{ g} = 6,9 \cdot 10^{12} \text{ esferas} \Rightarrow 6,9 \cdot 10^{12} \text{ esferas/g partículas de SiO}_2$

Superficie por gramo de SiO₂:

$78,5 \cdot 10^4 \text{ nm}^2/\text{esfera} \times 6,9 \cdot 10^{12} \text{ esferas} = 5,5 \cdot 10^{18} \text{ nm}^2 \Rightarrow 5,5 \cdot 10^{18} \text{ nm}^2/\text{g Partículas de SiO}_2$
(aproximadamente 6 m²/g Partículas de SiO₂)

$113 \mu\text{mol NH}_2 \times 1 \mu\text{mol PAMAM-G2} / 15 \mu\text{mol grupos amino} = 7,5 \mu\text{mol PAMAM-G2}$

Se ha podido estimar la presencia 7,5 μmol PAMAM-G2/g de partícula de **SiO₂-De** y, por tanto:

$7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol PAMAM-G2} \times 6,023 \cdot 10^{23} \text{ dendrímeros PAMAM-G2/mol} = 4,5 \cdot 10^{18} \text{ moléculas de PAMAM-G2}$

Por consiguiente:

$4,5 \cdot 10^{18} \text{ moléculas PAMAM-G2/g de partículas de SiO}_2 \times 1 \text{ g de partículas de SiO}_2 / 5,5 \cdot 10^{18} \text{ nm}^2 = 0,82 \text{ moléculas de PAMAM-G2/ nm}^2$. Alrededor de 1 PAMAM-G2/ nm².

Recta de calibrado del Test de Ninhidrina para todos los tamaños de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ funcionalizadas.

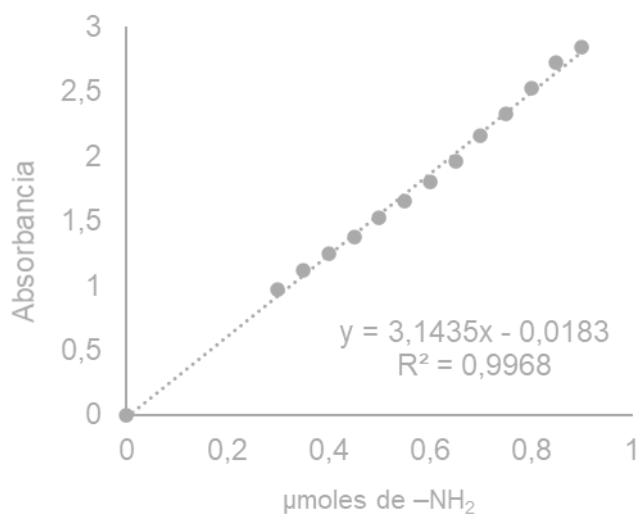


Figura 78. Recta de calibrado con butilamina en disolución acuosa entre las concentraciones 0 y 900 μM siguiendo el protocolo de Test de Ninhidrina.

Tabla 17. Valores de la recta de calibrado del test de Ninhidrina realizado con butilamina para todos los tamaños de partícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ y de 50 y 20 nm de SiO_2 .

| μmoles de -NH ₂ | Absorbancia |
|----------------------------|-------------|
| 0 | 0 |
| 0,3 | 0,973 |
| 0,35 | 1,121 |
| 0,4 | 1,250 |
| 0,45 | 1,376 |
| 0,5 | 1,523 |
| 0,55 | 1,659 |
| 0,6 | 1,800 |
| 0,65 | 1,965 |
| 0,7 | 2,156 |
| 0,75 | 2,333 |
| 0,8 | 2,533 |
| 0,85 | 2,724 |
| 0,9 | 2,846 |

Los datos de absorbancia que se obtienen después de medir las tres muestras donde se ha formado el complejo de Ruherman para todos los tamaños de partícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$ son los siguientes (Tablas 18, 19, 20 y 21):

Tabla 18. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas de 200 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 200 nm | Absorbancia | | |
|---|-------------|-------|-------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,056 | 1,056 | 1,050 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,512 | 0,512 | 0,524 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$ | 1,820 | 1,820 | 1,820 |

Tabla 19. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas de 50 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 50 nm | Absorbancia | | |
|---|-------------|-------|-------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,720 | 1,720 | 1,722 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,591 | 0,585 | 0,584 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$ | 2,460 | 2,460 | 2,460 |

Tabla 20. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas de 30 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 30 nm | Absorbancia | | |
|---|-------------|-------|-------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,749 | 1,749 | 1,742 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,571 | 0,565 | 0,564 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$ | 2,530 | 2,530 | 2,530 |

Tabla 21. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas de 15 nm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 15 nm | Absorbancia | | |
|---|-------------|-------|-------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,829 | 1,824 | 1,829 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,551 | 0,555 | 0,554 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{C}\text{SiO}_2\text{-De}$ | 2,600 | 2,605 | 2,600 |

Mediante la recta de calibrado y los datos de absorbancia obtenidos, se ha podido calcular los $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas. Estos datos han sido los resultantes de hacer la media de las tres muestras medidas (Tablas 22,23,24 y 25).

Tabla 22. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas de 200 nm mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado.

| 200 nm | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$ |
|---|--|--|--|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,341 | 0,168 | 0,573 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,113 | 0,057 | 0,191 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 113 | 57 | 191 |

Tabla 23. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas de 50 nm mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado

| 50 nm | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$ |
|---|--|--|--|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,553 | 0,188 | 0,788 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,184 | 0,062 | 0,262 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 184 | 62 | 262 |

Tabla 24. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas de 30 nm mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado

| 30 nm | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$ |
|---|--|--|--|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,562 | 0,180 | 0,810 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,187 | 0,062 | 0,270 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 187 | 62 | 270 |

Tabla 25. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas de 15 nm mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado

| 15 nm | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-De}$ |
|---|--|--|--|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,587 | 0,185 | 0,832 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,195 | 0,062 | 0,277 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 195 | 62 | 277 |

Recta de calibrado del Test de Ninhidrina para las partículas SiO₂ de 50 y 20 nm funcionalizadas.

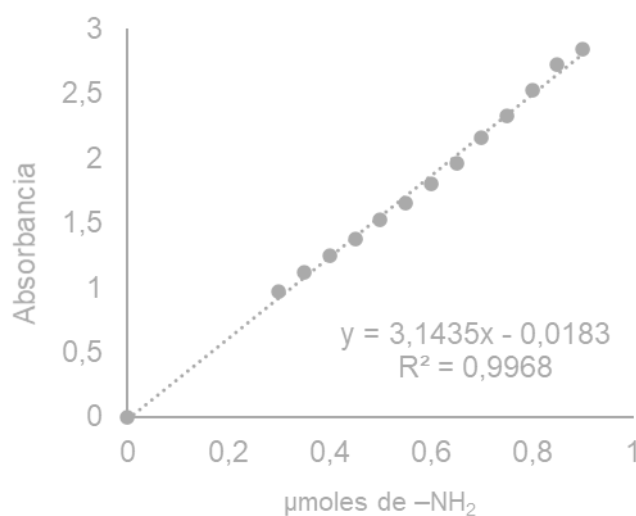


Figura 79. Recta de calibrado con butilamina en disolución acuosa entre las concentraciones 0 y 600 μM siguiendo el protocolo de Test de Ninhidrina.

Tabla 26. Valores de la recta de calibrado del test de Ninhidrina realizado con butilamina para todos los tamaños de partícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y de 50 y 20 nm de SiO_2 .

| $\mu\text{moles de } -\text{NH}_2$ | Absorbancia |
|------------------------------------|-------------|
| 0 | 0 |
| 0,3 | 0,973 |
| 0,35 | 1,121 |
| 0,4 | 1,250 |
| 0,45 | 1,376 |
| 0,5 | 1,523 |
| 0,55 | 1,659 |
| 0,6 | 1,800 |
| 0,65 | 1,965 |
| 0,7 | 2,156 |
| 0,75 | 2,333 |
| 0,8 | 2,533 |
| 0,85 | 2,724 |
| 0,9 | 2,846 |

Los datos de absorbancia que se obtienen después de medir las tres muestras donde se ha formado el complejo de Ruherman para ambos tamaños de partículas de $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ y $\text{SiO}_2\text{-De}$ son los siguientes (Tabla 27 y 28):

Tabla 27. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ y $\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 50 nm | Absorbancia | | |
|------------------------------------|-------------|-------|-------|
| $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,810 | 1,816 | 1,820 |
| $\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,602 | 0,615 | 0,614 |
| $\text{SiO}_2\text{-De}$ | 2,570 | 2,570 | 2,560 |

Tabla 28. Datos de absorbancia obtenidos mediante test de Ninhidrina de las partículas $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ y $\text{SiO}_2\text{-De}$.

| 20 nm | Absorbancia | | |
|------------------------------------|-------------|-------|-------|
| $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 1,880 | 1,870 | 1,870 |
| $\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | 0,602 | 0,595 | 0,624 |
| $\text{SiO}_2\text{-De}$ | 2,710 | 2,730 | 2,760 |

Mediante la recta de calibrado y los datos de absorbancia obtenidos, se ha podido calcular los $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas de ambos tamaños de partícula. Estos datos han sido los resultantes de hacer la media de las tres muestras medidas (Tabla 29 y 30).

Tabla 29. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado.

| 50 nm | $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{SiO}_2\text{-De}$ |
|---|----------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,581 | 0,197 | 0,811 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,194 | 0,065 | 0,270 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 194 | 65 | 270 |

Tabla 30. Cálculo de $\mu\text{moles-NH}_2/\text{g}$ de partículas mediante los datos de absorbancia y la recta de calibrado.

| 20 nm | $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | $\text{SiO}_2\text{-CO}_2\text{H}$ | $\text{SiO}_2\text{-De}$ |
|---|----------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| $\mu\text{moles-NH}_2/ 3 \text{ mg}$ de partículas | 0,603 | 0,197 | 0,856 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{mg}$ de partículas | 0,200 | 0,065 | 0,287 |
| $\mu\text{moles-NH}_2/ \text{g}$ de partículas | 200 | 65 | 287 |

CAPITULO VII REFERENCIAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- (1) Alonso Gutiérrez, B.; López Meléndez, A.; Rodríguez Liñan, C.; Lázaro López, D. La Nanotecnología a 40 Años de Su Aparición: Logros y Tendencias. *Ingenierías* **2015**, *18* (66), 13–23.
- (2) Wu, A. R.; Yu, L. There's Plenty of Room at the Bottom of a Cell. *Chem. Eng. Prog.* **2017**, *113* (10).
- (3) Ganguly, S.; Mukhopadhyay, S. K. Nano Science and Nanotechnology: Journey from Past to Present and Prospect in Veterinary Science and Medicine. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *2* (1), 79–83.
- (4) Binnig, G.; Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy. *Surf. Sci.* **1983**, *126* (1–3), 236–244.
- (5) Splinter, R. Action Potential Transmission and Volume Conduction. *Handb. Phys. Med. Biol.* **2010**, *56* (9), 5-1-5–9.
- (6) Whittig, L. D.; Allardice, W. R. X-Ray Diffraction Techniques. *Methods Soil Anal. Part 1 Phys. Mineral. Methods* **2018**, 331–362.
- (7) You, A.; Be, M. A. Y.; In, I.; Contrast, I.; Transmission, I. N. A.; Electron, S.; Scanning, A. S.; Microscope, E. A High-Resolution Scanning Transmission Electron Microscope. **2003**, *5861* (December).
- (8) Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine - Challenge and Perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (5), 872–897.
- (9) Metric, R. Concepts of Nanoparticle Dose Metric and Response Metric. **2007**, *115* (6), 290–294.
- (10) Gómez Garzón, M. Therapeutic Uses of Nanomaterials and Nanoparticles. *Repert. Med. y cirugía* **2019**, *28* (1), 5–11.
- (11) Science, N.; Council, T. National Nanotechnology Initiative: Leading to the Next Industrial Revolution. **2000**.
- (12) Theis, T.; Parr, D.; Binks, P.; Ying, J.; Drexler, K. E.; Schepers, E.; Mullis, K.; Bai, C.; Boland, J. J.; Langer, R.; Dobson, P.; Rao, C. N.; Ferrari, M. Nan'o.Tech.Nol'o.Gy N. *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1* (1), 8–10.
- (13) Elena, M. Biomédica Instituto Nacional de Salud. **2015**, *35* (4).
- (14) Gurwitz, D.; Livshits, G. Personalized Medicine Europe: Health, Genes and Society: Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel, June 19 -21, 2005. *Eur. J. Hum. Genet.* **2006**, *14* (3), 376–380.
- (15) Lin, G. G.; Scott, J. G. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications Jinjun. **2012**, *100* (2), 130–134.
- (16) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660–668.
- (17) Bobo, D.; Robinson, K. J.; Islam, J.; Thurecht, K. J.; Corrie, S. R.; Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines : A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. **2016**. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>.
- (18) Liu, C. H.; Huang, S.; Cui, J.; Kim, Y. R.; Farrar, C. T.; Moskowitz, M. A.; Rosen, B. R.; Liu, P. K. MR Contrast Probes That Trace Gene Transcripts for Cerebral Ischemia in Live Animals. *FASEB J.* **2007**, *21* (11), 3004–3015.

