

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Reducción selectiva de anticuerpos para su anclaje a soportes sólidos mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno. Aplicación a la detección de Mioglobina con y sin marcaje.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARINA SAYAS CORTÉS
TUTORA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

Curso académico 2017-2018
VALENCIA, 09 de julio de 2018

Reserva de todos los derechos

Reducción selectiva de anticuerpos para su anclaje a soportes sólidos mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno. Aplicación a la detección de mioglobina con y sin marcaje.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en la unión europea, representando un 40% de los fallecimientos totales. Es por ello que disponer de dispositivos para su diagnóstico clínico rápidos, y que actúen en el punto de necesidad es una de las demandas crecientes en el segmento de mercado de los dispositivos de tipo "point-of-care" (POC).

Los biomarcadores cardíacos que se encuentran en el torrente sanguíneo comprenden distintas proteínas cuyas concentraciones son muy variables, yendo desde ng/L, como es el caso de la Troponina cardíaca I, hasta mg/L, como es el caso de la proteína C-reativa.

Los ensayos en formato heterogéneo, en los cuales los analitos son reconocidos por elementos de captura específicos inmovilizados sobre un soporte sólido, son especialmente interesantes en los dispositivos POC. En este tipo de ensayos es necesaria la inmovilización eficiente de las sondas de captura sobre el soporte, y el tipo de inmovilización preferida suele ser el enlace covalente. Los soportes sólidos pueden actuar bien como transductor o bien como soporte inerte. De entre los formatos heterogéneos, el formato de micromatriz y las tecnologías de sensado basadas en óptica integrada resultan de gran interés, las primeras por su alta capacidad de trabajo y las segundas por la posibilidad de trabajar en ausencia de marcaje y con alta sensibilidad.

El presente trabajo plantea la puesta a punto de un sistema heterogéneo para detectar mioglobina, que es biomarcador cardíaco, sobre un soporte de vidrio con el fin de realizar detección fluorescente en formato micromatriz, y trasladarlo posteriormente a materiales en base silicio para su aplicación en sensado nanofotónico sin marcaje.

Por ello, se propone la reducción selectiva de anticuerpos contra mioglobina, su inmovilización y la puesta a punto del inmunoensayo en micromatriz con detección fluorescente, tanto en formato directo como en formato sándwich. Posteriormente, las condiciones optimizadas en formato micromatriz se transferirán a un dispositivo de óptica integrada para demostrar el sensado sin necesidad de marcaje. Para el anclaje de los anticuerpos responsables del reconocimiento se utilizará una reacción fotoinducida consistente en el acoplamiento entre grupos tiol del anticuerpo, previamente reducido en su región bisagra, y grupos alqueno de la superficie.

Los ensayos realizados demuestran que la irradiación a $\lambda = 254$ nm es necesaria para la fijación de las medias inmunoglobulinas G (hIgG) a la superficie funcionalizada mediante la reacción del tiol-eno. Además, se comprueba que con las hIgGs se alcanza el doble de sensibilidad que con las inmunoglobulinas G (IgGs) enteras. Finalmente, se determina la sensibilidad del sistema, siendo de 0,001 $\mu\text{g/mL}$ en el formato directo.

Los resultados de este trabajo se espera que contribuyan al diseño de un dispositivo POC, con detección basada en tecnología nanofotónica, que se está desarrollando en el grupo en el marco de un proyecto europeo del programa H2020 denominado PHOCNOSIS (H2020-PHC-634013, *Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases*).

Palabras clave: inmunoensayo, foto-click-chemistry, derivatización de superficies, *microarray*, nanobiosensado.

Abstract

Cardiovascular diseases constitute the main death cause in the European Union, representing 40% of total deaths. It is for that reason that having devices for their quick clinic diagnosis and that they act in the exact needed location is one of the most increasing claims in the market sector of point-of-care (POC) devices.

Cardiac biomarkers that are found in the bloodstream comprise different proteins of which concentrations are very variable, covering from ng/L, so as cardiac troponin 1, to mg/L, so as C-reactive protein.

Heterogeneous format assays, in which analytes are recognised by specific capture elements, immobilised in a solid support, are specially interesting in POC devices. In this kind of assays, the efficient immobilisation of the probes in the support is needed, and the preferred immobilisation way is used to be covalent binding. Solid surfaces can act as transductor or also as inert surface. Among heterogeneous formats, the micromatrix format and technologies based on integrated optic sensing turn out to be really interesting, the first ones because of their high working capacity, and the second ones due to the possibility of working in absence of any labelling method and with high sensitivity.

The current work contemplates the set-up of a heterogeneous system to detect myoglobin, which is a cardiac biomarker protein, over a glass surface, to develop an immunoassay with fluorescent detection in micromatrix format, and its further transferring into silica-based materials for its application in non-labelling nanophotonic sensing.

Thus, it is proposed the selective reduction of anti-myoglobin antibodies, their immobilisation and the setup of the immunoassay in micromatrix format using fluorescent detection, both in direct and sandwich forms. Afterwards, the optimised conditions in micromatrix format will be transferred into an integrated optic device in order to demonstrate the label free sensing. The antibodies which are responsible for the recognition will be anchored to the surface by means of a photoinduced reaction which consists of the coupling between the antibody thiol groups, which have been previously reduced in their hinge region, and alkene groups located in the surface.

The assays demonstrate that the irradiation at $\lambda = 254$ nm is necessary for the fixation of the half immunoglobulins G (hIgGs) to the functionalized surface by means of the thiol-ene reaction. Furthermore, it is proved that with hIgGs the achieved sensibility is two times higher than the one obtained with the entire immunoglobulins G (IgGs). Finally, the sensitivity of the system is determined as 0.001 $\mu\text{g/mL}$ in the direct format.

It is expected that the results of this work would contribute to the design of a POC device, with nanophotonic technology based detection, which is currently being developed in the group in a European project framework of the Horizon2020 programme named PHOCNOSIS (H2020-PHC-634013, Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases).

Keywords: immunoassay, photo-click-chemistry, surface derivatization, microarray, nanobiosensing.

Alumna: Marina Sayas Cortés
Valencia, 09 de julio de 2018
Tutora: María José Bañuls Polo

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, **M^a José Bañuls**, la gran oportunidad que me ha dado en su laboratorio. Me gustaría darle las gracias por todo lo que he aprendido de ella; por su tiempo, su dedicación y su comprensión, y por hacerme mejor científica.

Quiero agradecer también a Rafa Alonso y Pilar Jiménez por guiarme en mis inicios y durante mi estancia en el laboratorio, y por su paciencia mientras he estado trabajando con ellos.

A mis amigos, en primer lugar a los biotecnólogos, como ya os dije en su momento, sin vosotros no habría podido acabar la carrera. En especial a Guille, Piski, Amparo y Carla por haber estado siempre ahí y por comprender mis 'no puedo, tengo ensayo'. En segundo lugar a los de siempre, y finalmente a Moni, por haber hecho tanto por mí.

A mi familia, porque sin vosotros no sería quien soy ni habría llegado hasta aquí. Papo por ponerme los pies en la tierra, mami por saber escucharme e Iso por haber estado a mi lado toda su vida. Muchísimas gracias.

Por último, necesito agradecer a la que ha sido y será mi compañera de vida desde que tengo 5 años. Gracias a la danza por haber sido el motor de mi día a día.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN LA ACTUALIDAD.....	1
1.2. LA TECNOLOGÍA DE <i>MICROARRAY</i>.....	1
1.2.1. Definición de <i>microarray</i> . Tipos.....	1
1.2.2. Aspectos a considerar.....	2
1.2.2.1. Elección del soporte.	2
1.2.2.2. Superficies.....	2
1.2.2.3. Elección de la sonda.	3
1.2.2.4. Métodos de inmovilización de anticuerpos.....	4
1.2.2.4.1. Reacciones de “química-click”.....	4
1.2.2.4.2. Reacción de acoplamiento tiol-eno.	5
1.2.3. Método de detección.	6
1.3. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MEDIO ANTICUERPO.....	7
1.4. BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	7
1.4.1. Proteína C-reactiva.	8
1.4.2. Troponina cardíaca I.....	8
1.4.3. Mioglobina.....	8
1.5. CONTEXTO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTE TFG: PROYECTO PHOCNOSIS.....	9
2. OBJETIVOS.	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. MATERIALES.....	12
3.1.1. Reactivos.....	12
3.1.2. Instrumentación y software.....	13
3.2. MÉTODOS.....	13
3.2.1. Activación y funcionalización de la superficie de vidrio.....	13
3.2.2. Activación y funcionalización de la superficie de SOI. Regeneración.	14
3.2.3. Protocolo de obtención de medio anticuerpo α -Mb sonda.....	14
3.2.4. Caracterización de los medios anticuerpos mediante electroforesis de proteínas.	15
3.2.5. Protocolo de marcaje de mioglobina.....	15
3.2.6. Protocolo de marcaje de anticuerpo secundario de detección.	16

3.2.7. Protocolo de impresión e inmovilización de los anticuerpos en el <i>microarray</i>	17
3.2.8. Ensayos de reconocimiento de mioglobina en formato <i>microarray</i>	17
3.2.8.1. Formato directo.	17
3.2.8.2. Formato sándwich.	18
3.2.9. Medida fotónica.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEDIO ANTICUERPO.....	20
4.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS MARCADOS CON ETIQUETA FLUORESCENTE. RESULTADOS DEL MARCAJE FLUORESCENTE DE LA MIOGLOBINA Y DEL ANTICUERPO SECUNDARIO.....	25
4.3. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SOPORTES.	26
4.4. ENSAYOS PARA EL SISTEMA Mb/ α -Mb EN VIDRIO Y FORMATO <i>MICROARRAY</i>	27
4.4.1. Optimización de la concentración de sonda y comparativa IgG vs hIgG	27
4.4.2. Ensayo sensibilidad hIgG α -Mb para Mb.....	30
4.4.2.1. Formato directo.	30
4.4.2.2. Formato sándwich.	32
4.5. ENSAYOS Mb/ α -Mb EN SOL.....	34
4.6. MEDIDA FOTÓNICA.	35
5. CONCLUSIONES.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema de las etapas de un <i>microarray</i> de proteínas diana	2
Figura 2. Representación esquemática de una inmunoglobulina G	4
Figura 3. Inmovilización de las hlgG en la superficie silanizada mediante reacción de acoplamiento tiol-eno	5
Figura 4. Esquema de los dos tipos de formato <i>microarray</i> que se utilizan en el presente trabajo	6
Figura 5. Reducción de una IgG en los puentes disulfuro de la región bisagra para escindirse en dos fracciones hlgG.	7
Figura 6. Proteínas marcadoras de riesgo cardiovascular contempladas en el trabajo	9
Figura 7. Logo del proyecto PHOCNOSIS.	10

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 8. Equipo de medida fotónica del NTC empleado para realizar la medida fotónica.....	19
---	----

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 9. Equipo de electroforesis empleado: <i>NuPAGE™ Bis-Tris Welcome Pack, 4-12%, 12-well Invitrogen™</i>	21
Figura 10. PAGE comparativa entre IgG y hlgG a diferentes concentraciones	23
Figura 11. PAGE comparativa entre IgG y hlgG comparando entre distintas temperaturas y tampones.....	24
Figura 12. PAGE comparativa entre IgG y hlgG α -BSA, α -Mb, α -CRP y α -cTnl	25
Figura 13. Medida de WCA de un chip de vidrio	27
Figura 14. Medida de WCA de un chip de SOI.....	27
Figura 15. Esquema de impresión de las disoluciones de IgG y hlgG α -Mb e imagen de un chip para la optimización de la concentración de la misma.....	29
Figura 16. Gráfico de barras la intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones de Mb* para el ensayo de optimización de la concentración de sonda	30

Figura 17. Esquema de impresión de las disoluciones de hIgG α -Mb e imagen de un chip para el ensayo de sensibilidad en formato directo.....	31
Figura 18. Gráfico de barras intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones de Mb* para el ensayo en formato directo.....	31
Figura 19. Esquema de impresión de las disoluciones de hIgG α -Mb e imagen de un chip para el ensayo de sensibilidad en formato sándwich.....	32
Figura 20. Gráfico de barras intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones de Mb para el ensayo en formato sándwich.....	33
Figura 21. Gráfico de barras intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones de Mb* para el ensayo de sensibilidad.....	34
Figura 22. Representación del índice de refracción a medida que avanza el experimento fotónico	35

ÍNDICE DE TABLAS

1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Muestras y condiciones empleadas en las PAGEs que se han realizado para la caracterización de las inmunoglobulinas.	22
Tabla 2. Concentración de Mb* y α -Mb*, cantidad de <i>Alexa Fluor</i> ® 647 y relación de marcaje.	26

Abreviaturas:

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
C	Dominio constante del anticuerpo
CRP	<i>C-reactive protein</i> (Proteína C-reactiva)
cTnI	<i>Cardiac troponin I</i> (Troponina cardiaca I)
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECV	Enfermedades cardiovasculares
H	Cadena pesada del anticuerpo (<i>heavy</i>)
hIgG	<i>Half</i> (media) inmunoglobulina G
hsCRP	highly-sensitive CRP
IgG	Inmunoglobulina G
L	Cadena ligera del anticuerpo (<i>light</i>)
LDS	Dodecilsulfato de litio
Mb	Mioglobina
Mb*	Mioglobina marcada con Alexa Fluor® 647
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>
POC	<i>Point-of-care</i>
SFR	<i>Surface fluorescence reader</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOI	<i>Silicon-on-insulator</i>
t.a.	Temperatura ambiente
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>
UV	Ultravioleta
V	Dominio variable del anticuerpo
WCA	<i>Water contact angle</i>
α -BSA	Anticuerpo anti-BSA
α -CRP	Anticuerpo anti-CRP
α -cTnI	Anticuerpo anti-cTnI
α -Mb	Anticuerpo anti-Mb
α -Mb*	Anticuerpo anti-Mb marcado con Alexa Fluor® 647

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN LA ACTUALIDAD.

Las técnicas de diagnóstico son los procedimientos que se llevan a cabo en el diagnóstico médico y que comprenden el conjunto de tests y pruebas que se realizan con la finalidad de identificar la causa de un desorden o una enfermedad. Incluyen técnicas pasivas como exámenes físicos sencillos que requieren de pocas herramientas y se basan mayormente en habilidades prácticas y manuales, así como técnicas activas que precisan de equipación compleja y de técnicos preparados (SCITECHNOL, 2018).

Muchas de estas técnicas de diagnóstico se basan en el uso de biomarcadores. Un biomarcador es una característica, ya sea una molécula, células específicas, genes, productos génicos, enzimas, hormonas... que puede ser medida de forma objetiva como un indicador de un proceso patogénico, un proceso biológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Strimbu & Tavel, 2010). El uso de los biomarcadores en las técnicas de diagnóstico ha despuntado como una técnica prometedora en el formato del *microarray* o chip de proteínas, no obstante, todavía no ha sido explorado todo su potencial (Rusimi et al., 2007).

1.2. LA TECNOLOGÍA DE MICROARRAY.

1.2.1. Definición de *microarray*. Tipos.

Un *microarray*, también denominado chip, consiste en una cuadrícula o sustrato sólido que contiene pequeñas cantidades de molécula sonda a una densidad muy alta agrupadas en *spots* o puntos de tamaño micrométrico. Esto permite el cribado de analitos con alta capacidad de trabajo, monitorizando simultáneamente distintos analitos para la misma muestra. Con el desarrollo de la secuenciación de DNA en alto procesamiento, se abrió un nuevo campo de posibilidades de investigación, destacando los *microarrays* de DNA, tipología de *microarray* que resultó la primera en emerger. No obstante, la búsqueda de una plataforma metodológica para el estudio del proteoma humano que permitiera, de forma análoga a los chips de DNA, manejar esta gran cantidad de datos sobre las distintas proteínas y sus variantes, permitió el desarrollo de los chips de proteínas. Es una técnica versátil y potente para múltiples aplicaciones, tales como análisis de la actividad enzimática, interacción proteína-proteína y proteína-ácido nucleico, interacciones entre dianas y fármacos o interacciones entre dianas y otros ligandos (Zhu et al., 2001) (INSTITUTO ROCHE, 2018) (CHEN et al., 2018).

A grandes rasgos, los *arrays* de proteínas pueden clasificarse en *microarrays in situ*, en fase reversa y *microarrays* diana ("target"). Los chips *in situ* son aquellos empleados en sistemas de expresión libres de células, y la sonda se sintetiza en el momento sobre el chip. Por otra parte, los *microarrays* en fase reversa se generan gracias a la inmovilización de tejidos, fluidos corporales o lisados celulares, de esta forma las proteínas de interés se detectan mediante anticuerpos específicos contra ellas. Finalmente, los chips de proteínas diana constan de agentes de captura o sondas de distinta naturaleza, como anticuerpos o proteínas

recombinantes, que se inmovilizan sobre el soporte y que serán incubados con la muestra de interés (Figura 1) (INSTITUTO ROCHE, 2018). Este último tipo es el que se va a desarrollar en este trabajo, un chip de proteínas basado en anticuerpos como sonda. Estos tipos de chips se pueden implementar en alto rendimiento, tienen alta sensibilidad, requieren de volúmenes de muestra pequeños y, gracias a su más reciente estandarización, se han desarrollado protocolos experimentales manejables (Zhu et al., 2001).

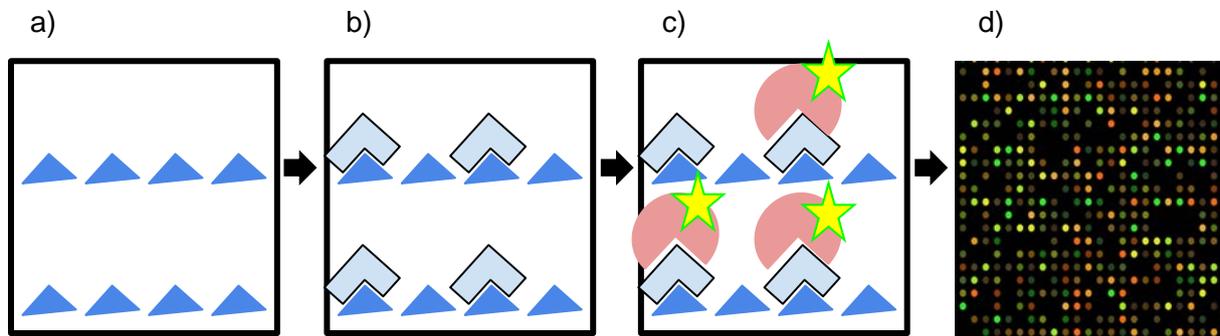


Figura 1. Esquema de las etapas de un microarray de proteínas diana. a) Funcionalización de la superficie. b) Impresión de la proteína sonda que se fija sobre la superficie derivatizada y bloqueo. c) Lavado de la sonda no anclada e incubación con el analito marcado. d) Lavado del analito que no haya interactuado y escaneado del chip para cuantificar la cantidad de analito marcado unido a la sonda.

1.2.2. Aspectos a considerar.

El chip de proteínas ideal debería estar formado por una superficie del material apropiado, que facilite el proceso de detección y que, en su caso, actúe de transductor, y por otra capa orgánica que será la que interactúe con las proteínas. Esta superficie orgánica necesita estar modificada con grupos activos que reaccionen con fracciones específicas de la proteína, en este caso el anticuerpo a inmovilizar como sonda, en concreto en una orientación tal que permita la exposición de los sitios de unión hacia la solución de muestra (Rusmini et al., 2007).

1.2.2.1. Elección del soporte.

Actualmente existen diferentes tipos de soportes para el análisis de *microarrays* de alta capacidad de trabajo. Por una parte, destacan los chips planos en 2 dimensiones: membranas de nitrocelulosa, vidrio, oro, plásticos, etc; estos constituyen la tipología más comúnmente utilizada. Por otra parte, existen los chips tridimensionales de gel de acrilamida o agarosa, que mantienen un ambiente acuoso y reducen, así, la evaporación. También minimizan la contaminación cruzada y permiten la recuperación de moléculas capturadas. Finalmente destacan los chips con nano o micropocillos de polidimetilsiloxano, que permiten las reacciones en disolución y, en consecuencia, la posterior recuperación de las moléculas capturadas. La elección del soporte dependerá de los objetivos particulares que se busquen alcanzar con el ensayo *microarray*.

1.2.2.2. Superficies.

La superficie, tal y como se ha comentado anteriormente, determina el anclaje de la sonda y, por tanto, es un aspecto muy importante en la etapa de preparación del chip. En este trabajo se emplean chips planos bidimensionales de vidrio y de *Silicon-on-insulator* (SOI). La elección de estos materiales se debe a que este TFG se enmarca en el proyecto

europeo PHOCNOSIS, que se realiza en colaboración con el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV (NTC), y que se explicará detalladamente con posterioridad. En este proyecto se trabaja con un sistema de detección en el cual el transductor es de SOI, de ahí el interés de realizar ensayos en este material. Para poner a punto la técnica de inmovilización de las sondas se emplea un material más asequible, manejable y fácil de conseguir como es el vidrio, que se puede modificar químicamente de manera análoga al *Silicon-on-insulator*, y posteriormente se traslada a este material. Los materiales basados en silicio presentan ventajas cuando se utilizan en superficies de biosensado puesto que son altamente estables en un amplio rango de temperaturas, inertes frente a muchos disolventes, biocompatibles, presentan una mejor uniformidad del *spot* y permiten una gran versatilidad en cuanto a procedimientos de funcionalización química (Escorihuela et al., 2014).

En todos los casos, se necesita una modificación previa de la superficie para poder anclar los bioreceptores específicos. Para ello, en el presente trabajo se va a realizar una activación mediante irradiación de luz ultravioleta para generar radicales hidroxilo en la superficie. Posteriormente, para el anclaje específico de los bioreceptores se usa la química de los organosilanos, que es ampliamente utilizada en materiales en base silicio.

1.2.2.3. Elección de la sonda.

La elevada selectividad o habilidad de los anticuerpos de unirse únicamente a una diana específica ha conllevado un uso extendido de estos en biosensado (Sharma & Mutharasan, 2013), destacando las inmunoglobulinas G como los anticuerpos mayormente empleados en estos tipos de análisis (Alonso et al., 2018).

Las inmunoglobulinas G constan de cuatro cadenas proteicas (Figura 2), dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), que a su vez están compuestas por dominios constantes (C) y variables (V), que son los característicos de cada IgG que varían para ofrecer selectividad frente a las dianas. Una cadena H y una cadena L está unidas por puentes disulfuro, interacciones covalentes entre la parte carboxilo terminal de la cadena ligera y el dominio C_H^1 de la cadena pesada, además de interacciones no-covalentes de carácter hidrofóbico entre los dominios V_L y V_H y entre C_L y C_H^1 . Estos dímeros H L se mantienen unidos en la región bisagra de la IgG gracias a más puentes disulfuro, que son los que se busca reducir selectivamente a grupos tiol libres para obtener dos fragmentos hIgG (*half* IgG), fracciones cuyo uso como sonda se evaluará en los *microarrays* del presente trabajo. Trabajos previos han demostrado que con estas hIgG se obtienen resultados el doble de sensibles que con las IgG enteras gracias a que se permite un anclaje al chip de forma orientada, con el parátipo dirigido hacia la muestra a analizar (Sharma & Mutharasan, 2013).

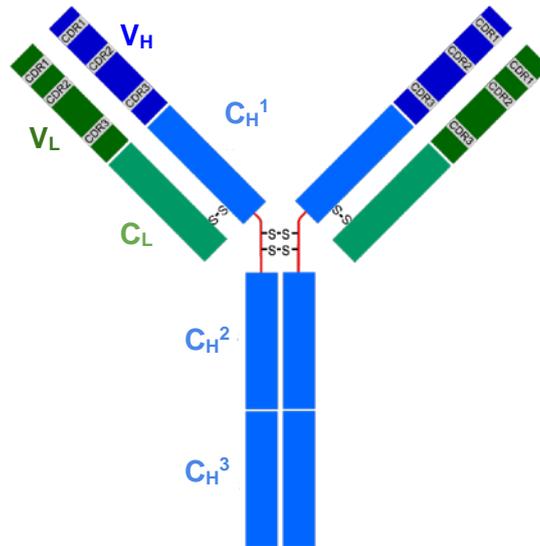


Figura 2. Representación esquemática de una inmunoglobulina G. Se muestran las cadenas pesadas en azul y las variables en verde. Se han señalado los distintos dominios constantes y variables en cada una de ellas, y las regiones hipervariables (CDR), así como los puentes disulfuro que mantienen la estructura. La región bisagra se marca en rojo.

1.2.2.4. Métodos de inmovilización de anticuerpos.

Uno de los puntos clave para fabricar *microarrays* de altas prestaciones es el modo cómo se inmovilizan las sondas de captura. Los métodos de inmovilización de sondas a soportes sólidos más comúnmente empleados son adsorción, interacción por afinidad y anclaje covalente. No obstante, para las superficies de silicio se ha establecido como el más adecuado este último puesto que es altamente estable, reproducible, permite el direccionamiento de la sonda, reduce el ruido de fondo y aumenta la eficiencia de reconocimiento respecto a una inmovilización no covalente. Una de las maneras más sencillas y versátiles de introducir grupos funcionales en nuestras superficies de trabajo, que puedan ser empleados en la inmovilización covalente de las sondas, es la química de los organosilanos. De esta forma, se pueden agregar a la superficie grupos tales como amino, carboxilo, vinilo o tioles, entre otros (Escorihuela et al., 2012).

1.2.2.4.1. Reacciones de “química-click”.

Se conocen como *click-chemistry* el conjunto de reacciones que presentan una serie de atributos altamente interesantes, de acuerdo con la guía formulada por Sharpless y colaboradores (Kolb et al. 2001). Así, poseen las características de ortogonalidad con otros procedimientos sintéticos comunes, condiciones de reacción muy suaves, estabilidad en condiciones fisiológicas, uso de catalizadores (como la luz) y disolventes inocuos, alta velocidad de reacción, insensibilidad a la presencia de oxígeno, estereoespecificidad, facilidad de manejo, y generalmente altos rendimientos. Estas reacciones comprenden desde cicloadiciones hasta reacciones de adición a dobles enlaces (como la reacción de acoplamiento tiol-eno) o de sustitución nucleofílica. En consecuencia, estos tipos de reacciones de “química-click” han encontrado numerosas aplicaciones (Kolb et al., 2001).

1.2.2.4.2. Reacción de acoplamiento tiol-eno.

La reacción de acoplamiento tiol-eno satisface todos los requerimientos deseados en una reacción de “química-click”: es altamente eficaz y rápida, se desarrolla con altos rendimientos bajo condiciones de reacción suaves, no genera productos secundarios ni necesita de disolventes perjudiciales para el medio ambiente, es tolerante a una gran variedad de grupos funcionales, puede darse en medio acuoso, lo que resulta interesante para emplear esta metodología con biomoléculas, y es ortogonal. Además, por el hecho de estar activada mediante luz, permite la localización de los receptores únicamente en el punto que se precise mediante irradiación selectiva a través, por ejemplo, de una fotomáscara, aspecto crítico en cuanto al desarrollo de biosensores eficientes.