- (19) Sakamoto, J.; Annapragada, A.; Decuzzi, P.; Ferrari, M. Antibiological Barrier Nanovector Technology for Cancer Applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2007**, *4* (4), 359–369.
- (20) Pettit, D. K.; Gombotz, W. R. The Development of Site-Specific Drug-Delivery Systems for Protein and Peptide Biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (8), 343–349.
- (21) Weissig, V.; Pettinger, T. K.; Murdock, N. Nanopharmaceuticals (Part 1): Products on the Market. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 4357–4373. <https://doi.org/10.2147/IJN.S46900>.
- (22) Pokropivny, V. V.; Skorokhod, V. V. Classification of Nanostructures by Dimensionality and Concept of Surface Forms Engineering in Nanomaterial Science. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27* (5-8 SPEC. ISS.), 990–993.
- (23) Biswas, A.; Bayer, I. S.; Biris, A. S.; Wang, T.; Dervishi, E.; Faupel, F. Advances in Top-down and Bottom-up Surface Nanofabrication: Techniques, Applications & Future Prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *170* (1–2), 2–27.
- (24) Iqbal, P.; Preece, J. A.; Mendes, P. M. Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. In *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- (25) Diaz Fernandez, Y. A.; Gschneidner, T. A.; Wadell, C.; Fornander, L. H.; Lara Avila, S.; Langhammer, C.; Westerlund, F.; Moth-Poulsen, K. The Conquest of Middle-Earth: Combining Top-down and Bottom-up Nanofabrication for Constructing Nanoparticle Based Devices. *Nanoscale* **2014**, *6* (24), 14605–14616.
- (26) Shrestha, S.; Yeung, C. M. Y.; Nunnerley, C.; Tsang, S. C. Comparison of Morphology and Electrical Conductivity of Various Thin Films Containing Nano-Crystalline Praseodymium Oxide Particles. *Sensors Actuators, A Phys.* **2007**, *136* (1), 191–198.
- (27) McNeil, S. E. Nanotechnology for the Biologist. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78* (3), 585–594.
- (28) Liu, W. T. Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *102* (1), 1–7.
- (29) Garg, J.; Poudel, B.; Chiesa, M.; Gordon, J. B.; Ma, J. J.; Wang, J. B.; Ren, Z. F.; Kang, Y. T.; Ohtani, H.; Nanda, J.; McKinley, G. H.; Chen, G. Enhanced Thermal Conductivity and Viscosity of Copper Nanoparticles in Ethylene Glycol Nanofluid. *J. Appl. Phys.* **2008**, *103* (7).
- (30) Jain, K. K. Nanotechnology in Clinical Laboratory Diagnostics. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *358* (1–2), 37–54.
- (31) Azzazy, H. M. E.; Mansour, M. M. H.; Kazmierczak, S. C. Nanodiagnosics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine. *Clin. Chem.* **2006**, *52* (7), 1238–1246.
- (32) Azzazy, H. M. E.; Mansour, M. M. H.; Kazmierczak, S. C. From Diagnostics to Therapy: Prospects of Quantum Dots. *Clin. Biochem.* **2007**, *40* (13–14), 917–927.
- (33) Tai, C. Y.; Tai, C.; Chang, M.; Liu, H. Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46* (17), 5536–5541.
- (34) Tiwari, D. K.; Behari, J.; Sen, P. Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment. *World Appl. Sci. J.* **2008**, *3* (3), 417–433.

- (35) Bhaviripudi, S.; Mile, E.; Iij, S. A. S.; Zare, A. T.; Dresselhaus, M. S.; Belcher, A. M.; Kong, J. CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes from Gold Nanoparticle Catalysts. *J. Am. Chem. Soc. Commun.* **2007**, *129* (6), 1516–1517.
- (36) Prasad Yadav, T.; Manohar Yadav, R.; Pratap Singh, D. Mechanical Milling: A Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. *Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *2* (3), 22–48.
- (37) Hulteen, J. C.; Treichel, D. A.; Smith, M. T.; Duval, M. L.; Jensen, T. R.; Van Duyne, R. P. Nanosphere Lithography: Size-Tunable Silver Nanoparticle and Surface Cluster Arrays. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (19), 3854–3863.
- (38) Amendola, V.; Meneghetti, M. Laser Ablation Synthesis in Solution and Size Manipulation of Noble Metal Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (20), 3805–3821.
- (39) Shah, P.; Gavrin, A. Synthesis of Nanoparticles Using High-Pressure Sputtering for Magnetic Domain Imaging. *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, *301*, 118–123.
- (40) Salavati-Niasari, M.; Davar, F.; Mir, N. Synthesis and Characterization of Metallic Copper Nanoparticles via Thermal Decomposition. *Polyhedron* **2008**, *27* (17), 3514–3518.
- (41) Mann, S.; Burkett, S. L.; Davis, S. A.; Fowler, C. E.; Mendelson, N. H.; Sims, S. D.; Walsh, D.; Whilton, N. T. Sol-Gel Synthesis of Organized Matter. *Chem. Mater.* **1997**, *9* (11), 2300–2310.
- (42) Mohammadi, S.; Harvey, A.; Boodhoo, K. V. K. Synthesis of TiO₂ Nanoparticles in a Spinning Disc Reactor. *Chem. Eng. J.* **2014**, *258*, 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.07.042>.
- (43) Jung, O. J.; Kim, S. H.; Cheong, K. H.; Li, W.; Ismat Saha, S. Metallorganic Chemical Vapor Deposition and Characterization of TiO₂ Nanoparticles. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24* (1), 49–54.
- (44) Wegner, K.; Pratsinis, S. E. Flame Synthesis of Nanoparticles. *Chim. Oggi* **2004**, *22* (9), 27–29.
- (45) Kuppusamy, P.; Yusoff, M. M.; Maniam, G. P.; Govindan, N. Biosynthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Derivatives and Their New Avenues in Pharmacological Applications – An Updated Report. *Saudi Pharm. J.* **2016**, *24* (4), 473–484.
- (46) Marsalek, R. Particle Size and Zeta Potential of ZnO. *APCBEE Procedia* **2014**, *9*, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.003>.
- (47) Sharma, V.; Rao, L. J. M. An Overview on Chemical Composition, Bioactivity and Processing of Leaves of Cinnamomum Tamala. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54* (4), 433–448.
- (48) Bzdek, B. R.; Zordan, C. A.; Luther, G. W.; Johnston, M. V. Nanoparticle Chemical Composition during New Particle Formation. *Aerosol Sci. Technol.* **2011**, *45* (8), 1041–1048.
- (49) Zhou, W.; Gao, X.; Liu, D.; Chen, X. Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10575–10636.
- (50) Jain, K. K. Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics. *Clin. Chem.* **2007**, *53* (11), 2002–2009.

- (51) Kim, S.; Pudavar, H. E.; Prasad, P. N. Dye-Concentrated Organically Modified Silica Nanoparticles as a Ratiometric Fluorescent PH Probe by One- and Two-Photon Excitation. *Chem. Commun.* **2006**, No. 19, 2071–2073.
- (52) Clark, H. A.; Hoyer, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. Optical Nanosensors for Chemical Analysis inside Single Living Cells. 1. Fabrication, Characterization, and Methods for Intracellular Delivery of PEBBLE Sensors. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (21), 4831–4836.
- (53) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science (80-.)*. **2005**, *307* (5709), 538–544.
- (54) Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (3), 684–688.
- (55) Klostranec, J. M.; Xiang, Q.; Farcas, G. A.; Lee, J. A.; Rhee, A.; Lafferty, E. I.; Perrault, S. D.; Kain, K. C.; Chan, W. C. W. Convergence of Quantum Dot Barcodes with Microfluidics and Signal Processing for Multiplexed High-Throughput Infectious Disease Diagnostics. *Nano Lett.* **2007**, *7* (9), 2812–2818.
- (56) Duan, L.; Wang, Y.; Li, S. S. C.; Wan, Z.; Zhai, J. Rapid and Simultaneous Detection of Human Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Antibodies Based on a Protein Chip Assay Using Nano-Gold Immunological Amplification and Silver Staining Method. *BMC Infect. Dis.* **2005**, *5*, 1–8.
- (57) Hirsch, L. R.; West, J. L.; Jackson, J. B.; Lee, A.; Halas, N. J. A Rapid, Whole Blood Immunoassay Using Metal Nanoshells. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.* **2003**, *4* (10), 3442–3443.
- (58) Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. Gold Nanoparticles for the Development of Clinical Diagnosis Methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (3), 943–950.
- (59) Zheng, D.; Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Aptamer Nano-Flares for Molecular Detection in Living Cells. *Nano Lett.* **2009**, *9* (9), 3258–3261.
- (60) Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. A Comparison of Different Strategies for the Construction of Amperometric Enzyme Biosensors Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Biochem.* **2005**, *336* (1), 20–27.
- (61) Butler, K. S.; Adolphi, N. L.; Bryant, H. C.; Lovato, D. M.; Larson, R. S.; Flynn, E. R. Modeling the Efficiency of a Magnetic Needle for Collecting Magnetic Cells. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59* (13), 3319–3335.
- (62) Artemov, D.; Mori, N.; Okollie, B.; Bhujwala, Z. M. MR Molecular Imaging of the Her-2/Neu Receptor in Breast Cancer Cells Using Targeted Iron Oxide Nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49* (3), 403–408.
- (63) Unger, E. C. How Can Superparamagnetic Iron Oxides Be Used to Monitor Disease and Treatment? *Radiology*. Radiological Society of North America December 1, 2003, pp 615–616.
- (64) Huo, Q. A Perspective on Bioconjugated Nanoparticles and Quantum Dots. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2007**, *59* (1), 1–10.
- (65) Mayorga, C.; Ebo, D. G.; Lang, D. M.; Pichler, W. J.; Sabato, V.; Park, M. A.; Makowska, J.; Atanaskovic-Markovic, M.; Bonadonna, P.; Jares, E. Controversies in Drug Allergy: In Vitro Testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *143* (1), 56–65.