El grupo de investigación en el cual se desarrolla este TFG tenía experiencia previa en este tipo de reacción de “química-click” para su aplicación en anclaje de sondas a *microarrays*, en concreto trabajando con *oligos* que poseían grupos tiol como tipología de molécula sonda. Sin embargo, esta aproximación no se había llevado a cabo utilizando anticuerpos puesto que planteaba la problemática de la generación de dichos grupos tiol. En consecuencia, se propuso la ruptura de los puentes disulfuro localizados en la región bisagra de las inmunoglobulinas G para poder emplearlos en el anclaje de la fracción de anticuerpo mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno (Alonso et al., 2018) (Escorihuela et al., 2012). Para la inmovilización de anticuerpos en la superficie del chip se van a aprovechar los puentes disulfuro presentes en su estructura, que serán previamente reducidos a grupos tiol. Por otra parte, empleando la química del organosilano se introducirán grupos vinilo en la superficie del *microarray*. Se trata, por tanto, de una reacción de adición al doble enlace C=C que permitirá el anclaje de las hlgG de forma mucho más específica y orientada que las IgG puesto que en el caso de las hlgG la reacción se dará entre los grupos vinilo y los grupos tioles en la región bisagra obtenidos mediante la reducción de las IgG tal y como se muestra en la Figura 3.

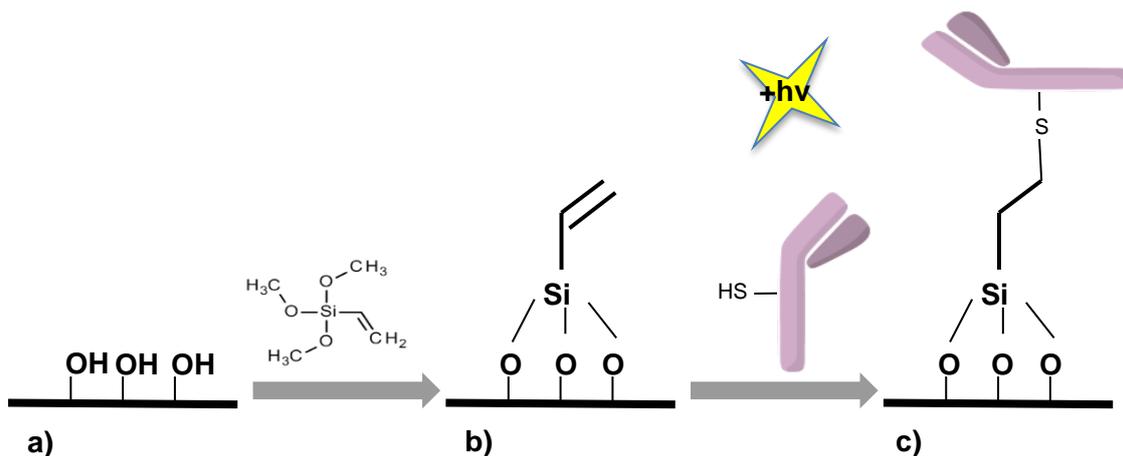


Figura 3. Inmovilización de las hlgG en la superficie silanizada mediante reacción de acoplamiento tiol-eno. a) Activación de la superficie mediante exposición a luz UV $\lambda = 254 \text{ nm}$ para generar radicales hidroxilo. b) Funcionalización química de la superficie activada con trietoxivinilsilano. c) Reacción tiol-eno fotoinducida entre los grupos vinilo y los grupos tioles de las hlgG. Anclaje de la sonda orientada hacia la disolución muestra.

1.2.3. Método de detección.

Para evaluar la idoneidad de un test de diagnóstico es importante valorar la sensibilidad y límite de detección, el rango dinámico, la capacidad de multiplexado y el nivel de resolución. Muchos de estos parámetros van a venir determinados por el tipo de detección empleada. Actualmente en los *arrays* de proteínas se distinguen dos tipos de métodos de detección, los basados en etiquetas y los libres de etiquetas.

En primer lugar, en cuanto a los métodos basados en etiquetas, estos han sido los más desarrollados hasta el momento a causa de la amplia disponibilidad tanto de reactivo como de instrumentación, y se siguen introduciendo nuevas estrategias como las nanoetiquetas basadas en *quantum dots*, nanotubos de carbono o la combinación de microesferas fluorescentes y citometría de flujo. El marcaje con etiqueta convencional se basa en el uso de la fluorescencia, y es el que se emplea en el presente trabajo. En este tipo de marcaje se buscan fluoróforos que minimicen la interacción con otras biomoléculas, tengan elevada intensidad y sean versátiles a la hora de conjugarse químicamente con otros compuestos. También se debe tener en cuenta la naturaleza de la muestra y del soporte, así como de los espectros de excitación y de emisión del fluoróforo. En función de la molécula marcada en el inmunoensayo distinguimos entre ensayo directo y en formato sándwich (Figura 4)

En el formato directo la sonda anclada sobre la superficie del chip interacciona con el analito marcado, es decir, se detecta este producto directamente. Por otra parte, en el formato sándwich el analito que interacciona con la sonda se encuentra libre de etiqueta, y su presencia se detecta mediante la adición de un anticuerpo contra este analito, llamado anticuerpo de detección, estando dicho anticuerpo marcado para su posterior detección.

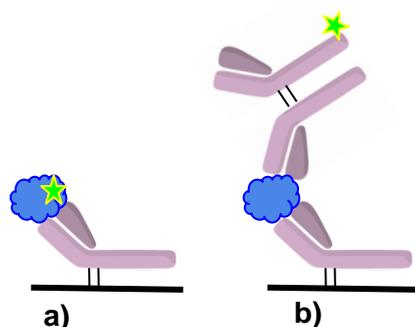


Figura 4. Esquema de los dos tipos de formato microarray que se utilizan en el presente trabajo. a) Formato directo. b) Formato sándwich.

En segundo lugar, a pesar del gran uso de los métodos anteriores, existe un creciente interés en la búsqueda de metodologías de detección que vayan más allá de la necesidad de etiquetas. Son los denominados métodos *label-free*, es decir, libres de etiqueta. De esta forma se evitan los impedimentos estéricos causados por su presencia o la reactividad cruzada, abaratan costes y simplifican el proceso, sin embargo, se debe tener en cuenta que la tecnología es más elaborada puesto que se necesita que sean compatibles con los formatos multiplexados, que se alcance una cierta sensibilidad y rango dinámico y que sea capaz de detectar moléculas pequeñas. Como ejemplos se encuentran la resonancia de plasmón superficial o las tecnologías basadas en óptica integrada, como cristales fotónicos o interferómetros Mach-Zehnder (INSTITUTO ROCHE, 2018).

1.3. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MEDIO ANTICUERPO.

Para poder llevar a cabo la reacción de inmovilización que se propone en el trabajo, es necesario generar tioles libres en el anticuerpo ya que la mayoría se encuentran formando puentes disulfuro. Por eso, en este trabajo se plantea el uso de una reducción selectiva de los puentes disulfuro en la región bisagra del anticuerpo, de manera que, tras la inmovilización sobre soportes alquenilados mediante la reacción tiol-eno, se dispongan los fragmentos de anticuerpo en la superficie orientando su parátipo hacia la disolución de muestra. Se espera así mejorar las prestaciones con respecto a las inmovilizaciones convencionales de anticuerpos completos, y desarrollar un método rápido, sencillo y de fácil implementación. En primer lugar, se deben reducir selectivamente las inmunoglobulinas (IgG) en su región bisagra para obtener sus mitades (hIgG). Para poder llevar a cabo esto se necesita un agente reductor apropiado. Se ha comprobado que con algunos agentes reductores como la mercaptoetilamina ocurre una sobre-reducción y se escinden puentes disulfuro adicionales entre las cadenas ligeras y pesadas, lo que conlleva una pérdida de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo. En consecuencia, el agente reductor escogido en este trabajo ha sido Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (Alonso et. al., 2018). Además, este agente reductor presenta la ventaja de que no contiene grupos tioles en su estructura, cosa que sí ocurre con otros reductores como el 2-mercaptoetanol o el ditioneitol, por lo que no es capaz de interferir ni alterar la estructura de las hIgG que haya reducido, ni de competir con estas por los sitios de unión en la superficie del chip (Sharma & Mutharasan, 2013).

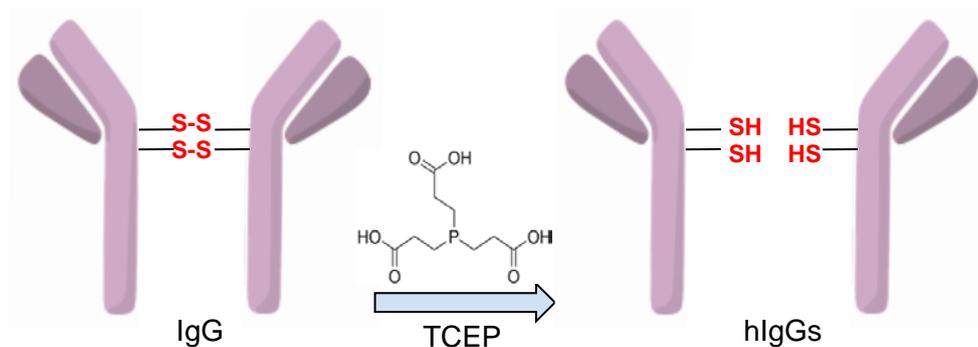


Figura 5. Reducción de una IgG en los puentes disulfuro de la región bisagra para escindirse en dos fracciones hIgG.

1.4. BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

Los biomarcadores de riesgo cardiovascular son moléculas, principalmente proteínas, aunque también destacan algunos ácidos nucleicos, presentes en el organismo que se emplean para la evaluación clínica de pacientes que tienen un pronóstico pobre de estas enfermedades (Karaismailoğlu et al., 2018), así como para la clasificación de los pacientes según el riesgo que presentan (Herencia, 2011). No obstante, se necesita un sistema muy sensible que permita determinar de forma precisa y reproducible la concentración de estos biomarcadores, ya que la diferencia de cantidad entre un individuo sano y otro con cierto riesgo es muy pequeña. Esto se puede conseguir utilizando la metodología de los

microarrays, que además permiten el multiplexado del ensayo, si se quiere utilizar un panel de biomarcadores. De entre las proteínas que pueden considerarse biomarcadores cardiacos, en este TFG se ha trabajado con proteína C-reactiva, troponina cardiaca I y con mioglobina (OMICSONLINE, 2018).

1.4.1. Proteína C-reactiva.

La proteína C-reactiva (CRP) (Figura 6a) es un polipéptido plasmático circulante producido por el hígado, cuya síntesis y secreción se incrementa durante la llamada fase aguda de la inflamación. Tiene un rol en la activación del complemento, entre otras funciones en colaboración con él. En consecuencia, los niveles de CRP en el plasma pueden verse aumentados hasta 10.000 veces. Es por esto que tradicionalmente se ha considerado esta proteína como un biomarcador de la inflamación, no obstante, estudios recientes han revelado que elevaciones mantenidas de CRP a unos niveles más bajos que los que se presentan durante un proceso inflamatorio (hsCRP) representan un biomarcador de aumento del riesgo cardiovascular. En concreto, partiendo de un riesgo cardiovascular bajo como línea base, los pacientes acaban presentando un riesgo cardiovascular moderado (hsCRP 1-3 mg/L) o incluso alto (hsCRP >3 mg/L) en algunos casos (Piciu et al., 2013).

1.4.2. Troponina cardíaca I.

La troponina (Figura 6b) es un complejo regulatorio de 3 subunidades proteicas (C, I y T) localizada en el sistema contráctil de las fibras musculares cardiacas y esqueléticas (Karaismailoğlu et al., 2018). La troponina C se une a iones calcio, la troponina T a la tropomiosina, y la troponina I se une a la actina de forma que inhibe la interacción entre la actina y la miosina.

Centrándose en la troponina cardíaca I (cTnI), es exclusiva del tejido del miocardio. Se trata, por tanto, de un biomarcador altamente específico y sensible para detectar daños en el miocardio, especialmente aquellos asintomáticos (Hughes et al., 2015). Los niveles plasmáticos de cTnI aumentan considerablemente tras un infarto de miocardio a causa de la muerte celular y de la reestructuración del tejido que se produce. Además, cTnI puede aumentar también previamente a una isquemia en pacientes que sufren posteriormente insuficiencia cardiaca (Wang et al., 2018)

1.4.3. Mioglobina.

La mioglobina (Figura 6c) es una proteína sarcoplásmica, responsable del transporte y almacenamiento del oxígeno dentro del tejido muscular tanto cardiaco como esquelético. Se trata de un biomarcador temprano sensible de daño celular. Cuando se produce una lesión en el músculo esquelético o en el corazón (músculo cardiaco), la mioglobina se libera hacia la sangre. Los niveles de mioglobina ya aumentan al cabo de 1 hora después de una lesión, como por ejemplo un infarto de miocardio, y pueden por lo tanto medirse. Se alcanza un máximo alrededor de las 4-12 horas y después retorna al nivel basal. No obstante, no se puede diferenciar la mioglobina procedente del músculo esquelético de la liberada como resultado de una lesión cardiaca (Karaismailoğlu et al., 2018).

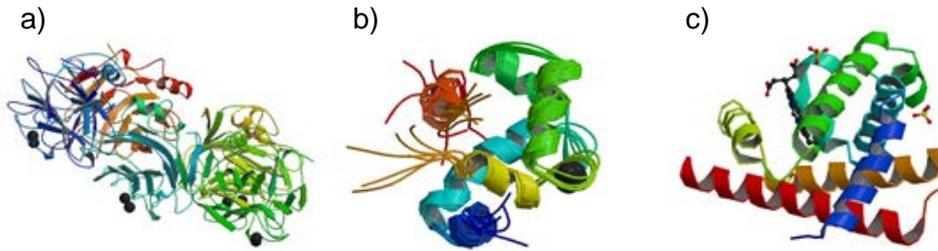


Figura 6. Proteínas marcadoras de riesgo cardiovascular contempladas en el trabajo. a) Proteína c-reactiva humana. b) Estructura del complejo troponina cardiaca C-troponina cardiaca I. c) Mioglobina humana.

1.5. CONTEXTO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTE TFG: PROYECTO PHOCNOSIS.

El trabajo que se lleva a cabo en este TFG se enmarca dentro de un proyecto de la Unión Europea financiado por el programa *Horizon2020* denominado “*Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases (PHOCNOSIS)*” (Figura 7). Este proyecto busca el desarrollo de un dispositivo *point-of-care* (POC) ultrasensible, compacto y de bajo coste basado en tecnología nanofotónica y micro/nanofluídica para su aplicación en la detección temprana mínimamente invasiva de enfermedades cardiovasculares (CVD). Este dispositivo POC se espera que ayude a reducir significativamente los costes actuales que supone este proceso de detección temprana y a implementar los programas de cribado de masas, permitiendo una contribución significativa a la mejora del estatus de salud ciudadana y a la sostenibilidad de los sistemas de cuidado de la salud.

La participación de la UPV en este proyecto engloba a dos centros. Por un lado, el Centro de Tecnología Nanofotónica de la UPV (NTC) y, por otro lado, el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM). El trabajo de este TFG se desarrolla principalmente en este último, cuyas tareas particulares para el proyecto PHOCNOSIS son la síntesis química, la modificación química de la superficie de diferentes tipos de soportes, el anclaje de biomoléculas, el desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en el reconocimiento molecular, la caracterización de biosuperficies y la integración del biosensado. De forma adicional también colabora en la definición de protocolos de análisis experimentales. (PHOCNOSIS CONSORTIUM, 2018)

En consecuencia, se espera que el trabajo realizado en el presente TFG contribuya al proyecto PHOCNOSIS mediante la puesta a punto de un sistema heterogéneo de detección de mioglobina, marcador de riesgo de CVD, basado en un inmunoensayo utilizando hIgGs, para su detección fluorescente en formato micromatriz y su transferencia a un dispositivo de óptica integrada con el fin de demostrar el sensado sin necesidad de marcaje.



Figura 7. Logo del proyecto PHOCNOSIS (PHOCNOSIS CONSORTIUM, 2018).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

En este TFG, desarrollado en el marco de un proyecto europeo financiado por el programa *Horizon2020*, se busca la puesta a punto de un inmunoensayo en micromatriz en distintos soportes para detectar mioglobina, empleando detección fluorescente, tanto en formato directo como en formato sándwich; y su transferencia a un sistema de detección sin marcaje.

Este objetivo global se podría descomponer en los siguientes hitos particulares:

1. Funcionalizar la superficie de vidrio para tener grupos alqueno reactivos.
2. Establecer un protocolo de fotoinmovilización de medio anticuerpo en chips de vidrio para un sistema mioglobina/anticuerpo anti-mioglobina (Mb/ α -Mb):
 - a. Reducir los anticuerpos a medio anticuerpo empleado como sonda en el *microarray*, así como su caracterización mediante técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida empleando dodecilsulfato de litio (LDS-PAGE) de proteínas.
 - b. Optimizar las condiciones del ensayo *microarray* en vidrio con IgG y hlgG α -Mb y de los límites de sensibilidad tanto en formato directo como sándwich.
3. A partir de los resultados obtenidos con el sistema en vidrio, estudiar la posible transferencia a un soporte de SOI para aplicarlo en detección nanofotónica sin marcaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Reactivos.

Los reactivos albúmina de suero bovino (BSA) ($\geq 98\%$, polvo liofilizado) y mioglobina (Mb) ($\geq 96\%$, disolución en 0,15% NaCl, 0,05% *Phosphate buffered saline* (PBS), pH 7,5) fueron suministrados por la casa comercial *Sigma-Aldrich* (Madrid, España) y por la casa *abcam* (Cambridge, UK) respectivamente.

Las inmunoglobulinas G: IgG α -Mb (ambos anticuerpos, de captura y de detección), IgG anti-BSA (α -BSA), y el fluoróforo *Alexa Fluor® 647* fueron proporcionados por la casa comercial *ThermoFischer*.

Los filtros de ultracentrífuga de 100 kDa, 50 kDa y 10 kDa fueron proporcionados por *Merck Millipore*.

El azul de Coomassie Bio-Safe™ Coomassie Stain fue adquirido de la casa comercial Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España).

Los portaobjetos y cubreobjetos son de la casa comercial *labbox* (Barcelona, España).

Los chips de SOI y fotónicos fueron proporcionados por el Centro de Tecnología Nanofotónica (NTC) de la UPV.

La punta de wolframio empleada para cortar los portaobjetos de vidrio, el tolueno, el reactivo TCEP y el trietoxivinilsilano fueron suministrados por la casa comercial *Sigma-Aldrich* (Madrid, España), así como el etanol, el agua Mili-Q, la acetona, el 2-propanol, el metanol y el ácido acético.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la electroforesis se adquirieron de *ThermoFischer* en el pack de bienvenida del kit NuPAGE™ Bis-Tris, 4-12% con 12 pocillos de Invitrogen™: geles prefabricados *NuPAGE 4-12% Bis-Tris*, *NuPAGE LDS (4X)*, agente reductor *NuPAGE (10X)*, tampón de electroforesis MES-SDS *NuPAGE MES*, patrón de pesos moleculares pretintado *PageRuler Plus*, de 10 a 250 kDa.

Los tampones empleados en los distintos ensayos, tanto para la preparación de disoluciones como para los lavados, fueron los siguientes: tampón acetato (0,15 M acetato de sodio, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH = 4,5), tampón bicarbonato (0,1 M bicarbonato sódico pH = 8,3), PBS 1x (fosfato sódico dibásico 0,8 mM, fosfato sódico monobásico 2 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,5), PBS-T 1x (fosfato salino-Tween al 0,1%), PBS-T 1x 10% suero (suero humano diluido 10% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%), PBS-T 1x 1% suero (suero humano diluido 1% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%). El suero humano (de sangre coagulada de hombre AB de origen estadounidense, filtrado y esterilizado) se obtuvo de *Sigma-Aldrich* (Madrid, España).

3.1.2. Instrumentación y software.

Para la activación de los chips y para catalizar las reacciones entre las sondas y la superficie se empleó el instrumento UV-Ozone Cleaning System de la casa comercial FHR (Ottendorf, Ockrilla, Alemania), con emisión a $\lambda = 254$ nm.

Se ha empleado una microcentrífuga de la casa *ThermoFischer*, así como una ultracentrífuga Medifriger-BLT JP SELECTA S.A. (Barcelona, España).

El kit de electroforesis se trata del pack de bienvenida NuPAGE™ Bis-Tris, 4-12% con 12 pocillos de Invitrogen™

Para preparar los tampones se ha utilizado un pHmetro SevenCompact de *Mettler Toledo* (Barcelona, España)

El ytensiómetro empleado para la medición de los ángulos de contacto es el modelo 'Attension Theta Lite' de la casa *Biolin Scientific*.

Para la impresión de los *microarrays* se empleó un sistema de impresión sin contacto y aguja de material cerámico AD1500 de Biodot Inc. (Irvine, CA, EEUU).

En el ensayo fotónico se utilizó el equipo de medida fotónica del NTC, que consta de un láser, un colimador láser, una estructura para sujetar el chip y las vías de entrada y salida de disoluciones y una cámara de detección de infrarrojos.

Para la detección fluorescente se emplearon dos equipos. Por una parte, un lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera (SFR) que utiliza LEDs para la iluminación y una cámara CCD para la detección (Mira et al., 2004). Por otra parte, un escáner Axon GenePix-4000B de medidas 34cm x 20cm x 44cm, con láser de excitación $\lambda = 532$ nm y 635 nm, resolución de píxel 5-100 μ m, que emplea un fotomultiplicador dual para la detección (Morais et al., 2007).

Para el análisis de los *microarrays* se utilizó el paquete informático GenePix Pro v6.0.1.27.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Activación y funcionalización de la superficie de vidrio.

Los chips de vidrio se obtuvieron a partir del corte de portaobjetos en fragmentos de $\approx 2 \times 1$ cm² empleando una punta de wolframio. Se lavaron con agua y 2-propanol y se secaron con aire comprimido. Para su activación se irradiaron durante 7 minutos en un limpiador de superficies de ozono, UVOH-cleaner, $\lambda = 254$ nm, (50 mW/cm²).

Inmediatamente después se mantuvieron durante 2 horas en agitación sumergidas en una disolución de trietoxivinilsilano al 2% en tolueno a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se volvieron a lavar con agua y 2-propanol y se secaron con aire comprimido. Finalmente, los chips de vidrio fueron incubados durante 20 minutos a 90 °C.

Se caracterizó la superficie mediante ángulo de contacto con agua (WCA) para evidenciar la presencia de grupos alqueno en la superficie.

3.2.2. Activación y funcionalización de la superficie de SOI. Regeneración.

Los chips de SOI se activan análogamente a los de vidrio, pero manteniéndolos en el ozonizador a $\lambda = 254$ nm durante 10 minutos. Su funcionalización también sigue exactamente el mismo procedimiento. Para la caracterización de la superficie se empleó WCA.

Estos chips de SOI se regeneran aproximadamente 3 veces, para volver a utilizarlos, se considera que han llegado a su máximo ciclo de regeneración cuando el ángulo de contacto tras la funcionalización sea menor del esperado para este material o cuando aparecen pequeñas manchas. El procedimiento de regeneración consta de una irradiación de 10 minutos a $\lambda = 254$ nm en el ozonizador y de un lavado con etanol seguido de otro con agua. Finalmente se secan con aire comprimido.

Destacar que, en el caso de los chips de SOI, su manipulación se lleva a cabo empleando pinzas de plástico ya que las metálicas que se usaban anteriormente en el caso de los chips de vidrio pueden rayar su superficie.

3.2.3. Protocolo de obtención de medio anticuerpo α -Mb sonda.

Para la obtención del medio anticuerpo (hIgG) que actuará de sonda de captura se debe reducir selectivamente los puentes disulfuro de la región bisagra.

Para ello, en primer lugar, se intercambié el medio en el que se encuentran las IgG, a tampón acetato pH = 4,5. Se emplearon 40 μ L de preparación comercial de IgG y se realizan ciclos de ultracentrifugación empleando un filtro para centrífuga de 100 kDa. Los pasos que se siguieron fueron:

- Activación del filtro con 500 μ L de tampón acetato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Filtrado de IgG α -Mb 40 μ L y 260 μ L de tampón acetato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Dos lavados con 500 μ L de tampón acetato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Recogida de la muestra invirtiendo el filtro (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

Las IgG purificadas fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop.

A continuación, para llevar a cabo la reducción selectiva, se incubaron durante 90 minutos a 37 °C en presencia de 25 mmol/L de TCEP usando un termobloque.

Finalmente, las correspondientes hIgG fueron purificadas empleando un filtro de centrífuga de 50 kDa y realizando el mismo procedimiento de ciclos en la ultracentrífuga que anteriormente se han detallado (activación, filtración, dos lavados y recuperación del filtrado). La concentración de la disolución fue determinada empleando el espectrofotómetro NanoDrop

3.2.4. Caracterización de los medios anticuerpos mediante electroforesis de proteínas.

IgG α -BSA fueron purificadas previamente en el laboratorio empleando una columna de afinidad de proteína A. Estas IgG α -BSA y sus correspondientes hIgG α -BSA se utilizaron para llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

En esta PAGE se emplearon disoluciones de concentraciones de 0,1 g/L, 0,2 g/L y 0,5 g/L de ambos IgG y hIgG para preparar las muestras de la siguiente manera:

1. 10 μ L de la muestra. Para las disoluciones de IgG se usó tampón PBS y para hIgG, tampón acetato pH = 4,5.
2. 6,5 μ L de agua Mili-Q
3. 3,5 μ L de LDS

Se monta la cubeta de electroforesis y se prepara el tampón de electroforesis a partir de 25 mL de tampón *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid* (MES) 20x comercial y diluyendo con agua desionizada hasta 500 mL. Los geles se adquieren ya preparados, y tras lavar los pocillos por triplicado con 1 mL de tampón de electroforesis, se coloca el gel en la cubeta y se rellena de tampón de electroforesis hasta el cátodo. Los 20 μ L totales de las seis muestras se cargaron en los pocillos del gel; asimismo se cargan 6 μ L de patrón de pesos moleculares pretintado *PageRuler Plus*, de 10 a 250 kDa en otro pocillo. Finalmente se llena completamente la cubeta de tampón de electroforesis, se cierra, se conecta a la fuente de alimentación y se deja correr a voltaje constante 200 V durante 35 minutos.

Una vez ha pasado el tiempo necesario para la separación de los componentes en el gel, se para el equipo, se abre la cubeta y se saca el gel. Se abre el cassette con una espátula y se corta el peine y la parte inferior haciendo incisiones con la misma. Con cuidado se introduce en una cubeta y se tiñe con azul de Coomassie, 100 mL han sido suficientes para que cubra bien el gel, durante 1 hora en agitación. Se recupera el Coomassie, se eliminan posibles restos con agua destilada y se realizan 3 lavados con metanol (40%) y ácido acético (10 %) para eliminar el exceso de tinte. Cada lavado es de 15 minutos en el agitador. Por último, se rehidrata el gel en agua durante toda la noche.

Siguiendo este mismo protocolo se realizaron otras PAGEs variando las condiciones de las muestras.

3.2.5. Protocolo de marcaje de mioglobina.

Se emplearon 300 mg de mioglobina para su marcaje fluorescente. En primer lugar, se intercambió el tampón de la mioglobina comercial usando un filtro de 10 kDa. Se emplearon 73 μ L a concentración 4,1 mg/mL y se intercambió a tampón bicarbonato pH = 8,3. Para ello se realizaron ciclos de ultrafiltración en el siguiente orden:

- Activación del filtro con 500 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Filtrado de Mb 73 μ L y 227 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Dos lavados con 500 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Recogida de la muestra girando el filtro (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

A continuación, se preparó la disolución de fluoróforo *Alexa Fluor® 647*. Éste se encuentra liofilizado por lo que se deben disolver los 0,1 mg que contiene el vial en 10 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) removiendo bien. De este volumen solamente fueron utilizados 4 μ L para el marcaje de la Mb, los restantes 6 μ L se congelaron para el posterior marcaje del anticuerpo secundario para el ensayo sándwich. El procedimiento de manejo del fluoróforo una vez deja de estar liofilizado debe realizarse muy rápidamente para evitar su inactivación, por lo que, tras la disolución del liofilizado, se añadieron los 4 μ L inmediatamente y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos en oscuridad.