- (66) Decuyper, I. I.; Mangodt, E. A.; Van Gasse, A. L.; Claesen, K.; Uyttebroek, A.; Faber, M.; Sabato, V.; Bridts, C. H.; Mertens, C.; Hagendorens, M. M.; De Clerck, L. S.; Ebo, D. G. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity Anno 2017: Potentials and Limitations. *Drugs R D* **2017**, *17* (2), 265–278.
- (67) Johansson, S. G. O.; Bieber, T.; Dahl, R.; Friedmann, P. S.; Lanier, B. Q.; Lockey, R. F.; Motala, C.; Ortega Martell, J. A.; Platts-Mills, T. A. E.; Ring, J.; Thien, F.; Van Cauwenberge, P.; Williams, H. C. Revised Nomenclature for Allergy for Global Use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113* (5), 832–836.
- (68) Von Pirquet, C. Allergy Archives. *J Allergy Clin Immunol* **2002**, 722–726.
- (69) Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and M. J. S. Effector mechanisms in allergic reactions - Immunobiology - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27112/> (accessed Jun 22, 2021).
- (70) Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J. *Effector Mechanisms in Allergic Reactions*; Garland Science, 2001.
- (71) Gould, H. J.; Sutton, B. J.; Beavil, A. J.; Beavil, R. L.; McCloskey, N.; Coker, H. A.; Fear, D.; Smurthwaite, L. The Biology of IgE and the Basis of Allergic Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21* (1), 579–628.
- (72) Brand, P. L. P. Allergy Diagnosis: Pros and Cons of Different Tests, Indications and Limitations. *Breathe* **2007**, *3* (4), 345–349.
- (73) World Health Organization. Who Meeting on the Role of the Hospital in International Drug Monitoring. 1969, pp 18–23.
- (74) Syrigou, E.; Syrigos, K.; Saif, M. W. Hypersensitivity Reactions to Oxaliplatin and Other Antineoplastic Agents. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2008**, *8* (1), 56–62.
- (75) Levine, B. B. Immunologic Mechanisms of Penicillin Allergy. *N. Engl. J. Med.* **1966**, *275* (20), 1115–1125.
- (76) Rajan, T. V. The Gell-Coombs Classification of Hypersensitivity Reactions: A Re-Interpretation. *Trends Immunol.* **2003**, *24* (7), 376–379.
- (77) Pichler, W. J. Immune Pathomechanism and Classification of Drug Hypersensitivity. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74* (8), 1457–1471.
- (78) Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J. Exp. Med.* **1936**, *64* (5), 717–722.
- (79) Pirmohamed, M.; Park, B. Adverse Drug Reactions : Role of Enzyme Inhibition and Induction. *Var. Hum. Drug Response* **2009**, 41–53.
- (80) Naisbitt, D. J.; Williams, D. P.; O'Neill, P. M.; Maggs, J. L.; Willock, D. J.; Pirmohamed, M.; Kevin Park, B. Metabolism-Dependent Neutrophil Cytotoxicity of Amodiaquine: A Comparison with Pyronaridine and Related Antimalarial Drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (12), 1586–1595.
- (81) Blanca, M.; Romano, A.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Rodriguez, J.; Demoly, P.; Bousquet, P. J.; Merk, H. F.; Sanz, M. L.; Ott, H.; Atanaskovic, M. Update on the Evaluation of Hypersensitivity Reactions to Betalactams. *Allergy* **2009**, *64* (3), 183–193.
- (82) Aberer, W.; Bircher, A.; Romano, A. Drug Provocation Testing in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity Reactions : General Considerations. *Allergy* **2003**, *58* (1), 854–863.

- (83) van Hage, M.; Hamsten, C.; Valenta, R. ImmunoCAP Assays: Pros and Cons in Allergology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140* (4), 974–977.
- (84) Bousquet J, Chanez P, Chanal I, M. F. Comparison between RAST and Pharmacia CAP System: A New Automated Specific IgE Assay. *J. Allergy Clin. Immunol* **1990**, *85* (6), 1039–1043.
- (85) L. Wide M.D.U Uppsala, H. Bennich M.B., B.Sc. Göterborg, S. G. O. J. M. B. U. Diagnosis of Allergy by an In-Vitro Test for Allergen Antibodies. *Lancet* **1967**, *290* (7526), 1105–1107.
- (86) Ebo, D. G.; Bridts, C. H.; Hagendorens, M. M.; Aerts, N. E.; Clerck, L. S. De; Stevens, W. J. Basophil Activation Test by Flow Cytometry : Present and Future Applications in Allergology. **2008**, *210* (February), 201–210.
- (87) Louis Lteig, L. S. E. The Basics of Penicillin Allergy : What A Clinician Should Know. *Pharmacy* **2019**, *7* (94), 1–7.
- (88) Romano, A.; Mayorga, C.; Torres, J.; Artesani, C.; Suau, R.; Sánchez, F.; Pérez, E.; Venuti, A.; Blanca, M. Immediate Allergic Reactions to Cephalosporins : Cross-Reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *116* (6), 1177–1183.
- (89) Torres, M. J.; Gomez, E.; Canto, G.; Mayorga, C.; Blanca, M. Negativization Rates of IgE Radioimmunoassay and Basophil Activation Test in Immediate Reactions to Penicillins. *Allergy* **2009**, *64* (13), 242–248.
- (90) Doña, I.; Torres, M. J.; Montañez, M. I.; Fernández, T. D. In Vitro Diagnostic Testing for Antibiotic Allergy. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **2017**, *9* (4), 288–298.
- (91) Fernandez, T. D.; Mayorga, C.; Salas, M.; Barrionuevo, E.; Posadas, T.; Ariza, A.; Laguna, J. J.; Moreno, E.; Torres, M. J.; Doña, I.; Montañez, M. I. Evolution of Diagnostic Approaches in Betalactam Hypersensitivity.
- (92) Mayorga, C.; Celik, G.; Rouzaire, P.; Whitaker, P.; Bonadonna, P.; Rodrigues-Cernadas, J.; Vultaggio, A.; Brockow, K.; Caubet, J. C.; Makowska, J.; Nakonechna, A.; Romano, A.; Montañez, M. I.; Laguna, J. J.; Zanoni, G.; Gueant, J. L.; Oude Elberink, H.; Fernandez, J.; Viel, S.; Demoly, P.; Torres, M. J. In Vitro Tests for Drug Hypersensitivity Reactions: An ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group Position Paper. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *71* (8), 1103–1134.
- (93) Yvon, M.; Anglade, P.; Wal, J. M. Binding of Benzyl Penicilloyl to Human Serum Albumin Evidence for a Highly Reactive Region at the Junction of Domains 1 and 2 of the Albumin Molecule. *FEBS Lett.* **1989**, *247* (2), 273–278.
- (94) Yvon, M.; Anglade, P.; Wal, J. M. Identification of the Binding Sites of Benzyl Penicilloyl, the Allergenic Metabolite of Penicillin, on the Serum Albumin Molecule. *FEBS Lett.* **1990**, *263* (2), 237–240.
- (95) Yvon, M.; Wal, J. M. Identification of Lysine Residue 199 of Human Serum Albumin as a Binding Site for Benzylpenicilloyl Groups. *FEBS Lett.* **1988**, *239* (2), 237–240.
- (96) Sudova, T.; Lalova, I.; Belohlavek, J. Ethical Aspects of Enrolling Cardiac Arrest Victims into a Research Project. *Resuscitation* **2016**, *106* (2016), e72.
- (97) Garcia, J. J.; Blanca, M.; Moreno, F.; Vega, J. M.; Mayorga, C.; Fernandez, J.; Juarez, C.; Romano, A.; De Ramon, E. Determination of IgE Antibodies to the Benzylpenicilloyl Determinant: A Comparison of the Sensitivity and Specificity of Three Radio Allergo Sorbent Test Methods. *J. Clin. Lab. Anal.* **1997**, *11* (5), 251–257.

- (98) Vultaggio, A.; Matucci, A.; Virgili, G.; Rossi, O.; Fìli, L.; Parronchi, P.; Romagnani, S.; Maggi, E. Influence of Total Serum IgE Levels on the in Vitro Detection of β -Lactams-Specific IgE Antibodies. *Clin. Exp. Allergy* **2009**, *39* (6), 838–844.
- (99) Ebo, D. G.; Leysen, J.; Mayorga, C.; Rozieres, A.; Knol, E. F.; Terreehorst, I. The in Vitro Diagnosis of Drug Allergy: Status and Perspectives. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *66* (10), 1275–1286.
- (100) Ruiz-Sanchez, A. J.; Montanez, M. I.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Kehr, N. S.; Vida, Y.; Collado, D.; Najera, F.; De Cola, L.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimer-Modified Solid Supports: Nanostructured Materials with Potential Drug Allergy Diagnostic Applications. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, pp 4942–4954.
- (101) Montañez, M. I.; Najera, F.; Perez-Inestrosa, E. NMR Studies and Molecular Dynamic Simulation of Synthetic Dendritic Antigens. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3* (3), 1533–1553.
- (102) Kowalski, M. L.; Asero, R.; Bavbek, S.; Blanca, M.; Blanca-Lopez, N.; Bochenek, G.; Brockow, K.; Campo, P.; Celik, G.; Cernadas, J.; Cortellini, G.; Gomes, E.; Nizankowska-Mogilnicka, E.; Romano, A.; Szczeklik, A.; Testi, S.; Torres, M. J.; Wöhr, S.; Makowska, J. Classification and Practical Approach to the Diagnosis and Management of Hypersensitivity to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *68* (10), 1219–1232.
- (103) Brockow, K.; Romano, A.; Aberer, W.; Bircher, A. J.; Barbaud, A.; Bonadonna, P.; Faria, E.; Kanny, G.; Lerch, M.; Pichler, W. J.; Ring, J.; Rodrigues Cernadas, J.; Tomaz, E.; Demoly, P.; Christiansen, C. Skin Testing in Patients with Hypersensitivity Reactions to Iodinated Contrast Media - A European Multicenter Study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *64* (2), 234–241.
- (104) Romano, A.; Torres, M. J.; Castells, M.; Sanz, M. L.; Blanca, M. Diagnosis and Management of Drug Hypersensitivity Reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127* (3 SUPPL.), S67–S73.
- (105) Hamilton, R. G.; Adkinson, N. F. 23. Clinical Laboratory Assessment of IgE-Dependent Hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111* (2 SUPPL. 2).
- (106) Frank, R. The SPOT-Synthesis Technique: Synthetic Peptide Arrays on Membrane Supports - Principles and Applications. *J. Immunol. Methods* **2002**, *267* (1), 13–26.
- (107) Montañez, M. I.; Perez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M. Dendrimerized Cellulose as a Scaffold for Artificial Antigens with Applications in Drug Allergy Diagnosis. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (5), 1461–1466.
- (108) Montañez, M. I.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M.; Perez-Inestrosa, E. Methodologies to Anchor Dendrimeric Nanoconjugates to Solid Phase: Toward an Efficient in Vitro Detection of Allergy to β -Lactam Antibiotics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7* (6), 682–685.
- (109) Salas, M.; Laguna, J. J.; Doña, I.; Barrionuevo, E.; Fernandez-Santamaría, R.; Ariza, A.; Perez-Inestrosa, E.; Mayorga, C.; Fernández, T. D.; Torres, M. J. Patients Taking Amoxicillin-Clavulanic Can Become Simultaneously Sensitized to Both Drugs. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, *5* (3), 694-702.e3.
- (110) Gruchalla, R. S. 10. Drug Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111* (2 SUPPL. 2), 548–559.

- (111) Torres, J.; Romano, A.; Mayorga, C.; Carmen, M.; Guzman, A. E.; Reche, M.; Juarez, C.; Blanca, M. Diagnostic Evaluation of a Large Group of Patients with Immediate Allergy to Penicillins: The Role of Skin Testing. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *56* (9), 850–856.
- (112) Fontaine, C.; Mayorga, C.; Bousquet, P. J.; Arnoux, B.; Torres, M. J.; Blanca, M.; Demoly, P. Relevance of the Determination of Serum-Specific IgE Antibodies in the Diagnosis of Immediate β -Lactam Allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *62* (1), 47–52.
- (113) Blanca, M.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Reche, M.; Moya, C.; Rodriguez, J. L.; Romano, A.; Juarez, C. Clinical Evaluation of Pharmacia CAP System™ RAST FEIA Amoxicilloyl and Benzylpenicilloyl in Patients with Penicillin Allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *56* (9), 862–870.
- (114) Ansotegui, I. J.; Melioli, G.; Canonica, G. W.; Caraballo, L.; Villa, E.; Ebisawa, M.; Passalacqua, G.; Savi, E.; Ebo, D.; Gómez, R. M.; Luengo Sánchez, O.; Oppenheimer, J. J.; Jensen-Jarolim, E.; Fischer, D. A.; Haahtela, T.; Antila, M.; Bousquet, J. J.; Cardona, V.; Chiang, W. C.; Demoly, P. M.; DuBuske, L. M.; Ferrer Puga, M.; Gerth van Wijk, R.; González Díaz, S. N.; Gonzalez-Estrada, A.; Jares, E.; Kalpaklioglu, A. F.; Kase Tanno, L.; Kowalski, M. L.; Ledford, D. K.; Monge Ortega, O. P.; Morais Almeida, M.; Pfaar, O.; Poulsen, L. K.; Pawankar, R.; Renz, H. E.; Romano, A. G.; Rosário Filho, N. A.; Rosenwasser, L.; Sánchez Borges, M. A.; Scala, E.; Senna, G. E.; Sisul, J. C.; Tang, M. L. K.; Thong, B. Y. H.; Valenta, R.; Wood, R. A.; Zuberbier, T. IgE Allergy Diagnostics and Other Relevant Tests in Allergy, a World Allergy Organization Position Paper. *World Allergy Organ. J.* **2020**, *13* (2).
- (115) Pelaz, B.; Jaber, S.; De Aberasturi, D. J.; Wulf, V.; Aida, T.; De La Fuente, J. M.; Feldmann, J.; Gaub, H. E.; Josephson, L.; Kagan, C. R.; Kotov, N. A.; Liz-Marzán, L. M.; Mattoussi, H.; Mulvaney, P.; Murray, C. B.; Rogach, A. L.; Weiss, P. S.; Willner, I.; Parak, W. J. The State of Nanoparticle-Based Nanoscience and Biotechnology: Progress, Promises, and Challenges. *ACS Nano* **2012**, *6* (10), 8468–8483.
- (116) Shemetov, A. A.; Nabiev, I.; Sukhanova, A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4585–4602.
- (117) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic. *Polym. J.* **1985**, *17* (1), 117–132.
- (118) Fritz Vögtle, G. R. and N. W. *Dendrimer Chemistry. Concepts, Syntheses, Properties, Applications*, WILEY-VCH; 2009.
- (119) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (4), 1857–1959.
- (120) Miller, T. M.; Neenan, T. X. Convergent Synthesis of Monodisperse Dendrimers Based upon 1,3,5-Trisubstituted Benzenes. *Chem. Mater.* **2002**, *2* (4), 346–349.
- (121) Qiao-Sheng Hu; Vincent Pugh; Michal Sabat, A.; Pu*, L. Structurally Rigid and Optically Active Dendrimers. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (20), 7528–7536.
- (122) Satija, J.; Sai, V. V. R.; Mukherji, S. Dendrimers in Biosensors: Concept and Applications. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (38), 14367–14386.