Pasado el tiempo se repitió el procedimiento de ultrafiltración para purificar la mioglobina marcada con el fluoróforo (Mb*) empleando un filtro de 10 kDa. Los pasos que se siguieron fueron:

- Activación del filtro con 500 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Filtrado de Mb* 60 μ L y 240 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Dos lavados con 500 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Recogida de la muestra girando el filtro (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

Por último, el producto final, 70 μ L, se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop, tras diluirlo con 140 μ L de PBS. De esta forma se obtuvo una concentración de Mb* de 0,34 mg/mL con una relación de marcaje 1:4. Se realizaron alícuotas de 40 μ L y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.2.6. Protocolo de marcaje de anticuerpo secundario de detección.

El anticuerpo de detección α -Mb se encuentra en el stock a una concentración de 0.4 mg/mL. Se usaron 60 μ L de disolución, es decir, 24 μ g de IgG, que se purificaron y se intercambiaron a tampón bicarbonato pH = 8.3 empleando la ultracentrífuga con un filtro de 100 kDa mediante el siguiente procedimiento:

- Activación del filtro con 500 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Filtrado de α -Mb 60 μ L y 240 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Dos lavados con 500 μ L de tampón bicarbonato (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Recogida de la muestra invirtiendo el filtro (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

Se recuperaron 57 μ L de muestra, a los que se le añadieron los 6 μ L de la disolución de *Alexa Fluor® 647* en DMSO que se habían guardado congelados tras el marcaje de la mioglobina. Se dejó en agitación durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para evitar dañar el fluoróforo.

A continuación, se procedió a purificar el α -Mb* en la ultracentrífuga con un filtro de 100 kDa de forma análoga al procedimiento de purificación de Mb*:

- Activación del filtro con 500 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Filtrado de α -Mb* 62 μ L y 238 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Dos lavados con 500 μ L de tampón PBS (12300 rpm, 6 minutos, 17 °C)
- Recogida de la muestra girando el filtro (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop resultando en 50 μL de disolución $\alpha\text{-Mb}^*$ con una concentración de 3 mg/mL y una relación de marcaje 1:2. Se realizaron alícuotas de 10 μL , congelando 4 y diluyendo la quinta en 300 μL de PBS para obtener una concentración de $\alpha\text{-Mb}^*$ de 0,1 mg/mL, puesto que este reactivo iba a usarse posteriormente

3.2.7. Protocolo de impresión e inmovilización de los anticuerpos en el *microarray*.

Primeramente, se deben preparar las disoluciones a imprimir en el *microarray*. En este caso todas se encuentran en tampón acetato pH = 4,5. A continuación se cargaron las disoluciones que se van a imprimir en una placa de 384 pocillos.

Para la impresión de las sondas de anticuerpo $\alpha\text{-Mb}$ en los chips previamente funcionalizados se utilizó un equipo de impresión sin contacto Biodot a una humedad relativa del 90%. El programa seleccionado varía en función del ensayo a realizar. En este caso el tipo de *array* que se imprimió fue uno ajustado para 8 chips rectangulares como máximo en los que la cantidad de filas impresas es equivalente al número de concentraciones diferentes de hIgG sonda que se analizan. Para los análisis llevados a cabo se utilizaron concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ y 400 $\mu\text{g/mL}$. En cada fila se imprimen 4 *spots* o réplicas y se dispensa un volumen de 25 o 50 nL según el experimento.

Una vez el Biodot hubo impreso el *microarray* diseñado sobre el chip, se dejó a temperatura ambiente para que se secaran las gotas dispensadas. Luego se irradiaron los chips durante 5 segundos a $\lambda = 254 \text{ nm}$ para que se diera la reacción del tiol-eno, y se lavaron con PBS-T y con agua para eliminar el exceso de sonda no anclada.

3.2.8. Ensayos de reconocimiento de mioglobina en formato *microarray*.

Partiendo de los chips con la sonda inmovilizada como se ha detallado anteriormente, se realizaron dos tipos de inmunoensayos:

3.2.8.1. Formato directo.

Se prepararon las disoluciones de mioglobina marcada con el fluoróforo *Alexa Fluor® 647* en PBS-T (suero humano diluido 10% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%) en las concentraciones y condiciones en las que se fueron a utilizar: 5 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y 0 $\mu\text{g/mL}$. Para garantizar el reconocimiento de la Mb^* por la sonda, se añadieron 10 μL de disolución sobre cada chip y se cubrieron con un cubreobjetos con el fin de asegurar que la disolución de Mb^* se ha extendido cubriendo toda la zona de reconocimiento. Se deja que se produzca el reconocimiento durante 30 minutos, en oscuridad, a temperatura ambiente.

Transcurrido este periodo de incubación, se retira el cubreobjetos con cuidado y se lava el chip con PBS-T y agua destilada, secándose con aire comprimido. Finalmente, los chips lavados se analizan en un lector de fluorescencia de superficies (LFS) de fabricación propia

equipado con LEDS para la iluminación y cámara CCD para la detección. Se empleó un tiempo de adquisición de 8 s y una ganancia de 3 para el caso del vidrio y 15 s a una ganancia de 5 para los soportes de SOI. Las imágenes adquiridas se trataron con el software GenePix Pro v6.0.1.27.

Una vez puesto a punto, este mismo ensayo directo en vidrio se repitió y se analizó utilizando como método de detección un equipo Axon GenePix-4000B con la finalidad de mejorar la sensibilidad. Las dos condiciones que se compararon fueron el uso de Mb* en PBS-T 10% suero humano y PBS-T 1% suero humano. Las concentraciones empleadas de hlgG sonda fueron 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL, mientras que las concentraciones de Mb* utilizadas se fijaron como 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,005 µg/mL, 0,001 µg/mL y 0,0005 µg/mL. La ganancia se ajustó a 700.

3.2.8.2. Formato sándwich.

El ensayo en formato sándwich se realiza de forma análoga al ensayo directo, sin embargo, se emplea Mb sin marcaje fluorescente a unas concentraciones de 5 µg/mL, 3 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0,5 µg/mL. También se prepararon las disoluciones de anticuerpo α -Mb* de detección en las concentraciones pertinentes según el ensayo: 50 µg/mL, 100 µg/mL o 400 µg/mL. Además, el volumen de dispensación del BioDot para imprimir los *spots* en el chip fue el doble que el empleado en el formato directo, 50 nL en lugar de 25 nL.

Tras los lavados con PBS-T y agua destilada posteriores a los 30 minutos de incubación con Mb a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadieron 10 µL de disolución de α -Mb* y se uniformizó sobre el chip disponiendo un cubre sobre la superficie. Se dejó en incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante otros 30 minutos para que se produjera el reconocimiento entre Mb y α -Mb* y después se lavaron de nuevo con PBS-T y agua destilada, secándose con aire comprimido.

Finalmente, los chips se midieron en el LFS de manera análoga al apartado anterior. Las imágenes adquiridas se trataron con el software GenePix Pro v6.0.1.27

3.2.9. Medida fotónica.

Se funcionalizó un chip fotónico proporcionado por el Centro de Tecnología Nanofotónica (NTC) de la UPV de forma análoga a un chip plano de SOI, según se explica en el apartado 3.1.2. De la misma forma se midió el WCA del chip.

A continuación, se realizó el ensayo en las instalaciones del NTC. Empleando un *set-up* fotónico del centro (Figura 8), se le ajustó una lámpara UV $\lambda = 254$ nm lo más cerca posible del chip y se alineó el sistema. Los reactivos que se utilizaron fueron sonda hlgG α -Mb 10 µg/mL en PBS y Mb* en PBS-T 1x (suero humano diluido 1% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%) a 1 µg/mL y 0,1 µg/mL. En una primera etapa, se estudió la fijación de hlgG. Para ello se dejó fluir PBS durante 10 minutos, a continuación, la disolución de hlgG α -Mb durante otros 10 minutos, y seguidamente se encendió la lámpara UV mientras fluía dicha disolución durante otros 10 minutos más. Al final se apaga la lámpara y se vuelve a fluir PBS para la etapa de lavado de la sonda no anclada. En la segunda etapa se evaluó la fijación y

detección de Mb* sobre la sonda hIgG. Para esto se fluyó PBS-T durante 10 minutos, a continuación, disolución de Mb* 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 minutos, PBS-T durante otros 10 minutos para realizar un lavado de la Mb* que no haya interaccionado, seguidamente la otra disolución de Mb* a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 minutos, y un lavado final con PBS-T durante 10 minutos.

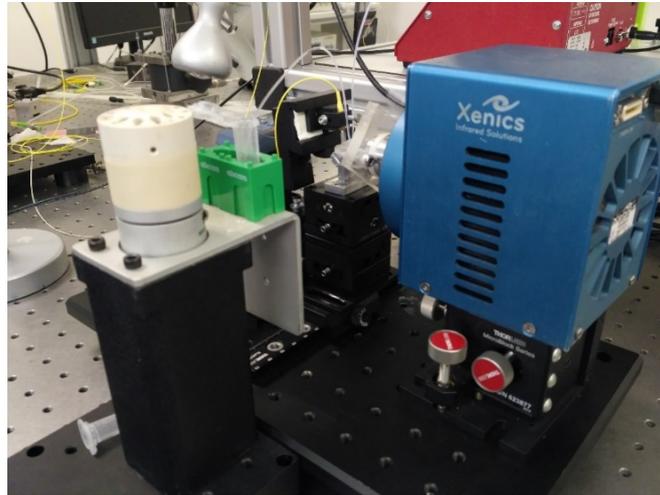


Figura 8. Equipo de medida fotónica del NTC empleado para realizar la medida fotónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este trabajo se pretende mejorar la sensibilidad de los ensayos de detección de mioglobina utilizando hIgG como sonda en un sistema *microarray*. El primer paso consiste en preparar los bioreactivos: obtención de hIgG α -Mb sonda, marcaje de la mioglobina (Mb) y marcaje de las IgGs α -Mb de detección; para, posteriormente, funcionalizar las superficies y comenzar con los ensayos. Estos se realizan tanto en formato directo como en formato sándwich.

Una vez se haya optimizado el *array* de fluorescencia, se estudiará la transferencia del sistema al sensado fotónico.

4.1. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEDIO ANTICUERPO.

Para poder cumplir con los objetivos de este TFG, en primer lugar, es necesario obtener las hIgG α -Mb que servirán como sonda de captura en el inmunoensayo. La finalidad es generar fragmentos de IgG separados a través de la región bisagra que contengan los tioles (-SH) de esta región libres y accesibles tras la reducción de la IgG (hIgG) para que, mediante el uso de luz UV, se produzca la reacción de acoplamiento tiol-eno con la superficie anteriormente trietoxivinilsilanizada. De esta forma se puede generar un anclaje orientado que permite tener los parátomos de la sonda dispuestos hacia la disolución de muestra, de manera que sean capaces de reconocer de manera óptima a la proteína diana que se encuentra en la disolución (Figura 5).

Para ello se purificaron las IgG α -Mb, realizando un intercambio a tampón acetato pH = 4,5, y se redujeron a hIgG empleando TCEP, purificándose análogamente por centrifugación. Se ha empleado el filtro de 100 kDa puesto que el peso molecular aproximado de un IgG es de 150 kDa.

Para el intercambio de tampón se partía de 40 μ L de IgG a una concentración de 4780 μ g/mL, por lo tanto, la disolución inicial contenía 191,2 μ g de IgG α -Mb. Tras la purificación se cuantificó la concentración en NanoDrop, resultando 23 μ L de filtrado a una concentración de 7,11 mg/mL. En consecuencia, el rendimiento de recuperación resultó del 85,5%.

Posteriormente se necesitó realizar una segunda preparación de hIgG α -Mb para reponer el *stock* por lo que se realizó el mismo procedimiento a partir de la misma cantidad de IgG α -Mb, 40 μ L en una concentración de 4780 μ g/mL. No obstante, la cantidad de proteína cuantificada en el NanoDrop tras la purificación de hIgG fue de 3,77 mg/mL en 37 μ L. Por lo tanto, el rendimiento de esta segunda extracción fue del 72,9%.

Para realizar la reducción selectiva de los puentes disulfuro de la región bisagra de las IgGs se necesita un agente reductor en unas condiciones determinadas para que escinda estos enlaces disulfuro pero no los que se localizan uniendo las cadenas pesadas y ligeras en cada hIgG. Por lo tanto, se espera separar en dos fracciones cada IgG que contengan cada una una cadena pesada unida a una cadena ligera. Es por esto que, previamente en el laboratorio, se había llevado a cabo un estudio de distintos agentes reductores para su empleo con otros anticuerpos monoclonales de ratón. Se ensayaron diferentes condiciones y, de todas estas, las que proporcionaron mejor resultado fueron una incubación con tris(2-carboxietil)fosfina

(TCEP) 25 mM durante 90 minutos a 37 °C. Estas condiciones fueron las que se decidieron usar en este trabajo.

A continuación, se deben filtrar y purificar estos hlgG mediante un filtro de 50 kDa ya que ahora el anticuerpo se ha dividido por la mitad y, en consecuencia, el peso molecular de cada hlgG es de 75 kDa. Tras el análisis en NanoDrop, en el primer caso se obtuvieron 82 µL a 1,00 mg/mL y en la segunda preparación 56 µL a 1,92 mg/mL. Los rendimientos de obtención de hlgG fueron, por tanto, del 42,89% y del 56,29% respectivamente. Finalmente se prepararon alícuotas de las soluciones obtenidas para un mejor manejo y conservación de las hlgG, y se almacenaron en el congelador, a -20°C, para evitar la oxidación de los tioles libres que volverían a generar el anticuerpo completo. Con esta misma finalidad de preservar las hlgG en su forma reducida evitando la regeneración de los puentes disulfuro, se emplea tampón acetato (0,15 M acetato de sodio, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH = 4,5) como tampón de reacción y de almacenaje.

En todos los casos se analizó el tampón filtrado en los lavados en el espectrofotómetro NanoDrop para descartar la pérdida de anticuerpo durante el proceso. Se obtuvo un filtrado limpio y sin presencia de IgG o bien de hlgG. En consecuencia, las pérdidas de anticuerpo durante el proceso se han debido únicamente a retenciones de producto en el filtro.

Posteriormente se procedió a caracterizar las hlgG obtenidos mediante dodecilsulfato de sodio PAGE (SDS-PAGE) en condiciones no desnaturizantes. El equipo empleado se trata del pack de bienvenida NuPAGE™ Bis-Tris, 4-12% con 12 pocillos de Invitrogen™. (Figura 9)



Figura 9. Equipo de electroforesis empleado: NuPAGE™ Bis-Tris Welcome Pack, 4-12%, 12-well Invitrogen™. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2018)

Este kit contiene geles de poliacrilamida prefabricados *Invitrogen NuPAGE Bis-Tris Protein Gels* diseñados para dar una separación óptima de proteínas en un rango amplio y bajo condiciones no desnaturizantes. Estos geles tienen un ambiente de pH neutro que minimiza las modificaciones de las proteínas por lo que ha sido el de elección en nuestro caso ya que mantener la integridad de las interacciones entre las cadenas pesadas y ligeras de las hlgG es crucial para su correcta caracterización.

Se realizaron tres electroforesis en gel de poliacrilamida con este fin de caracterización de las inmunoglobulinas, tal y como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Muestras y condiciones empleadas en las PAGEs que se han realizado para la caracterización de las inmunoglobulinas.

	PAGE I	PAGE II	PAGE III
Muestras analizadas	0,1 g/L, 0,2 g/L y 0,5 g/L de ambos IgG y hIgG α -BSA.	0,5 g/L de IgG y hIgG α -BSA en tampón PBS y otras dos réplicas 0,5 g/L de IgG y hIgG α -BSA en tampón acetato pH = 4,5.	0,5 g/L de IgG y hIgG α -BSA, α -Mb, α -CRP y α -cTnl en tampón acetato pH = 4,5.
Condiciones	Para las disoluciones de IgG se usó tampón PBS y para hIgG, tampón acetato pH = 4,5. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente.	Las disoluciones en PBS y una réplica en tampón acetato se dejaron a temperatura ambiente, mientras que la segunda réplica de muestras en tampón acetato se incubaron durante 10 minutos a 57 °C.	Las ocho muestras se calentaron durante 10 minutos a 57 °C en el termobloque.
Composición de la disolución cargada en el gel.	- 10 μ L de la muestra - 6,5 μ L de agua Mili-Q - 3,5 μ L de LDS	- 10 μ L de la muestra - 7,5 μ L de agua Mili-Q - 2,5 μ L de LDS	- 10 μ L de la muestra - 7,5 μ L de agua Mili-Q - 2,5 μ L de LDS

Cabe destacar que, previamente a la reducción y caracterización del anticuerpo monoclonal contra Mb, se usó un anticuerpo policlonal de conejo contra BSA como modelo para establecer las condiciones óptimas del proceso y, posteriormente, poder trasladarlo a anticuerpos monoclonales. La razón de comenzar con un sistema policlonal fue su menor precio, que lo hacía más accesible en mayores cantidades para el proceso de optimización.

En la primera electroforesis en gel de poliacrilamida que se realiza, el objetivo consiste en optimizar la concentración de IgG α -BSA y hIgG α -BSA para establecer unas condiciones óptimas para el posterior ensayo con mioglobina. Se hace la comparativa de IgG con hIgG empleando 1, 2 y 5 μ g de proteína para cada una en cada pocillo. Como se observa en la Figura 10, 5 μ g de proteína es la mejor opción puesto que permite una mejor visualización de las bandas, que se presentan más definidas y con mayor contraste.

Por otra parte, parece ser que con la reducción de las IgG a hIgG, las condiciones no solamente son suficientes para separar las cadenas pesadas por la región bisagra, sino que

también reduce en ciertos casos los puentes disulfuro de la región que une la cadena pesada con la cadena ligera. Se aprecia más cantidad de cadenas pesada (H) y ligera (L) independientes (bandas a 50 kDa y 25 kDa respectivamente) que de estas dos fracciones unidas conformando el hIgG (banda a 75 kDa). Esto también ocurre, aunque en menor medida, con el IgG (banda principal alrededor de 175 kDa). No obstante, estas dos cadenas proteicas están unidas por otros tipos de interacciones además de las covalentes, constituidas por los puentes disulfuro, por lo que se produce una separación en las condiciones reductoras de la electroforesis, pero se mantienen unidas durante los ensayos puesto que sí existe un reconocimiento de la Mb. Estas interacciones no-covalentes son las interacciones hidrofóbicas entre los dominios V_L y V_H y entre C_L y C_{H1} (Figura 2).

En el futuro, se plantea realizar un estudio más detallado con distintos agentes reductores, además de TCEP empleado en este caso, para mejorar este rendimiento de hIgG con cadena pesada y cadena ligera oxidadas (unidas) frente a aquellas hIgG cuyos puentes disulfuro se encuentran reducidos.

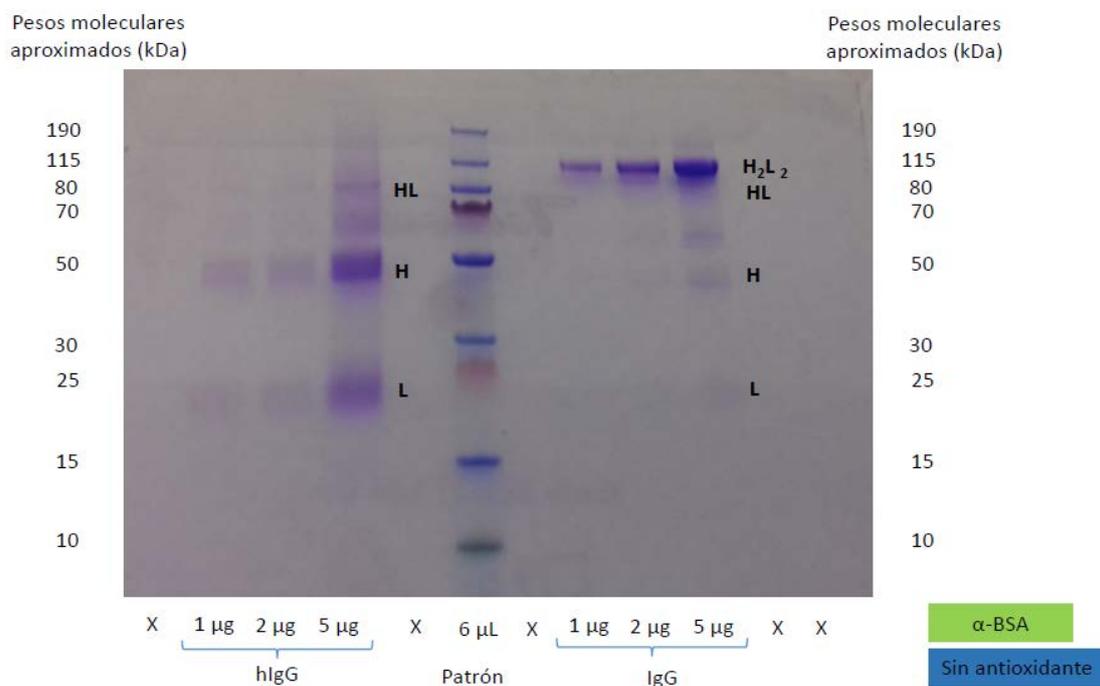


Figura 10. PAGE comparativa entre IgG y hIgG empleando 1, 2 y 5 µg de α-BSA para cada una en cada pocillo.

En la segunda electroforesis se utilizan 5 µg de proteína (IgG y hIgG α-BSA) en cada pocillo, concentración que se había establecido en la PAGE anterior, tanto en PBS como en tampón acetato con EDTA ambas a temperatura ambiente (t.a.). Además, se realiza una réplica de las muestras que se encuentran en tampón acetato con EDTA con la finalidad de incubarlas durante 10 minutos a 57 °C. Se eligió esta temperatura porque ya se habían realizado estudios previos en el laboratorio acerca de la reducción con TCEP y se había fijado esta como la óptima (Alonso et. al., 2018). Como se ve en la Figura 11, las bandas correspondientes a las muestras que se han incubado durante 10 minutos a 57 °C salen más definidas. Además, hay una mejor visualización de las fracciones proteicas HL, H y L en cuanto al hIgG, y un mejor enfoque de H₂L₂ correspondiente a la IgG. En consecuencia, se va a mantener esta modificación de la temperatura de incubación para la posterior PAGE.

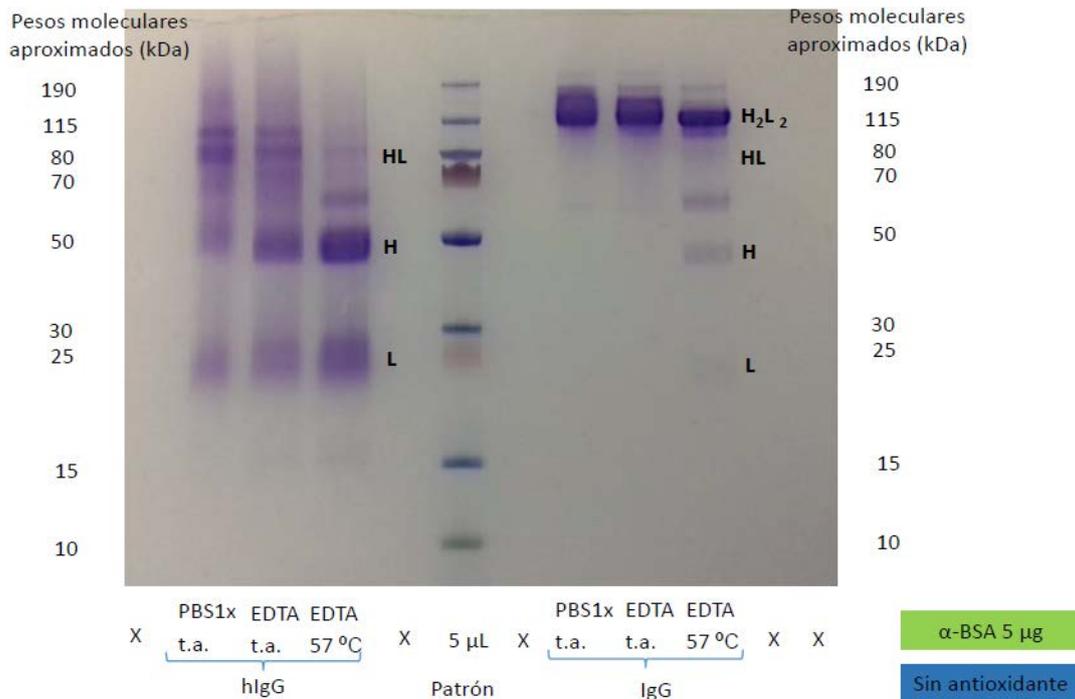


Figura 11. PAGE comparativa entre IgG y hlgG empleando 5 µg de α-BSA para cada una en cada pocillo. Incubaciones en tampón PBS1x a temperatura ambiente (t.a.), EDTA a t.a. y EDTA a 57 °C.

En la tercera electroforesis se analizaron ocho muestras: IgG y hlgG α-BSA, α-Mb, α-CRP y α-cTnl en tampón acetato con EDTA. Los α-CRP y α-cTnl fueron cedidos por el laboratorio puesto que también se estaba trabajando con estas inmunoglobulinas para otros objetivos dentro del mismo proyecto PHOCNOSIS y, de esta forma, el análisis comparativo entre IgG y hlgG es más representativo. Se mantuvo la cantidad de 5 µg de proteína en cada pocillo y también se calentaron todas durante 10 minutos a 57 °C en el termobloque como se había concluído de la PAGE II. Las bandas que se obtienen con las inmunoglobulinas α-Mb son similares a las bandas encontradas para las mismas que provienen de otros anticuerpos como el α-CRP, α-cTnl y α-BSA, sobretodo en la comparación de las IgGs, tal y como se observa en la Figura 12. sin embargo, en cuanto a la hlgG α-Mb, la banda correspondiente al dímero HL es más difícil de apreciar en comparación a estas dos cadenas proteicas por separado (H y L), a pesar de que esta separación sea evidente para el resto de los hlgG.