- (123) Tang, F.; Li, L.; Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (12), 1504–1534.
- (124) Tan, W.; Wang, K.; He, X.; Zhao, X. J.; Drake, T.; Wang, L.; Bagwe, R. P. Bionanotechnology Based on Silica Nanoparticles. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (5), 621–638.
- (125) Montañez, M. I.; Najera, F.; Mayorga, C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Vida, Y.; Collado, D.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Recognition of Multiepitope Dendrimeric Antigens by Human Immunoglobulin E. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11* (3), 579–588.
- (126) Vida, Y.; Montañez, M. I.; Collado, D.; Najera, F.; Ariza, A.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimeric Antigen-Silica Particle Composites: An Innovative Approach for IgE Quantification. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (24), 3044–3050.
- (127) Graham, T. XXXV.—On the Properties of Silicic Acid and Other Analogous Colloidal Substances. *J. Chem. Soc.* **1864**, *17* (0), 318–327.
- (128) Iler, R. K. Polymerization of Silica. *Chem. Silica Solubility, Polym. Colloid Surf. Prop. Biochem. Silica* **1979**, 172–311.
- (129) S.S.Kistler. Coherent Wxpaned Aerogels and Jellies. *Nature* **1931**, *127* (3211), 3211.
- (130) Stöber Werner, F. A. and B. E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (1), 62–69.
- (131) E.M. Vega-López, U. M.-M. El Proceso Stöber : Principios y Actualidad 1ª Parte. *Rev. Nat. y Technol.* **2016**, *1* (10), 11–23.
- (132) Beganskiene, A.; Sirutkaitis, V.; Kurtinatitiene, M.; Juskenas, R.; Kareiva, A. FTIR, TEM and NMR Investigations of Stöber Silica Nanoparticles. *Mater. Sci.* **2004**, *10* (4), 287–290.
- (133) Chen, J.; Liu, M.; Chen, C.; Gong, H.; Gao, C. Synthesis and Characterization of Silica Nanoparticles with Well-Defined Thermoresponsive PNIPAM via a Combination of RAFT and Click Chemistry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3* (8), 3215–3223.
- (134) Chaudhary, Y. S.; Ghatak, J.; Bhatta, U. M.; Khushalani, D. One-Step Method for the Self-Assembly of Metal Nanoparticles onto Facetted Hollow Silica Tubes. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16* (36), 3619–3623.
- (135) Rahman, I. A.; Padavettan, V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocompositesa Review. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*.
- (136) Lipski, A. M.; Jaquiere, C.; Choi, H.; Eberli, D.; Stevens, M.; Martin, I.; Chen, I. W.; Shastri, V. P. Nanoscale Engineering of Biomaterial Surfaces. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (4), 553–557.
- (137) An, Y.; Chen, M.; Xue, Q.; Liu, W. Preparation and Self-Assembly of Carboxylic Acid-Functionalized Silica. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311* (2), 507–513.
- (138) Loidl-Stahlhofen, A.; Schmitt, J.; Nöller, J.; Hartmann, T.; Brodowsky, H.; Schmitt, W.; Keldenich, J. Solid-Supported Biomolecules on Modified Silica Surfaces - A Tool for Fast Physicochemical Characterization and High-Throughput Screening. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (23), 1829–1834.

- (139) Giri, J.; Diallo, M. S.; Simpson, A. J.; Liu, Y.; Goddard, W. A.; Kumar, R.; Woods, G. C. Interactions of Poly(Amidoamine) Dendrimers with Human Serum Albumin: Binding Constants and Mechanisms. *ACS Nano* **2011**, *5* (5), 3456–3468.
- (140) Tanis, I.; Karatasos, K. Association of a Weakly Acidic Anti-Inflammatory Drug (Ibuprofen) with a Poly(Amidoamine) Dendrimer as Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (31), 10984–10993.
- (141) Rolinson, G. N. Laboratory Evaluation of Amoxicillin. *J. Infect. Dis.* **1974**, *129* (Supplement_2), S139–S145.
- (142) Friedman, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>.
- (143) Bottom, C. B.; Hanna, S. S.; Siehr, D. J. Mechanism of the Ninhydrin Reaction. *Biochimie* **1973**, *55* (6–7), XIV.
- (144) Sun, S. W.; Lin, Y. C.; Weng, Y. M.; Chen, M. J. Efficiency Improvements on Ninhydrin Method for Amino Acid Quantification. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19* (2–3), 112–117.
- (145) Moore, S. Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide as Solvent for the Ninhydrin Reaction. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243* (23), 6281–6283.
- (146) Kammler, H. K.; Beaucage, G.; Mueller, R.; Pratsinis, S. E. Structure of Flame-Made Silica Nanoparticles by Ultra-Small-Angle x-Ray Scattering. *Langmuir* **2004**, *20* (5), 1915–1921.
- (147) Montañez, M. I.; Najera, F.; Mayorga, C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Vida, Y.; Collado, D.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Recognition of Multiepitope Dendrimeric Antigens by Human Immunoglobulin E. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**.
- (148) Doña, I.; Romano, A.; Torres, M. J. Algorithm for Betalactam Allergy Diagnosis. *Allergy* **2019**, *74* (9), 1817–1819.
- (149) Hoo, Z. H.; Candlish, J.; Teare, D. What Is an ROC Curve? *Emerg. Med. J.* **2017**, *34* (6), 357–359.
- (150) MacY, E.; Goldberg, B.; Poon, K. Y. T. Use of Commercial Anti-Penicillin IgE Fluorometric Enzyme Immunoassays to Diagnose Penicillin Allergy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **2010**, *105* (2), 136–141.
- (151) Johansson, S. G. O.; Adédoyin, J.; Van Hage, M.; Grönneberg, R.; Nopp, A. False-Positive Penicillin Immunoassay: An Unnoticed Common Problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *132* (1), 235–237.
- (152) Gil-Ocaña, V.; Jimenez, I. M.; Mayorga, C.; Doña, I.; Céspedes, J. A.; Montañez, M. I.; Vida, Y.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Multiepitope Dendrimeric Antigen-Silica Particle Composites as Nano-Based Platforms for Specific Recognition of IgEs. *Front. Immunol.* **2021**, *12* (December), 1–13.
- (153) Neuberger, T.; Schöpf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; Von Rechenberg, B. Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and Limitations of a New Drug Delivery System. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293* (1), 483–496.

- (154) Tartaj, P.; Del Puerto Morales, M.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carreño, T.; Serna, C. J. The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *36* (13).
- (155) Elliott, D. W.; Zhang, W. X. Field Assessment of Nanoscale Bimetallic Particles for Groundwater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35* (24), 4922–4926.
- (156) Rost, N. C. V.; Broca, F. M.; Gonçalves, G. C.; Cândido, M. A.; Castilho, M. L.; Raniero, L. J. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Optimized by Design of Experiments. *Brazilian J. Phys.* **2019**, *49* (1), 22–27.
- (157) Lv, Y. K.; He, Y. D.; Xiong, X.; Wang, J. Z.; Wang, H. Y.; Han, Y. M. Layer-by-Layer Fabrication of Restricted Access Media-Molecularly Imprinted Magnetic Microspheres for Magnetic Dispersion Microextraction of Bisphenol A from Milk Samples. *New J. Chem.* **2015**, *39* (3), 1792–1799.
- (158) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1222–1244.
- (159) Cha, J.; Kwon, Y. S.; Yoon, T. J.; Lee, J. K. Relaxivity Control of Magnetic Nanoclusters for Efficient Magnetic Relaxation Switching Assay. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (5), 457–459.
- (160) Deng, H.; Li, X.; Peng, Q.; Wang, X.; Chen, J.; Li, Y. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (18), 2782–2785.
- (161) Yang, L.; Tian, J.; Meng, J.; Zhao, R.; Li, C.; Ma, J.; Jin, T. Modification and Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles for Use in Adsorption of Alkaloids. *Molecules* **2018**, *23* (3).
- (162) Ochoa, R.; Martínez, J. C.; Ferriol, X.; García, A. M.; Estrada, E.; Blanco, R.; Sotolongo, F. Principios y Procedimientos Para La Validación de Inmunoensayos Cuantitativos Empleados Para Evaluar La Inmunogenicidad de Vacunas. *Rev. Vaccinología (Vacunología y Temas Afines)* **1999**, *8* (10), 9–14.
- (163) Ariza, A.; Mayorga, C.; Fernández, T. D.; Barbero, N.; Martín-Serrano, Á.; Pérez-Sala, D.; Sánchez-Gómez, F.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Montañez, M. I. Hypersensitivity Reactions to SS-Lactams: Relevance of Hapten-Protein Conjugates. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. Allergol Clin Immunol* **2015**, *25* (1), 12–25.
- (164) Paar, J. M.; Harris, N. T.; Holowka, D.; Baird, B. Bivalent Ligands with Rigid Double-Stranded DNA Spacers Reveal Structural Constraints on Signaling by FcεRI. *J. Immunol.* **2002**, *169* (2), 856–864.
- (165) Ariza, A.; Collado, D.; Vida, Y.; Montañez, M. I.; Pérez-Inestrosa, E.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Cañada, F. J.; Pérez-Sala, D. Study of Protein Haptenation by Amoxicillin through the Use of a Biotinylated Antibiotic. *PLoS One* **2014**, *9* (3), 1–12.
- (166) Gieras, A.; Linhart, B.; Roux, K. H.; Dutta, M.; Khodoun, M.; Zafred, D.; Cabauatan, C. R.; Lupinek, C.; Weber, M.; Focke-Tejkl, M.; Keller, W.; Finkelman, F. D.; Valenta, R. IgE Epitope Proximity Determines Immune Complex Shape and Effector Cell Activation Capacity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *137* (5), 1557–1565.
- (167) Dwaipayan Sil, Jong Bum Lee, Dan Luo, David Holowka, and B. B. Trivalent Ligands with Rigid Dna Spacers Reveal Structural Requirements for IgE Receptor Signaling in RBL Mast Cells. *ACS Chem Biol.* **2007**, *2* (10), 674–684.
- (168) Baird, E. J.; Holowka, D.; Coates, G. W.; Baird, B. Highly Effective Poly(Ethylene

Glycol) Architectures for Specific Inhibition of Immune Receptor Activation. *Biochemistry* **2003**, 42 (44), 12739–12748.