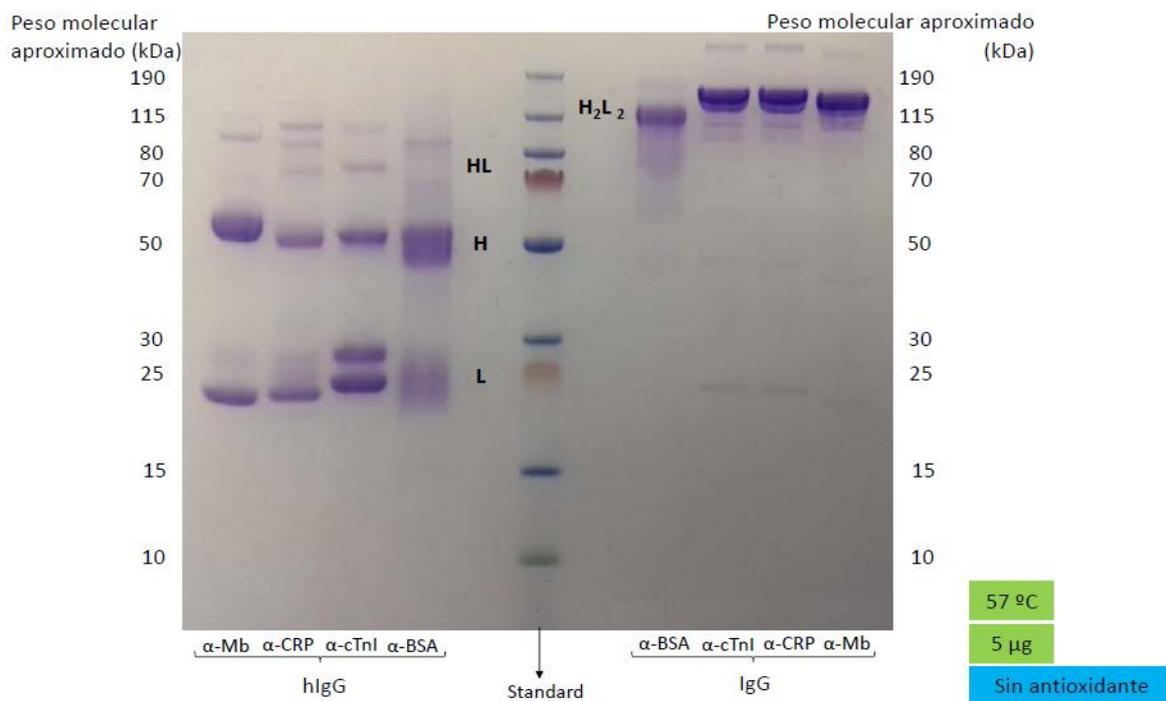


Figura 12. PAGE comparativa entre IgG y hIgG α -BSA, α -Mb, α -CRP y α -cTnI en tampón acetato con EDTA tras incubar 10 minutos a 57 °C.

En la electroforesis no se emplea antioxidante porque en estudios previos en el laboratorio se comprobó que las bandas salen más difusas, con una menor resolución. Por lo tanto, las condiciones optimizadas en este caso para la caracterización de las inmunoglobulinas, con las que se obtienen bandas definidas, se han establecido como ausencia de antioxidante, 12,5% en volumen de disolución de muestra de LDS, tampón acetato pH = 4,5 e incubación durante 10 minutos a 57 °C.

4.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS MARCADOS CON ETIQUETA FLUORESCENTE. RESULTADOS DEL MARCAJE FLUORESCENTE DE LA MIOGLOBINA Y DEL ANTICUERPO SECUNDARIO.

En el presente trabajo se va a realizar un inmunoensayo en micromatriz con detección fluorescente tanto en formato directo como en formato sándwich. Por ello es necesario marcar la proteína de interés, mioglobina, para el ensayo directo; así como el anticuerpo de secundario de detección, α -Mb, para el ensayo en formato sándwich (Figura 4).

El método de marcaje escogido ha sido el fluoróforo *Alexa Fluor® 647*, de *Invitrogen®*. Este fluoróforo es fluorescente a una $\lambda = 647$ nm, cercano al infrarrojo. Se ha escogido porque su elevado rendimiento cuántico fluorescente y su alta fotoestabilidad permite la detección de estructuras biológicas poco abundantes con una buena sensibilidad. Además, es capaz de unirse a las proteínas con alta relación de marcaje sin un *auto-quenching* significativo, normalmente de 2-8 moléculas de fluoróforo por molécula de IgG.

En ambos casos, Mb y α -Mb, el método de marcaje consiste en poner en contacto en la disolución proteína, o anticuerpo, y tinte, y mantenerlo en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora. De esta forma se mantiene la integridad del fluoróforo mientras

éste se une a los grupos $-NH_2$ de los residuos de lisinas de las proteínas. Como se añade en exceso, se debe separar posteriormente el fluoróforo sin reaccionar de la proteína marcada, por lo tanto, se llevan a cabo ciclos de ultrafiltración, lavando la muestra con PBS.

El filtro de elección fue el de 10 kDa ya que la mioglobina es una proteína pequeña cuyo peso molecular es de 17,2 kDa. Para la purificación de α -Mb se escogió el de 100 kDa ya que el peso molecular de una IgG es aproximadamente 150 kDa.

En primer lugar, en el caso del marcaje de la Mb, se obtuvo una disolución de Mb* demasiado concentrada, produciendo la saturación del espectrofotómetro NanoDrop y se tuvo que diluir con PBS para obtener, finalmente, un volumen de 200 μ L que sí pudo ser medido en el espectrofotómetro. La concentración de Mb*, de fluoróforo y la relación de marcaje se pueden ver en la Tabla 2. Por otro lado, en el caso del marcaje de anticuerpo secundario de detección α -Mb, se obtuvo un volumen de 50 μ L de disolución, cuantificándose en el NanoDrop como se presenta en la Tabla 2.

A partir de los resultados obtenidos se calculó la relación de marcaje, es decir, la cantidad de moléculas de marcador por cada molécula de Mb o de α -Mb.

Tabla 2. Concentración de Mb* y α -Mb*, cantidad de Alexa Fluor® 647 y relación de marcaje.

	[proteína*] (mg/mL)	[AlexaFluor647] (μ M)	Relación de marcaje
Mb*	0,34	79,3	1:4
αMb*	3	42,7	1:2

El volumen final de 200 μ L de disolución de Mb* se alicuotó en volúmenes de 40 μ L, mientras que para la disolución de α -Mb se realizaron alícuotas de 10 μ L, congelando 4 y diluyendo la quinta en 300 μ L de PBS, para disponer de una disolución de 100 μ g/mL, ya que este reactivo iba a usarse a continuación.

4.3. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SOPORTES.

La funcionalización de la superficie de los chips empleados en el ensayo se realiza con el objetivo de disponer grupos vinil en dicha superficie. De esta forma se puede dar la reacción de acoplamiento tiol-eno entre estos grupos vinilo incorporados y los grupos tioles, generados por reducción en la región bisagra de las hIgG, logrando la fijación orientada de las mismas. Primeramente, se realiza este procedimiento en portaobjetos de vidrio para optimizar las condiciones de trabajo puesto que se trata de un material asequible, manejable y fácil de conseguir y, en segundo lugar, se traslada a chips de SOI, superficie que se puede modificar químicamente de manera análoga. Se emplea este material de base silicio porque el propósito final es el traslado del sistema desarrollado a una superficie transductora de SOI.

Previamente en el laboratorio se había optimizado este procedimiento, habiéndose establecido un tiempo de irradiación durante 7 minutos en un limpiador de superficies de ozono, UVOH-cleaner, $\lambda = 254$ nm, (50 mW/cm²). Posteriormente se mantuvieron 2 horas en agitación en una disolución de trietoxivinilsilano al 2% en tolueno a temperatura ambiente y finalmente un curado de la superficie de 20 minutos a 90 °C.

Se caracterizó la superficie mediante WCA para evidenciar la presencia de grupos alqueno en la superficie, realizándose dos medidas de cada chip.

En los chips de vidrio, el ángulo de contacto esperado está comprendido entre 65° y 69° (Figura 13), mientras que en los chips de SOI, el ángulo de contacto para evidenciar la presencia de grupos alqueno debe resultar entre 75° y 80° (Figura 14).

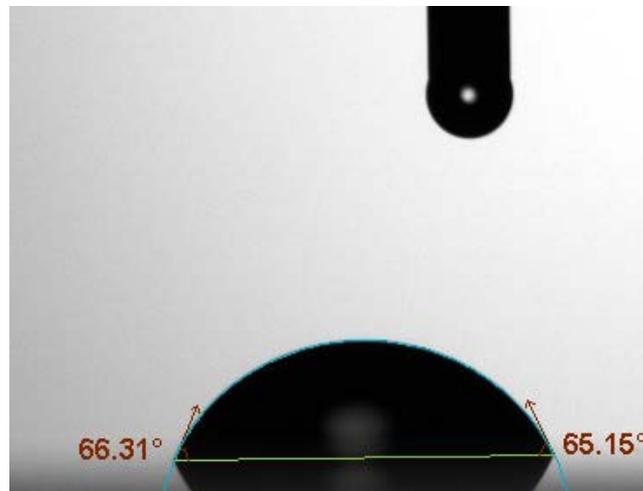


Figura 13. Medida de WCA de un chip de vidrio. WCA entre 65° y 69° .



Figura 14. Medida de WCA de un chip de SOI. WCA entre 75° y 80° .

4.4. ENSAYOS PARA EL SISTEMA MB/A-MB EN VIDRIO Y FORMATO MICROARRAY.

4.4.1. Optimización de la concentración de sonda y comparativa IgG vs hIgG.

Una vez modificada y caracterizada la superficie del chip, el objetivo de este ensayo consiste en determinar la concentración óptima de hIgG α -Mb sonda a inmovilizar para usarla en los próximos inmunoensayos, comparando sus prestaciones con las obtenidas con el uso de IgG α -Mb.

Cabe destacar que previamente en el laboratorio se había trabajado con hlgG α -BSA usando anticuerpo policlonal de conejo puesto que es un reactivo más barato y fácil de conseguir en mayor cantidad. En estos ensayos se caracterizó la densidad de inmovilización de sonda hlgG α -BSA marcada con un fluoróforo midiendo la emisión de fluorescencia mediante el lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera (SFR). Se determinó una densidad de hlgG inmovilizado de $2,36 \pm 0,18$ pmol/cm², lo que concuerda con la densidad de inmovilización máxima teórica alcanzable para una sonda hlgG α -BSA asumiendo que las dimensiones de un anticuerpo son aproximadamente $15 \times 5 \times 5$ nm³. Asimismo, se demostró que el uso de hlgG como sonda funciona mejor que el anticuerpo entero en todos los casos ensayados a diferentes concentraciones puesto que la señal de fluorescencia en las mismas condiciones era 7 veces más intensa para la hlgG que para la IgG. (Alonso et. al., 2018)

Esto mismo se pretende analizar para el sistema monoclonal de ratón hlgG/IgG α -Mb. Para ello se disponía de 7 chips de vidrio funcionalizados (numerados del 01 al 07) con grupos vinilo en la superficie. Sobre la superficie se imprimieron, usando el equipo Biodot, gotas de 25 nL de las disoluciones de hlgG α -Mb o IgG α -Mb de 50 μ g/mL, 100 μ g/mL o 200 μ g/mL en tampón acetato (0,15 M acetato de sodio, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH = 4,5) tal y como se detalla en la Figura 15.a. Se inmovilizó la sonda dispensada irradiando a $\lambda = 254$ nm durante 5 segundos en todos los chips a excepción del 01, que se dejó como control sin irradiar. A continuación, se realizaron los lavados con PBS-T y agua destilada para retirar el exceso de sonda que no se hubiera fijado a la superficie y se incubaron con disoluciones de diferentes concentraciones de Mb* en PBS-T con suero humano (suero humano diluido 10% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%), es decir, se realizó un ensayo directo. A los chips 01 y 02 se les añadió 10 μ L de disolución 5 μ g/mL de Mb*, al chip 03 disolución 2 μ g/mL de Mb*, al chip 04 disolución 1 μ g/mL de Mb*, al chip 05 disolución 0,5 μ g/mL de Mb* y al chip 06 disolución 0 μ g/mL de Mb*, es decir, PBS-T. Para mejorar la homogeneidad de la disolución sobre el chip se colocó un cubreobjetos y se dejaron incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Tras la incubación se retiró el cubreobjetos con cuidado y se lavaron los chips con PBS-T y agua destilada para eliminar el exceso de Mb* que no hubiera interaccionado con la sonda, secándose con aire comprimido. Además, se realizó un control, el chip 07, de la misma forma y condiciones que el 01 y el 02 pero sin irradiar durante 5 segundos a $\lambda = 254$ nm. En consecuencia, se comprobó que la irradiación es necesaria para que se dé la reacción de acoplamiento tiol-eno y, por lo tanto, para la inmovilización de la sonda puesto que la señal en este caso era nula.

Para el análisis de los chips se leyó la fluorescencia con el detector SFR y se trataron las imágenes empleando el programa de análisis GenePix Pro v6.0.1.27 (Figura 15.b). Se representaron las intensidades de fluorescencia en cada caso como se muestra en la Figura 16. Como apunte, aclarar que hubo un problema de dispensación de la sonda por el equipo Biodot y no existe señal de IgG 200 μ g/mL para Mb* a 0,5 μ g/mL.

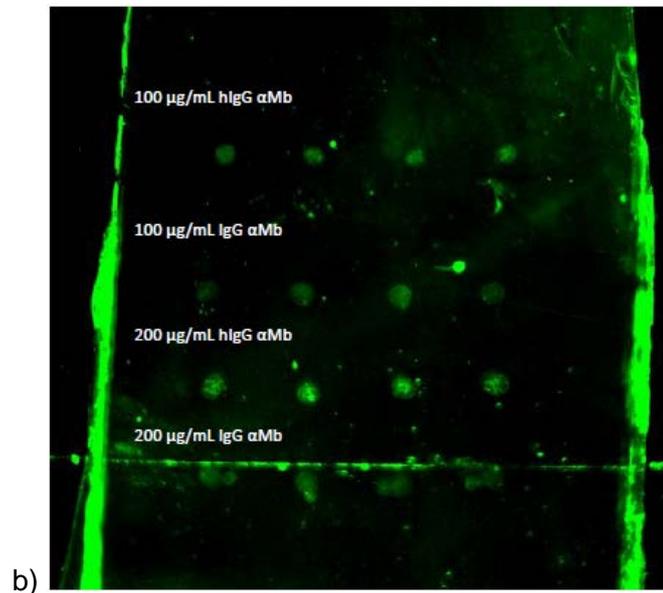
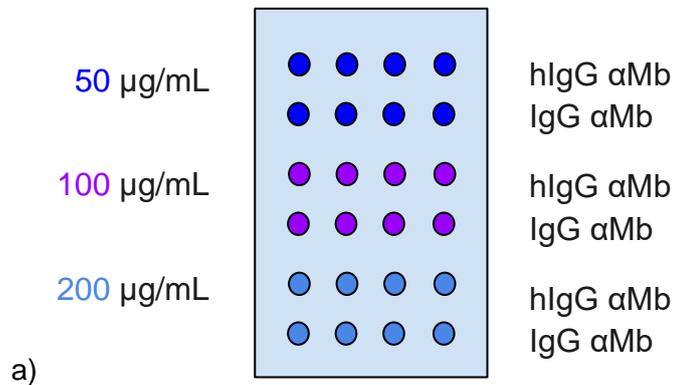


Figura 15. a) Esquema de impresión de las disoluciones de $\alpha\text{-Mb}$ para la optimización de la concentración de la misma. b) Imagen del chip incubado con 5 $\mu\text{g/mL}$ de Mb^* utilizada durante el análisis con el GenePix Pro v6.0.1.27.