- (169) Clinical trial of Ro 6-0787, a monovalent specific hapten inhibitor of penicillin allergy - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/127471/> (accessed Nov 19, 2021).
- (170) Levine, B. B. N(Alpha-D-Penicilloyl)Amines as Univalent Hapten Inhibitors of Antibodydependent Allergic Reactions to Penicillin. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, 91 (5), 1025–1034.
- (171) De Weck, A. L.; Girard, J. P. Specific Inhibition of Allergic Reactions to Penicillin in Man by a Monovalent Hapten. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1972**, 42 (6), 798–815. <https://doi.org/10.1159/000230659>.
- (172) Molina, N.; Martin-Serrano, A.; Fernandez, T. D.; Tesfaye, A.; Najera, F.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Vida, Y.; Montañez, M. I.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimeric Antigens for Drug Allergy Diagnosis: A New Approach for Basophil Activation Tests. *Molecules* **2018**, 23 (5), 1–13.
- (173) Yu-Fen Huang, Haipeng Liu, Xiangling Xiong, Yan Chen, and W. T. Nanoparticle-Mediated IgE-Receptor Aggregation and Signaling in RBL Mast Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 23 (1), 1–7.
- (174) Bao, X.; Wei, X.; Wang, Y.; Jiang, H.; Yu, D.; Hu, M. Effect of Silica-Based Nanomaterials and Their Derivate with PEGylation on Cementoblasts. *Ann. Biomed. Eng.* **2014**, 42 (8), 1781–1789.
- (175) Bagwe, R. P.; Hilliard, L. R.; Tan, W. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir* **2006**, 22 (9), 4357–4362.
- (176) Jafarzadeh, M.; Rahman, I. A.; Sipaut, C. S. Synthesis of Silica Nanoparticles by Modified Sol-Gel Process: The Effect of Mixing Modes of the Reactants and Drying Techniques. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, 50 (3), 328–336. <https://doi.org/10.1007/s10971-009-1958-6>.
- (177) Jia, G.; Ji, Z.; Wang, H.; Chen, R. Preparation and Properties of Five-Layer Graded-Refractive-Index Antireflection Coating Nanostructured by Solid and Hollow Silica Particles. *Thin Solid Films* **2017**, 642 (April), 174–181.
- (178) Riccò, R.; Nizzero, S.; Penna, E.; Meneghello, A.; Cretaio, E.; Enrichi, F. Ultra-Small Dye-Doped Silica Nanoparticles via Modified Sol-Gel Technique. *J. Nanoparticle Res.* **2018**, 20 (5), 1–9.
- (179) Rojas, J. A. P.; Juan, S.; Km, M.; Carretera, D.; Sta, E. Nanoesferas Monodispersas de SiO₂: Síntesis Controlada y Caracterización. *Superf. y vacío* **2009**, 22 (3), 44–48.
- (180) Prochazkova, S.; Vårum, K. M.; Ostgaard, K. Quantitative Determination of Chitosans by Ninhydrin. *Carbohydr. Polym.* **1999**, 38 (2), 115–122.

APÉNDICE TABLAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tabla 31. Valores de optimización del protocolo RAST con 500nmDeAXO@SiO₂ donde se deja el volumen fijo y los mg de partículas variable

| CONCENTRACIÓN | 1,5mg/20µL | 2mg/20µL | 3mg/20µL |
|-------------------------|------------|----------|----------|
| %RAST PBS | 0,7 | 0,5 | 0 |
| %RAST POOL (+) ALTO | 1,1 | 2,2 | 2,1 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 1 | 1,1 | 0,6 |
| %RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| %RAST POOL (-) IgE ALTA | 0,1 | 0 | 0 |

Tabla 32. Valores de optimización del protocolo RAST con 500nmDeAXO@SiO₂ donde los mg de nanopartículas se dejan fijo y el volumen variable

| CONCENTRACIÓN | 2mg/20µL | 2mg/70µL | 2mg/120µL | 2mg/170µL |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| %RAST Paciente 1 | 0,9 | 1,1 | 0,6 | 0,8 |
| %RAST Paciente 2 | 6 | 4,2 | 2,3 | 1,7 |
| %RAST Paciente 3 | 0,9 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 33. Valores de % de Rast de pacientes control y pacientes alérgicos para trazar la curva ROC de DeAXO@SiO₂.

| CURVA ROC DeAXO@SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 1 | 0,66 | 1A | 19 |
| 2 | 0,54 | 2A | 7.3 |
| 3 | 0,76 | 3A | 8.1 |
| 4 | 0 | 4A | 7.3 |
| 5 | 0,69 | 5A | 19 |
| 6 | 0,52 | 6A | 20 |
| 7 | 0,46 | 7A | 20 |
| 8 | 0 | 8A | 7.7 |
| 9 | 0,44 | 9A | 8.5 |
| 10 | 0 | 10A | 9.47 |
| | | 11A | 19 |
| | | 12A | 10.6 |
| | | 13B | 19 |
| | | 14B | 15 |
| | | 15B | 20 |
| | | 16B | 19 |
| | | 17B | 9.42 |
| | | 18B | 10.1 |
| | | 19B | 9.17 |
| | | 20B | 8.6 |
| | | 21B | 11.8 |

Tabla 34. Valores de % de Rast de pacientes control y pacientes alérgicos para trazar la curva ROC de DeBPO@SiO₂.

| CURVA ROC DeBPO@SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 1 | 0 | 13B | 11 |
| 2 | 0 | 14B | 4 |
| 3 | 0 | 15B | 12 |
| 4 | 0 | 16B | 6 |
| 5 | 0 | 17B | 8.7 |
| 6 | 0 | 18B | 9.5 |
| 7 | 0 | 19B | 6.3 |
| 8 | 0 | 20B | 10.1 |
| 9 | 0 | 21B | 7.6 |
| 10 | 0 | 13B | 11 |

Tabla 35. Valores de % de Rast de pacientes control y pacientes alérgicos para trazar la curva ROC de DeAXO-BPO@SiO₂.

| CURVA ROC DeAXO-BPO@SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 1 | 0,66 | 1A | 11 |
| 2 | 0,54 | 2A | 4.3 |
| 3 | 0,76 | 3A | 3.47 |
| 4 | 0 | 4A | 5.4 |
| 5 | 0,69 | 5A | 7 |
| 6 | 0,52 | 6A | 9 |
| 7 | 0,46 | 7A | 9 |
| 8 | 0 | 8A | 2.4 |
| 9 | 0,44 | 9A | 3.9 |
| 10 | 0 | 10A | 5 |
| | | 11A | 8 |
| | | 12A | 4.41 |
| | | 13B | 15 |
| | | 14B | 11 |
| | | 15B | 17 |
| | | 16B | 15 |
| | | 17B | 8.8 |
| | | 18B | 10.5 |
| | | 19B | 6.7 |
| | | 20B | 9.8 |
| | | 21B | 8.97 |

Tabla 36. Resultados *in vitro* de la determinación de anticuerpos IgE contra el fármaco de los pacientes diagnosticados con una reacción alérgica inmediata a AX, realizando diferentes inmunoensayos: ImmunoCAP (estandarizado) y RAST utilizando discos de celulosa o partículas de sílice como fase sólida. Los resultados positivos (según los puntos de corte estandarizados o calculados) se destacan en negro. Determinantes alérgénicos presentes en las fases sólidas: (A) AXO, amoxicilloil y (B) BPO: bencilpenicilloil.

| Paciente | ImmunoCAP | | | % RAST | | | | |
|----------|-------------|-------------|-----------|--------------|--------------|---------------------|-------------|-------------|
| | | | | PLL - discs | | De@SiO ₂ | | |
| | BPO | AXO | IgE TOTAL | BPO | AXO | BPO | AXO | AXO:BPO |
| 1A | 0 | 0.14 | 316 | 0.71 | 21.34 | 0 | 19 | 11 |
| 2A | 0.07 | 0.26 | 3571 | 0.59 | 3.02 | 0 | 7.3 | 4.3 |
| 3A | 0.08 | 0.18 | 35.1 | 0 | 18.65 | 1.3 | 8.1 | 3.47 |
| 4A | 0.45 | 0.35 | 349 | 2.93 | 5.95 | 1.1 | 7.3 | 5.4 |
| 5A | 0.44 | 3.14 | 2442 | 5.01 | 16.89 | 0 | 19 | 7 |
| 6A | 4.29 | 3.72 | 1183 | 17.23 | 26.08 | 1 | 20 | 9 |
| 7A | 0.01 | 1.82 | 2337 | 2.32 | 11.24 | 1 | 20 | 9 |
| 8A | 0.01 | 0.46 | 201 | 0.74 | 5.03 | 0 | 7.7 | 2.4 |
| 9A | 0.02 | 0.1 | 423 | 0 | 2.8 | 0 | 8.5 | 3.9 |
| 10A | 0.05 | 0.2 | 1545 | 0.34 | 4.52 | 0 | 9.47 | 5 |
| 11A | 0 | 2.04 | 105 | 12.88 | 18.1 | 0 | 19 | 8 |
| 12A | 0.01 | 0.1 | 41.3 | 0.67 | 4.51 | 0 | 10.6 | 4.41 |
| 13B | 3.3 | 1.95 | 1340 | 0.44 | 3.45 | 11 | 19 | 15 |
| 14B | 2.53 | 4.98 | 69.1 | 18.24 | 26.69 | 4 | 15 | 11 |
| 15B | 1.42 | 1.57 | 64.8 | 6.85 | 10.85 | 12 | 20 | 17 |
| 16B | 0.4 | 1.17 | 278 | 1.51 | 14.87 | 6 | 19 | 15 |
| 17B | 0.36 | 0.25 | 505 | 0.11 | 10.61 | 8.7 | 9.42 | 8.8 |
| 18B | 0.75 | 0.74 | 211 | 37 | 51 | 9.5 | 10.1 | 10.5 |
| 19B | 0.27 | 0.83 | 591 | 1.18 | 5.87 | 6.3 | 9.17 | 6.7 |
| 20B | 0.12 | 0.12 | 586 | 2.52 | 2.65 | 10.1 | 8.6 | 9.8 |
| 21B | 8.09 | 0.8 | 1782 | 24.55 | 19.78 | 7.6 | 11.8 | 8.97 |

Tabla 37. Comparación del %RAST de las partículas 500nm DeAXO@SiO₂, 200 nm DeAXO@SiO₂, y 200 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ agitando a 550 rpm.

| PARTICULAS SUEROS | 500nm DeAXO@SiO₂ | 200nm DeAXO@SiO₂ | 200nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ |
|------------------------------------|--|--|--|
| %RAST POOL (+) ALTO | 15,5 | 17 | 11,4 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 4,5 | 5,6 | 2,1 |
| %RAST POOL (-) | 0 | 0 | 1 |
| %RAST POOL (-) IgE ALTA | 0 | 1,3 | 11,4 |

Tabla 38. Comparación del %RAST de las partículas 500nm DeAXO@SiO₂, 200 nmDeAXO@SiO₂, y 200 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ agitando a 700 rpm.

| PARTICULAS SUEROS | 500nm DeAXO@SiO₂ | 200nm DeAXO@SiO₂ | 200nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ |
|------------------------------------|--|--|--|
| %RAST POOL (+) ALTO | 15,5 | 17 | 16,8 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 4,5 | 5,6 | 9 |
| %RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| %RAST POOL (-) IgE ALTA | 0 | 1,3 | 0,2 |

Tabla 39. Valores de optimización de la concentración de partículas para el ensayo RAST con partículas de tamaño 200 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂.

| 200nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂ | CONCENTRACIÓN | | |
|--|----------------------|-----------------|-------------------|
| | 1,5mg/20μL | 2mg/20μL | 2,5mg/20μL |
| %RAST PBS | 0,5 | 0 | 0,1 |
| % RAST POOL (+) ALTO | 8,6 | 16,8 | 15,9 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 4,8 | 9 | 7,8 |
| % RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| % RAST POOL (-) IgE ALTA | 0,1 | 0,2 | 0,1 |

Tabla 40. Valores de optimización de la concentración de partículas para el ensayo RAST con partículas de tamaño 50 nm DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂.

| 50nm DeAXO@Fe ₃ O ₄ ⊂SiO ₂ | CONCENTRACIÓN | | |
|--|---------------|----------|------------|
| | 1,5mg/20μL | 2mg/20μL | 2,5mg/20μL |
| %RAST PBS | 0,1 | 0 | 0,1 |
| % RAST POOL (+) ALTO | 12,4 | 19,9 | 19,2 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 6,5 | 9,8 | 1,1 |
| % RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| % RAST POOL (-) IgE ALTA | 0,4 | 0,2 | 0,1 |

Tabla 41. Valores de optimización de la concentración de partículas para el ensayo RAST con partículas de tamaño 30 nm DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂.

| 30nm DeAXO@Fe ₃ O ₄ ⊂SiO ₂ | CONCENTRACIÓN | | |
|--|---------------|----------|------------|
| | 1,5 mg/20μL | 2mg/20μL | 2,5mg/20μL |
| %RAST PBS | 0,1 | 0 | 0 |
| % RAST POOL (+) ALTO | 13,7 | 20,3 | 20,7 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 7,1 | 11,4 | 12,5 |
| % RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| % RAST POOL (-) IgE ALTA | 0,2 | 0,1 | 0,2 |

Tabla 42. Valores de optimización de la concentración de partículas para el ensayo RAST con partículas de tamaño 15 nm DeAXO-Fe₃O₄⊂SiO₂.

| 15nm DeAXO@Fe ₃ O ₄ ⊂SiO ₂ | CONCENTRACIÓN | | |
|--|---------------|----------|------------|
| | 1,5mg/20μL | 2mg/20μL | 2,5mg/20μL |
| %RAST PBS | 0,5 | 0,1 | 0,2 |
| % RAST POOL (+) ALTO | 14,7 | 20,9 | 20,9 |
| %RAST POOL (+) BAJO | 8,2 | 12,8 | 12,8 |
| % RAST POOL (-) | 0 | 0 | 0 |
| % RAST POOL (-) IgE ALTA | 0 | 0,6 | 0,7 |

Tabla 43. Valores de %RAST de la evaluación de la capacidad de reconocimiento de IgE específica en materiales de núcleo de hierro cubiertos por una capa de sílice de 50 y 30 nm.

| Tamaño | 50nm | | 30nm | |
|-------------|------|-----|------|------|
| | AXO | BPO | AXO | BPO |
| Paciente 1 | 22,7 | 0 | 23,4 | 0 |
| Paciente 2 | 13,1 | 1 | 13,1 | 0,8 |
| Paciente 3 | 10 | 1,8 | 11 | 0,5 |
| Paciente 4 | 28,3 | 1 | 28 | 0,4 |
| Paciente 5 | 32,9 | 0,5 | 33,7 | 0,8 |
| Paciente 6 | 17,5 | 7,9 | 22,9 | 8,4 |
| Paciente 7 | 17,2 | 8,4 | 18,5 | 9,2 |
| Paciente 8 | 17 | 6,2 | 22,2 | 6,6 |
| Paciente 9 | 17,4 | 8 | 17,6 | 8,5 |
| Paciente 10 | 35,4 | 19 | 36,2 | 18,5 |
| Control 1 | 0,6 | 0,9 | 0 | 0,5 |
| Control 2 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | 0,4 |
| Control 3 | 0 | 0,2 | 0 | 0,2 |
| Control 4 | 0 | 0,8 | 0,4 | 0,7 |
| Control 5 | 0 | 0,7 | 0 | 0,8 |

Tabla 44. Valores de % de Rast de los diferentes tiempos de incubación de las partículas de 30 nm DeAXO@Fe₃O₄-SiO₂ a diferentes tiempos de incubación con los pool de suero

| 30 nm DeBPO@Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ | | | | |
|--|---------|---------|---------|----------|
| Suero \ Incubación | 2 horas | 4 horas | 6 horas | 24 horas |
| POOL (+) ALTO | 12,3 | 13,1 | 13,3 | 23,7 |
| POOL (+) BAJO | 4,1 | 4 | 4 | 7,4 |
| POOL (-) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| POOL (-) IgE ALTA | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,1 |

Tabla 45. Valores de % de Rast de pacientes control y pacientes alérgicos para trazar la curva ROC de DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂.

| CURVA ROC DeAXO@Fe₃O₄⊂SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 1 | 0 | 1A | 23,4 |
| 2 | 0,6 | 2A | 13,1 |
| 3 | 0 | 3A | 11 |
| 4 | 0,4 | 4A | 28,8 |
| 5 | 0,01 | 5A | 13,8 |
| 6 | 0,9 | 6A | 23,9 |
| 7 | 0,4 | 7A | 28 |
| 8 | 0,1 | 8A | 21 |
| 9 | 0 | 9A | 27,3 |
| 10 | 0,1 | 10A | 27,7 |
| 11 | 0,6 | 11A | 11 |
| 12 | 0,3 | 12A | 15,5 |
| 13 | 0 | 13A | 11,1 |
| 14 | 0,7 | 14A | 20,8 |
| 15 | 0,4 | 15A | 28 |
| 16 | 0,8 | 16A | 23,2 |
| 17 | 0 | 17A | 17,2 |
| 18 | 0 | 18A | 13,9 |
| 19 | 0,08 | 19A | 22 |
| 20 | 0,3 | 20A | 27,1 |
| 21 | 0,9 | 21A | 32,3 |
| 22 | 0,6 | 22A | 12,2 |
| 23 | 0 | 23A | 26,4 |
| 24 | 0,02 | 24A | 33,7 |
| 25 | 0 | 25A | 28,6 |
| 26 | 0,7 | 26A | 22,7 |
| 27 | 0,8 | 27A | 21,2 |
| 28 | 1,7 | 28A | 18,8 |
| 29 | 0,4 | 29B | 27,7 |
| 30 | 0,5 | 30B | 23 |
| 31 | 0,4 | 31B | 18,5 |
| 32 | 0 | 32B | 22,2 |
| 33 | 0 | 33B | 17,6 |

Esta tabla continua en la siguiente página.

| CURVA ROC DeAXO@Fe₃O₄-SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 34 | 0,6 | 34B | 36,2 |
| 35 | 0,4 | 35B | 27,3 |
| 36 | 0 | 36B | 14,05 |
| 37 | 0 | 37B | 28,2 |
| | | 38B | 26,3 |
| | | 39B | 16,8 |
| | | 40B | 26,8 |
| | | 41B | 21,1 |
| | | 42B | 24,4 |
| | | 43B | 27,6 |
| | | 44B | 16,4 |

Tabla 46. Valores de % de Rast de pacientes control y pacientes alérgicos para trazar la curva ROC de $\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$.

| CURVA ROC $\text{DeBPO@Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 1 | 0 | 29B | 8,303 |
| 2 | 0,6 | 30B | 8,4 |
| 3 | 0 | 31B | 9,29 |
| 4 | 0,4 | 32B | 6,65 |
| 5 | 0,01 | 33B | 8,51 |
| 6 | 0,9 | 34B | 18,54 |
| 7 | 0,4 | 35B | 15,115 |
| 8 | 0,1 | 36B | 5,953 |
| 9 | 0 | 37B | 6,3 |
| 10 | 0,1 | 38B | 2,5 |
| 11 | 0,6 | 39B | 5,3 |
| 12 | 0,3 | 40B | 1,4 |
| 13 | 0 | 41B | 2,8 |
| 14 | 0,7 | 42B | 5,5 |
| 15 | 0,4 | 43B | 6,6 |
| 16 | 0,8 | 44B | 7,4 |
| 17 | 0 | 29B | 8,303 |
| 18 | 0 | 30B | 8,4 |
| 19 | 0,08 | 31B | 9,29 |
| 20 | 0,3 | | |
| 21 | 0,9 | | |
| 22 | 0,6 | | |
| 23 | 0 | | |
| 24 | 0,02 | | |
| 25 | 0 | | |
| 26 | 0,7 | | |
| 27 | 0,8 | | |
| 28 | 1,7 | | |
| 29 | 0,4 | | |
| 30 | 0,5 | | |
| 31 | 0,4 | | |
| 32 | 0 | | |
| 33 | 0 | | |

Esta tabla continua en la siguiente página.

| CURVA ROC DeBPO@Fe₃O₄-SiO₂ | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| PACIENTE CONTROL | %RAST DE CONTROLES | PACIENTE ALERGICO | % RAST DE PACIENTES |
| 34 | 0,6 | | |
| 35 | 0,4 | | |
| 36 | 0 | | |
| 37 | 0 | | |

Tabla 47. Resultados *in vitro* de la determinación de anticuerpos IgE contra el fármaco de los pacientes diagnosticados con una reacción alérgica inmediata a AX, realizando diferentes inmunoensayos: ImmunoCAP (estandarizado) y RAST utilizando discos de celulosa o partículas de sílice como fase sólida. Los resultados positivos (según los puntos de corte estandarizados o calculados) se destacan en negro. Determinantes alérgicos presentes en las fases sólidas: (A) AXO, amoxicilloil y (B) BPO: bencilpenicilloil.

| Paciente | ImmunoCAP | | | % RAST | | | |
|----------|-----------|-------------|-------------|--------------|-------------|--|-------------|
| | BPO | AXO | IgE TOTAL | PLL - discs | | Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ -De | |
| | | | | BPO | AXO | BPO | AXO |
| 1A | 0,08 | 0,18 | 396 | 0 | 18,6 | 0 | 23,4 |
| 2A | 0,07 | 0,26 | 35,1 | 0,59 | 3,02 | 0,89 | 13,1 |
| 3A | 0,01 | 0,1 | 349 | 2,93 | 5,95 | 0,54 | 11 |
| 4A | 0,03 | 0,14 | 316 | 21,34 | 0,71 | 0,47 | 28,8 |
| 5A | 0,01 | 0,44 | 1481 | 0,39 | 4,17 | 0 | 13,8 |
| 6A | 0,01 | 0,29 | 59,3 | 6,68 | 1,45 | 1,189 | 23,9 |
| 7A | 0,09 | 0,67 | 523 | 2,76 | 5,77 | 2,349 | 28 |
| 8A | 0,002 | 0,03 | 5000 | 3,27 | 0,59 | 0 | 21 |
| 9A | 0,02 | 0,11 | 2057 | 11,22 | 1,25 | 0,36 | 27,3 |
| 10A | 0,01 | 0,04 | 4459 | 4,16 | 1,07 | 0,824 | 27,7 |
| 11A | 0,03 | 0,09 | 1031 | 1,54 | 0 | 0 | 11 |
| 12A | 0,002 | 0,04 | 5000 | 2,33 | 0,78 | 0 | 15,5 |
| 13A | 0,05 | 0,06 | 577 | 2,36 | 0,21 | 0 | 11,1 |
| 14A | 0,03 | 0,05 | 2687 | 0 | 0 | 0,46 | 20,8 |
| 15A | 0,03 | 0,02 | 5,27 | 2,09 | 0,68 | 0 | 28 |
| 16A | - | - | - | 0,64 | 0 | 0 | 23,2 |
| 17A | - | - | - | 1,5 | 1,25 | 1,2 | 17,2 |
| 18A | - | - | - | 0,16 | 0,28 | 0,7 | 13,9 |
| 19A | - | - | - | 0,85 | 0 | 0,6 | 22 |
| 20A | - | - | - | 0,37 | 1,48 | 1,2 | 27,1 |
| 21A | - | - | - | 1,23 | 0,53 | 3,2 | 32,3 |
| 22A | 0 | 0,03 | 221 | 0,53 | 0,24 | 0,9 | 12,2 |

Esta tabla continua en la siguiente página.

| Paciente | ImmunoCAP | | | % RAST | | | |
|------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--|--------------|
| | | | | PLL - discs | | Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -De | |
| | BPO | AXO | IgE TOTAL | BPO | AXO | BPO | AXO |
| 23A | 0,01 | 0,01 | 535 | 2,6 | - | 0,9 | 26,4 |
| 24A | 4,29 | 3,72 | 1183 | 26,31 | 21,13 | 0,88 | 33,7 |
| 25A | 0,23 | 0,19 | 5000 | 2,66 | 3,03 | 0 | 28,6 |
| 26A | 0,02 | 0,13 | 331 | 2,08 | 1,37 | 3,4 | 22,7 |
| 27A | 0,12 | 0,19 | 345 | - | - | 0 | 21,2 |
| 28A | 0,24 | 0,57 | 1762 | 1,21 | 0,26 | 0,078 | 18,8 |
| 29B | 0,04 | 0,07 | 150 | 0,17 | 1,39 | 8,303 | 27,7 |
| 30B | 0,36 | 0,25 | 505 | 7,01 | 0,44 | 8,4 | 23 |
| 31B | 0,12 | 0,12 | 586 | 0,4 | 0,23 | 9,29 | 18,5 |
| 32B | 0,27 | 0,83 | 591 | 0,75 | 0,19 | 6,65 | 22,2 |
| 33B | 1,42 | 1,57 | 64,8 | 4,06 | 5,97 | 8,51 | 17,6 |
| 34B | 0,75 | 0,74 | 211 | 29,51 | 36,77 | 18,54 | 36,2 |
| 35B | 0,34 | 0,76 | 738 | 0 | 0 | 15,115 | 27,3 |
| 36B | 0,005 | 0,05 | 5000 | 2,19 | 0,57 | 5,953 | 14,05 |
| 37B | 0,01 | 0,09 | 656 | 0,47 | 3,96 | 6,3 | 28,2 |
| 38B | 0,04 | 0,06 | 573 | 0,34 | 0 | 2,5 | 26,3 |
| 39B | 0,004 | 0,1 | 1082 | 2,65 | 0,9 | 5,3 | 16,8 |
| 40B | 0,02 | 0,04 | 1659 | 0,93 | 0,14 | 1,4 | 26,8 |
| 41B | 0,01 | 0,02 | 5000 | 0,5 | 0 | 2,8 | 21,1 |
| 42B | 0,05 | 0,06 | 283 | 1,51 | 0,07 | 5,5 | 24,4 |
| 43B | 1,26 | 2,69 | 917 | 0,82 | 0,71 | 6,6 | 27,6 |
| 44B | 0,01 | 0,02 | 514 | 1,8 | 0,45 | 7,4 | 16,4 |

Tabla 48. Valores de % de RAST del interensayo en 5 pacientes con 30 nm DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂.

| | DÍA 1 | DÍA 2 | DÍA 3 | DÍA 4 | DÍA 5 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Paciente 1 | 23,9 | 23,8 | 22,7 | 22,1 | 22,2 |
| Paciente 2 | 27,3 | 27,3 | 27,1 | 27,9 | 28,1 |
| Paciente 3 | 27,7 | 27,8 | 27,1 | 27,9 | 28 |
| Paciente 4 | 14 | 13,5 | 13,7 | 14,3 | 15,3 |
| Paciente 5 | 22,9 | 22,8 | 23,2 | 22 | 22,7 |

Tabla 49. Valores de % de RAST del interensayo en 5 pacientes con 30 nm DeBPO@Fe₃O₄@SiO₂.

| | DÍA 1 | DÍA 2 | DÍA 3 | DÍA 4 | DÍA 5 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Paciente 1 | 1,1 | 1,7 | 1,3 | 1,4 | 0,5 |
| Paciente 2 | 0,3 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |
| Paciente 3 | 0,8 | 0,4 | 0,7 | 0,8 | 0,8 |
| Paciente 4 | 5,9 | 5,5 | 5,9 | 6,2 | 6,2 |
| Paciente 5 | 8,4 | 9,1 | 9,8 | 8,9 | 8,9 |

Tabla 50. Valores de % de inhibición de RAST de 3 paciente alérgicos selectivos a amoxicilina ensayados con el material DeAXO@Fe₃O₄@SiO₂.

| | CONCENTRACIÓN | %Inhibición RAST | %Inhibición RAST |
|-------------------|---------------|--|--|
| | | DeAXO@Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ / Bu-AXO | DeAXO@Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ / Bu-BPO |
| PACIENTE 1 | 10mM | 54,8 | 1,5 |
| | 1mM | 5,7 | 0 |
| PACIENTE 2 | 10mM | 60,4 | 0 |
| | 1mM | 5,5 | 0 |
| PACIENTE 3 | 10mM | 66,7 | 0 |
| | 1mM | 4,8 | 0 |

Tabla 51. Valores de % de inhibición de RAST de 14 pacientes alérgicos reactividad cruzada a amoxicilina/bencilpenicilina ensayados con (1) DeAXO@Fe₃O₄/SiO₂/Bu-AXO, (2) DeAXO@Fe₃O₄/SiO₂/Bu-BPO, (3) DeBPO@Fe₃O₄/SiO₂/Bu-AXO y (4) DeBPO@Fe₃O₄/SiO₂/Bu-BPO.

| | CONCENTRACIÓN | (1) | (2) | (3) | (4) |
|-------------|---------------|------|------|------|------|
| PACIENTE 1 | 10mM | 78,2 | 0 | 1,6 | 76,7 |
| | 1mM | 5,8 | 0 | 3,19 | 14,9 |
| PACIENTE 2 | 10mM | 58,4 | 0 | 3,4 | 62,5 |
| | 1mM | 4,5 | 0 | 2,5 | 8,1 |
| PACIENTE 3 | 10mM | 82,2 | 69,3 | 72,6 | 66,5 |
| | 1mM | 1,8 | 0,5 | 3,2 | 4,7 |
| PACIENTE 4 | 10mM | 72,3 | 57,6 | 58,8 | 69,5 |
| | 1mM | 1,6 | 4,7 | 3,6 | 1,1 |
| PACIENTE 5 | 10mM | 75,3 | 1,7 | 2 | 85,7 |
| | 1mM | 16 | 0 | 0 | 36,9 |
| PACIENTE 6 | 10mM | 89,7 | 60,2 | 85,3 | 67,4 |
| | 1mM | 3,2 | 0,2 | 1,5 | 4,8 |
| PACIENTE 7 | 10mM | 89,8 | 84,9 | 70,9 | 67,4 |
| | 1mM | 13 | 12,6 | 7,7 | 14,4 |
| PACIENTE 8 | 10mM | 79,3 | 75,3 | 53 | 55,6 |
| | 1mM | 1,2 | 4,7 | 3,1 | 4,2 |
| PACIENTE 9 | 10mM | 85,7 | 1,3 | 1,4 | 64,4 |
| | 1mM | 1,4 | 0,2 | 0 | 0 |
| PACIENTE 10 | 10mM | 93,4 | 78,4 | 93,4 | 64 |
| | 1mM | 4,2 | 1,6 | 0 | 0 |
| PACIENTE 11 | 10mM | 93,3 | 88,4 | 79 | 74,4 |
| | 1mM | 0,7 | 2,5 | 0 | 3,7 |
| PACIENTE 12 | 10mM | 91,2 | 85,5 | 69,1 | 63,4 |
| | 1mM | 0,8 | 0,2 | 3 | 4,5 |
| PACIENTE 13 | 10mM | 82,3 | 69,3 | 72,6 | 66,6 |
| | 1mM | 1,8 | 0,5 | 3,2 | 4,8 |
| PACIENTE 14 | 10mM | 72,3 | 0 | 1,3 | 91,9 |
| | 1mM | 5,4 | 0,5 | 2,7 | 5,6 |

Resumen



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Las Reacciones Adversas a Fármacos (RAF) constituyen actualmente un problema sanitario importante debido al gran desconocimiento sobre los mecanismos por los que se desencadenan, lo que se traduce en una ausencia de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas para su diagnóstico. Este problema se ha manifestado en numerosos foros científicos, existiendo un acuerdo unánime entre todas las partes interesadas en este problema (academia, industria, asociaciones de pacientes) para el desarrollo de iniciativas encaminadas a resolver dichas limitaciones. Actualmente nos enfrentamos a dos grandes problemas a la hora de abordar el estudio de los aspectos relacionados con la respuesta inmune (los procesos de reacción adversa a antígenos hapténicos -proceso alérgico- y en particular a fármacos): i) menor sensibilidad de los métodos diagnósticos *in vivo* e *in vitro* que obliga a identificar las nuevas estructuras hapténicas que inducen las reacciones, y ii) una retirada de los kits comerciales habiendo dejado un vacío que debe ser solucionado.

El grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo de tesis doctoral, ha desarrollado una investigación focalizada en dos objetivos básicos: i) disponer de una herramienta que nos permita estudiar el proceso de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas a fármacos; ii) desarrollar test *in vitro* para la detección de las reacciones alérgicas a fármacos.

En base a todos los resultados prometedores obtenidos a lo largo de la trayectoria de investigación del grupo, en esta tesis se ha desarrollado una nueva línea de investigación. Esta se sustenta en el estudio de la síntesis de partículas de sílice como soporte sólido para los nano-conjugados desarrollados previamente dendrímero-hapteno, en los test *in vitro* utilizados actualmente para el diagnóstico de reacciones adversas a fármacos.

Resumen

Uno de los test *in vitro* utilizados actualmente para el diagnóstico de alergias a fármacos (en particular antibióticos betalactámicos) es el RAST (Radio Alergo Sorvent Test). En este tipo de ensayo, el suero del paciente se pone en contacto con un soporte sólido (discos de celulosa) donde se ha anclado en su superficie un homopolipeptido PLL (Poli-L-Lisina), al cual se conjuga el fármaco que se pretende estudiar. Nuestro grupo ha estado trabajando en dos sentidos para mejorar este test en los últimos años. La primera modificación realizada implicó la sustitución del péptido por un dendrímero (macromolécula que emula a esta proteína). En este sentido, se ha desarrollado una metodología eficaz y reproducible para la síntesis de estos conjugados, aumentando la densidad de fármaco que se une a la superficie sólida, dando excelentes resultados de sensibilidad y selectividad. La segunda modificación, ha consistido en la sustitución de la fase sólida por un (nano)material compatible, como zeolitas y (nano)partículas de sílice. En estos trabajos se obtuvieron resultados prometedores en el diagnóstico *in vitro* de pacientes alérgicos a amoxicilina.

Otro de los test empleados en la detección de alergia a fármacos es el Test de Activación de Basófilos (BAT). En este sentido, el grupo también ha demostrado la utilidad de los dendrímeros en este tipo de prueba diagnóstica.

En este proyecto de tesis, se ha llevado a cabo las síntesis de nuevos (nano)materiales híbridos que combinan la alta superficie funcional de las nanopartículas de tamaño conocido con el uso de estructuras multivalentes bien definidas como son los dendrímeros, con el objetivo de seguir con el desarrollo de métodos *in vitro* de detección de IgEs en pacientes alérgicos a fármacos (antibióticos betalactámicos). Los resultados obtenidos se han aplicado a test tipo RAST (Radio Alergo Sorben Test) y BAT (Basofil Activation Test).

Basándonos en estos estudios y en colaboración con el grupo de enfermedades alérgicas a fármacos y alergenicos del Hospital Regional de Málaga - IBIMA, FIMABIS Y BIONAND liderado por la Doctora M.J. Torres, con el que el grupo de investigación tiene una larga y estrecha trayectoria de colaboraciones, se han sintetizado en este trabajo partículas de sílice con el fin de preparar nuevos nanomateriales que contengan estos determinantes antigénicos tan prometedores para desarrollar test *in vitro* para el diagnóstico de pacientes alérgicos a este tipo de fármacos.

1. Síntesis de Partículas de Sílice de diferentes tamaños.

La síntesis de partículas de sílice se ha llevado a cabo utilizando el método de Stöber, uno de los métodos Sol-Gel más citados en la obtención de coloides, cuyo precursor es un tetraalcóxido de silicio.

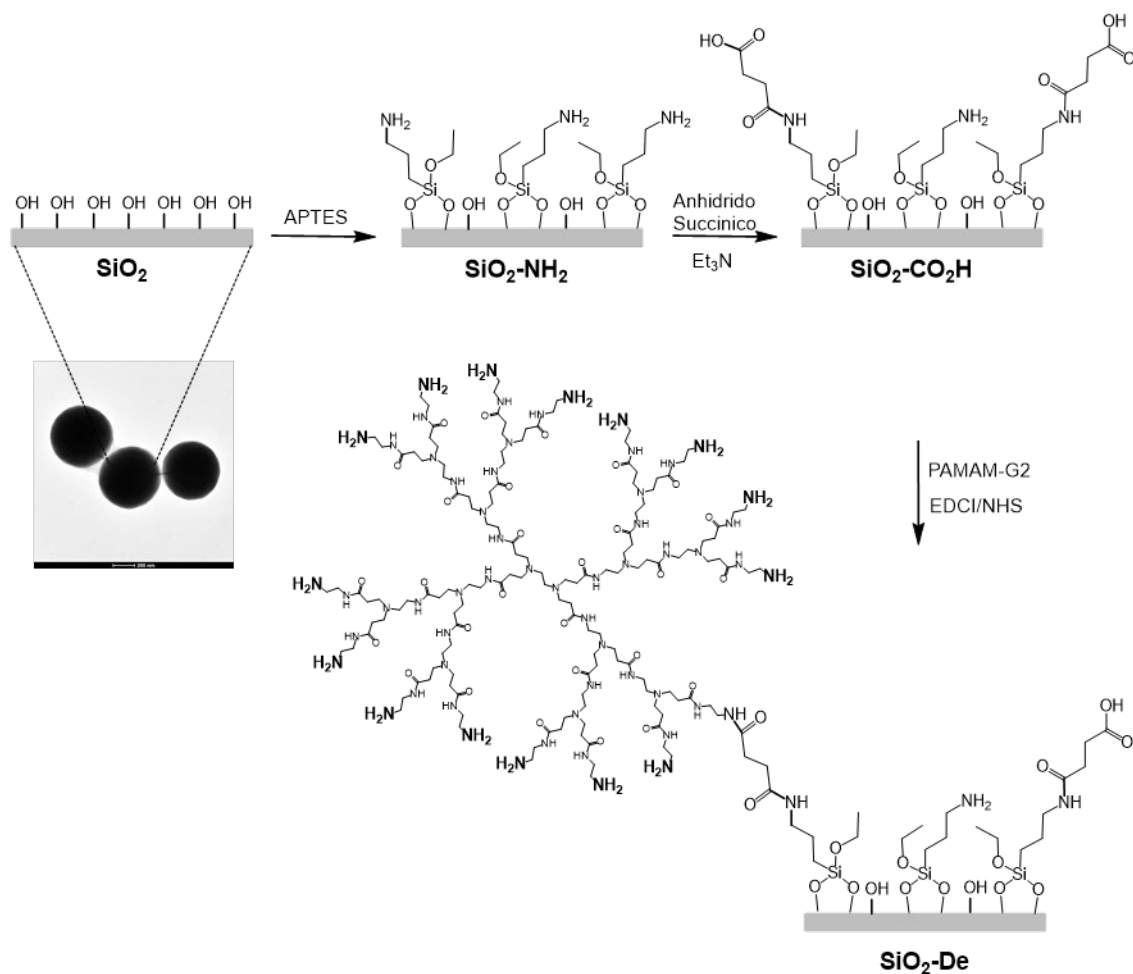
La importancia de obtener nanopartículas con diferentes tamaños reside en que la capacidad de funcionalización de las nanopartículas es dependiente del tamaño, siendo mayor la funcionalización cuanto menor tamaño tenga la partícula (mayor área superficial por gramo de partículas). Esto permitiría aumentar en gran medida la concentración de conjugado hapteno-portador disminuyendo la cantidad de nano-material empleado en cada ensayo. Sin embargo, para la realización hospitalaria de la prueba RAST, es necesario la recuperación del soporte sólido tras los procesos de lavado. En este caso, se realiza por un proceso de centrifugación.

Este proceso es más lento a menor tamaño de nano-conjugado, por lo que se pueden incrementar los tiempos de realización del test, llegando a ser inviables para su uso clínico. Por ello, hay que llegar a un compromiso donde la partícula sea lo suficientemente grande para que el tiempo de centrifugación sea rápido y lo suficientemente pequeña para tener la mayor área superficial posible. De esta manera, se emplea menor cantidad de partículas y suero para obtener una detección eficaz.

Manteniendo el compromiso citado anteriormente, en este trabajo hemos sintetizado partículas de 500 y 200 nm decoradas con DeAn para mejorar el diagnóstico mediante RAST, ampliando además el estudio a otros fármacos (como bencilpenicilina). Por otro lado, es importante citar las limitaciones que presentan los ensayos RAST, como la dependencia de un isótopo radiactivo, instalaciones específicas y personal capacitado. Para evitar la realización de ensayos que implican trabajar con radioactividad, se propone otra prueba de diagnóstico de alergia a medicamentos *in vitro* como es el test de activación de basófilos (BAT). Esta pretende imitar la activación celular *in vivo* mediada por IgE y liberación del mediador, siendo esta prueba útil para evaluar reacciones mediadas por IgE para una variedad de fármacos inyectables, ya que no es necesario utilizar conjugados fármaco-portador. Sin embargo, su sensibilidad depende del fármaco involucrado. Esta técnica, se basa en la determinación de marcadores de activación expresados en la superficie de los basófilos después de la interacción del fármaco con sIgE. Sin embargo, la falta de conocimiento de los mecanismos de activación ha obstaculizado una aplicación clínica más amplia. Los fármacos betalactámicos no son capaces de activar basófilos por sí mismos. Para ello se requiere su conjugación con una molécula portadora, que generalmente se encuentra presente en la sangre. El conjugado generado ha de ser lo suficientemente grande como para permitir la reticulación de dos sIgE unidas a la superficie del basófilo. Sin embargo, se dispone de muy poca información sobre el tamaño y la composición de estos conjugados. El uso de conjugados bien definidos de hapteno-portador sería una herramienta valiosa para la investigación del mecanismo a través del cual ocurre la activación. De aquí, que en este trabajo de investigación se hayan sintetizado nanopartículas de diferentes tamaños (20 y 50 nm) decoradas con DeAn para estudiar la activación del basófilo

La modificación de la superficie de las partículas se ha llevado a cabo mediante el siguiente procedimiento Una primera reacción con aminopropiltriétoxissilano (APTES), para introducir grupos amino en la superficie de la partícula. Estos grupos se hacen reaccionar posteriormente con anhídrido succínico, para introducir grupos ácidos carboxílicos en la superficie de la partícula. Estos grupos se hacen reaccionar con el dendrímero PAMAM de segunda generación.

Una vez anclado covalentemente el dendrímero a la partícula, se realiza el último paso de modificación del dendrímero con el fármaco a estudiar. En este trabajo, los fármacos que hemos comenzado a estudiar son amoxicilina bencilpenicilina y ambos unidos al mismo dendrímero



Esquema de reacción 1: Síntesis y funcionalización de las partículas de sílice.

La monitorización del proceso de modificación superficial de las partículas se ha llevado a cabo empleando diferentes técnicas, como la cuantificación del número de grupos aminos primarios libres presente en la superficie de las partículas, mediante Test de ninhidrina, TEM, DLS y Z-Potencial. Las técnicas como TEM y DLS nos han dado información sobre la homogeneidad y el tamaño de la muestra, mientras que las medidas de Z-potencial y FTIR nos han permitido conocer en valores cualitativos el tipo de grupo funcional que hay en la superficie de la nanopartícula. Además, han realizado estudios de por RMN de sólidos para comprobar la correcta funcionalización del fármaco en la superficie de la partícula. Los resultados obtenidos de todas las técnicas de caracterización son reproducibles y coherentes con la síntesis y funcionalización propuesta.

Todos los tamaños de partículas sintetizados y funcionalizados en su superficie con determinantes antigénicos han sido probados mediante ensayos RAST en el laboratorio del grupo de enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional de Málaga - IBIMA, FIMABIS Y BIONAND liderado por la Doctora M.J. Torres

2. Síntesis de Partículas con núcleo magnético recubiertas de una capa de Sílice.

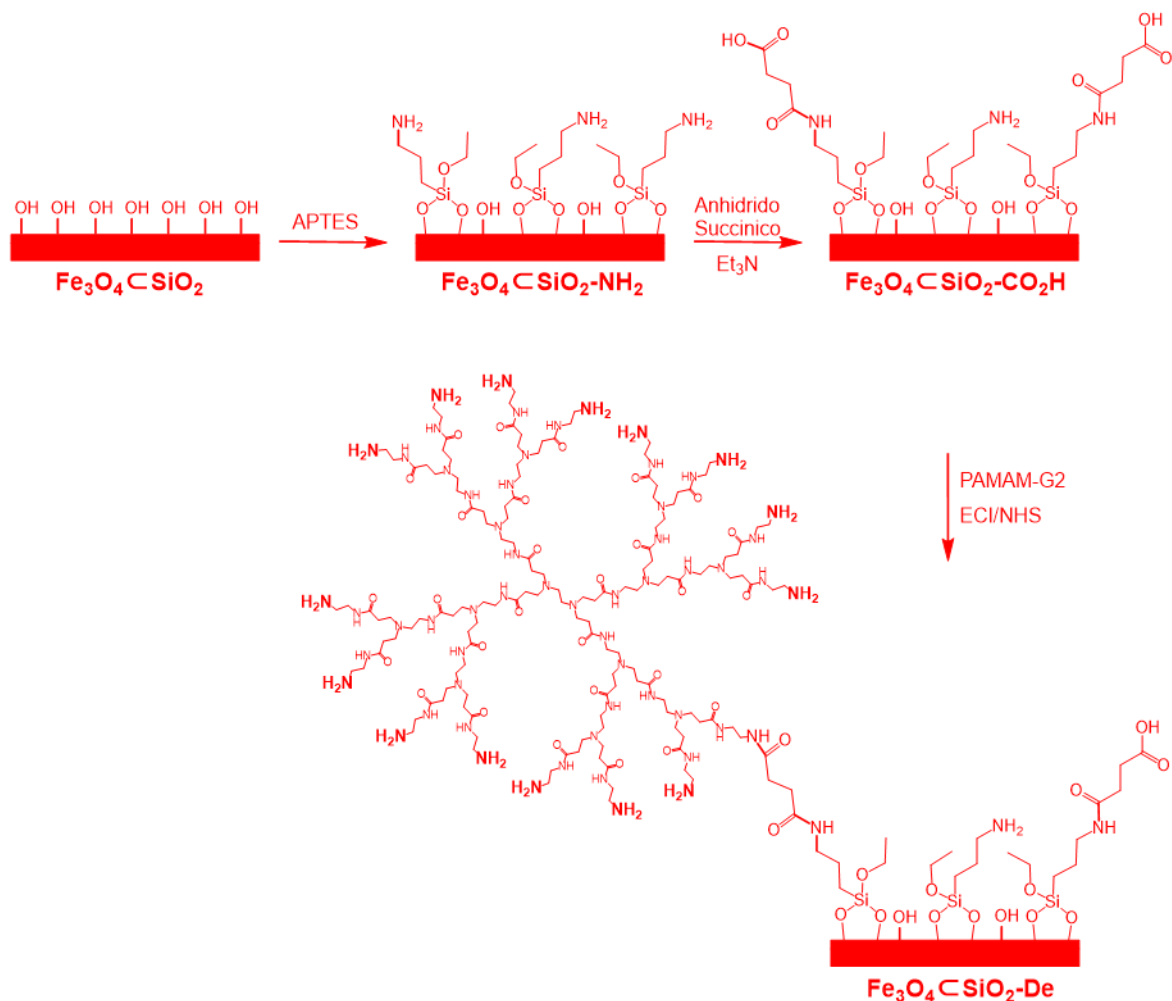
El desarrollo de RAST con partículas de sílice consta de dos etapas de incubación, entre las cuales hay que llevar a cabo procesos de lavado. La recuperación de la fase sólida por centrifugación. Esto genera un problema a la hora de optimizar los tiempos del test ya que a menor tamaño de partícula tenemos mayor área superficial, es decir una mayor funcionalización, pero a su vez aumentamos los tiempos de centrifugación por lo que se aumenta directamente el tiempo de realización de dicho test. Este hecho nos lleva a tener que adoptar un compromiso entre tamaño de partícula y tiempo de centrifugación como hemos expuesto en los anteriores puntos.

Para solucionar este problema, hemos desarrollado en este trabajo de tesis una alternativa como son las partículas de núcleo magnético (Fe_3O_4) recubiertas de una capa de sílice. Este tipo de partículas permiten la misma funcionalización en su superficie que las partículas de sílice debido a su recubrimiento con sílice, permitiendo eliminar las etapas de centrifugación, ya que los lavados constan de la imantación de las partículas para separarlas del sobrenadante, pudiendo así utilizar partículas de tamaños menores y por consecuencia ganando área superficial y disminuyendo el tiempo de realización del test.

Los tamaños sintetizados para el estudio de este tipo de materiales mediante inmunoensayo ensayo RAST han sido 15, 30, 50 y 200nm.

La reacción de formación de la partícula de hierro se ha llevado a cabo haciendo reaccionar una mezcla en cantidades estequiométricas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, etilenglicol, NaOAc (seco) y polietilenglicol. Una vez formada la partícula, se ha hecho reaccionar EtOH absoluto, NH_3 concentrado, H_2O y Tetraetilortosíliceto para formar una capa de sílice alrededor de la partícula de hierro.

Una vez en este punto, la modificación de la superficie de las partículas se ha llevado a cabo de manera análoga al método descrito en el apartado anterior.



Esquema de reacción 2: Síntesis y funcionalización de las partículas de Fe_2O_3 recubiertas de sílice

Al igual que en el caso anterior, la caracterización de estas partículas modificadas en su superficie se lleva a cabo mediante Test de ninhidrina, TEM y Z-Potencial. La técnica como TEM nos da valores sobre la homogeneidad y el tamaño de la muestra, mientras que el Test de ninhidrina y el Z-potencial nos da valores tanto cualitativos como cuantitativos sobre los grupos funcionales que están anclados a la superficie de la nanopartícula. Además de estudios mediante XPS, hemos podido comprobar la correcta funcionalización del fármaco en la superficie. Todos los resultados obtenidos de las diferentes técnicas de caracterización han resultado ser muy reproducibles y coherentes con la síntesis propuesta.

Todos los tamaños de partículas sintetizados y funcionalizados en su superficie con determinantes antigénicos han sido probados mediante ensayos RAST en el laboratorio del grupo de enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional de Málaga - IBIMA, FIMABIS Y BIONAND liderado por la Doctora M.J. Torres