Los controles salieron limpios, sin señal, tal y como se esperaba puesto que, por una parte, sin irradiar a $\lambda = 254 \text{ nm}$ durante 5 segundos para fijar las sondas a la superficie funcionalizada dichas sondas se eliminan en el lavado posterior, y, por otra parte, si el tampón PBS-T no presenta contaminaciones, no existe molécula de Mb^* capaz de interaccionar con la sonda y producir una señal que el lector SFR pueda captar. En hecho de que no haya unión de las sondas a la superficie si se carece de irradiación posterior a su dispensación en el chip apoya la hipótesis de que la reacción que está teniendo lugar es la del acoplamiento del tiol-eno y no otro tipo de anclaje.

En cuanto al uso de IgG o hIgG como anticuerpo de captura, los resultados muestran lo que ya se había comprobado en estudios previos por Sharma & Mutharasan (2013), que la sensibilidad con hIgG es mayor que con el uso del anticuerpo entero (IgG), en concreto, la señal es de media unas 2 veces mayor. La razón de este aumento de señal se debe a la orientación de los parátomos de las hIgG hacia la disolución muestra que se consigue gracias a este anclaje direccionado de la sonda.

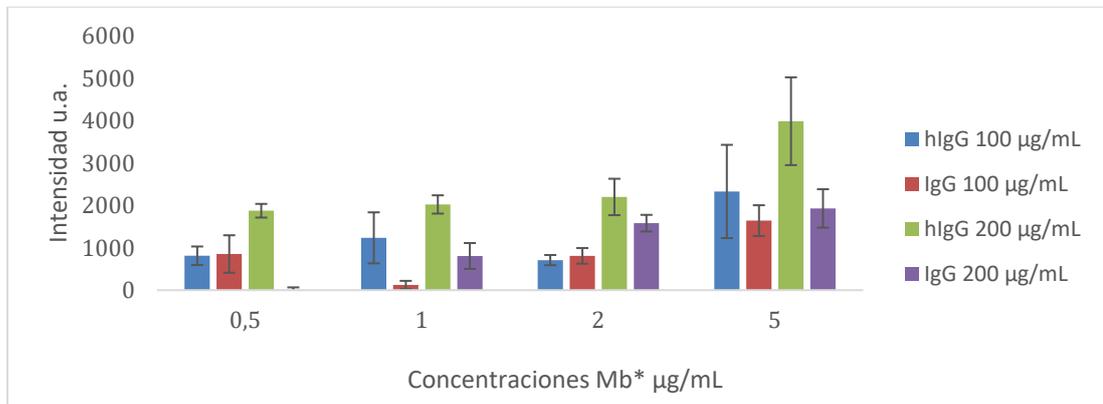


Figura 16. Gráfico de barras que representa la intensidad de fluorescencia respecto a diferentes concentraciones de Mb* para los dos tipos de sonda: IgG α -Mb y hIgG α -Mb.

Por otra parte, en cuanto a la concentración de la disolución α -Mb de sonda, 50 $\mu\text{g/mL}$ parece ser una concentración demasiado diluida puesto que la diferencia de fluorescencia entre las réplicas de esta concentración y la de 100 $\mu\text{g/mL}$ es considerable, siendo 50 $\mu\text{g/mL}$ apenas visible en este equipo por lo que no se ha podido incluir en el análisis. En cuanto a las otras dos concentraciones de sonda analizadas, ambas son detectables en el equipo, y en comparación con la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ ofrecen ambas una señal mucho mayor. No obstante, y según lo esperado, la sonda a 100 $\mu\text{g/mL}$ ofrece una intensidad ligeramente menor que a 200 $\mu\text{g/mL}$, es decir, hay menor cantidad de sonda inmovilizada que ha interactuado con Mb*. Para no concluir apresuradamente si la mejoría de la señal es suficiente como para justificar el doble de reactivo necesario, se va a emplear la sonda hIgG α -Mb en ambas concentraciones, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$, en los futuros inmunoensayos en formato directo.

Finalmente anotar que, como era de esperar, los chips incubados con la Mb* a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ resultan en una señal fluorescente más intensa que a 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Sin embargo, la señal recogida es suficientemente apreciable incluso a esta última concentración empleando el lector SFR.

4.4.2. Ensayo sensibilidad hIgG α -Mb para Mb.

Estos ensayos se realizan con la finalidad de determinar la mínima concentración de Mb capaz de ser detectada en los chips cuando se incuban con las disoluciones correspondientes de Mb* en el formato directo o bien de α -Mb* en el formato sándwich. En una primera aproximación, se decidió trabajar con concentraciones elevadas de Mb* o α -Mb* y empleando para la detección el lector SFR de fabricación casera. De esta forma, una vez definidos los parámetros de trabajo, se realizará un ensayo de prestaciones para establecer la sensibilidad haciendo uso del escáner de fluorescencia Axon GenePix-4000B, que ofrece unas prestaciones óptimas en cuanto a la sensibilidad de la detección.

4.4.2.1. Formato directo.

Se utilizaron las concentraciones de hIgG α -Mb de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ en tampón acetato establecidas en el experimento anterior, imprimiéndose 25 nL de disolución sobre el chip, diseñado como se muestra en la Figura 17.a. Las concentraciones de Mb* en PBS-T que se decidieron ensayar fueron de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$, y el

experimento se realizó de forma análoga al apartado anterior. Además, se realizó un control negativo, utilizando solamente PBS-T, que resultó en ausencia de señal fluorescente, por lo que se puede afirmar que la presencia de señal se deberá solamente a Mb* que haya interactuado con la sonda hlgG.

La fluorescencia se detectó con el lector SFR casero, y las imágenes se analizaron con el programa GenePix Pro v6.0.1.27 (Figura 17.b).

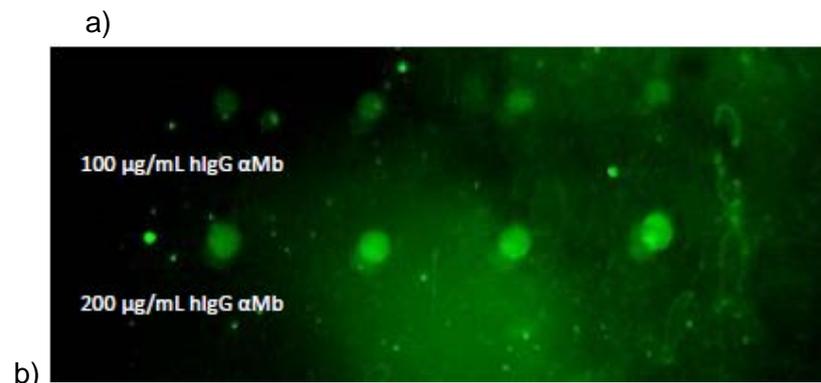
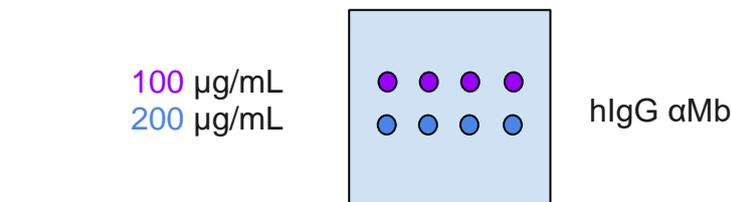


Figura 17. a) Esquema de impresión de las disoluciones de hlgG α-Mb para el ensayo de sensibilidad en formato directo. b) Imagen del chip incubado con 2 µg/mL de Mb* utilizada durante el análisis con el GenePix Pro v6.0.1.27.

La Figura 18 muestra la intensidad de fluorescencia para las dos concentraciones de hlgG sonda analizadas cuando se incubaron con las diferentes concentraciones de Mb*. Como se esperaba, los spots en los que se ha usado la sonda a 100 µg/mL ofrecen una intensidad de señal menor que aquellos en los que la sonda se ha impreso a 200 µg/mL. Además, en ambos casos se ve la tendencia creciente de intensidad de los spots a medida que incrementa la concentración de Mb* empleada, siendo esto más evidente a 200 µg/mL que a 100 µg/mL. Por último, en cuanto a la sensibilidad del ensayo, empleando el lector SFR casero se ha podido detectar una concentración mínima de Mb* de 0,5 µg/mL.

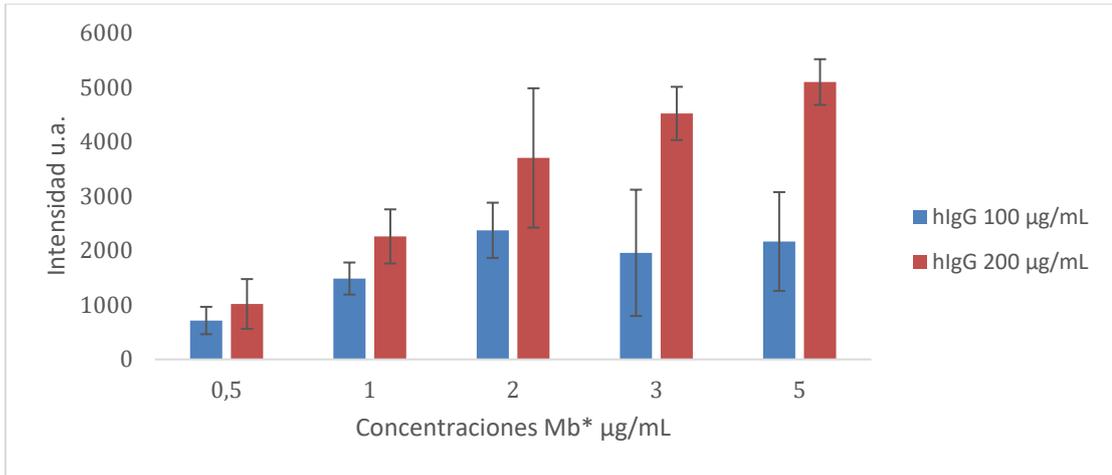


Figura 18. Gráfico de barras representando la intensidad de la señal fluorescente respecto a las diferentes concentraciones de Mb* con las que se ha incubado el chip, para concentraciones de hlgG α -Mb de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.4.2.2. Formato sándwich.

Se utilizaron las concentraciones de hlgG α -Mb de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón acetato, imprimiéndose 50 nL de disolución sobre el chip, diseñado como se muestra en la Figura 19. Las concentraciones de Mb en PBS-T que se ensayaron fueron de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y para la incubación con α -Mb* se prepararon disoluciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-T. Todos los chips se incubaron con α -Mb* a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, excepto un chip que se incubó primero con Mb 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-T y después con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -Mb* en PBS-T con la finalidad de evaluar la señal con el doble de concentración de α -Mb*. Además, se realizó un control negativo, utilizando solamente PBS-T en el paso de incubación con Mb, que resultó en ausencia de señal fluorescente tras incubarse con α -Mb*, por lo tanto, la presencia de señal se deberá solamente a α -Mb* que haya interactuado con la Mb anclada a la sonda hlgG α -Mb.

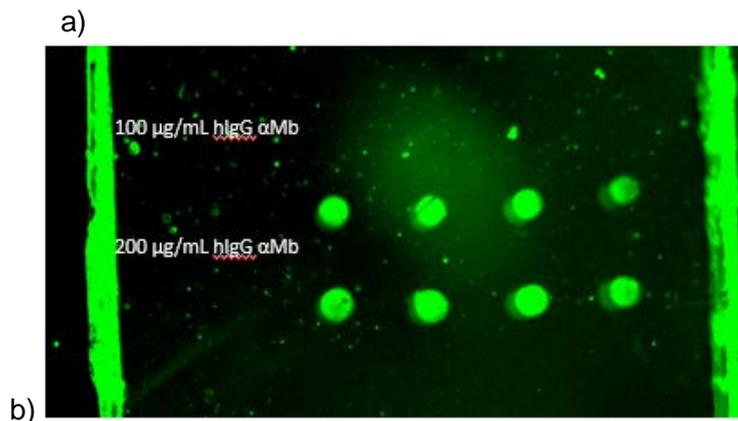
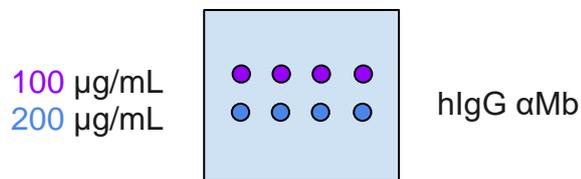


Figura 19. a) Esquema de impresión de las disoluciones de hlgG α -Mb para el ensayo de sensibilidad en formato sándwich. b) Imagen del chip incubado con 5 μ g/mL de Mb y 50 μ g/mL de α Mb* utilizada durante el análisis con el GenePix Pro v6.0.1.27.

La fluorescencia se detectó con el lector SFR casero, y las imágenes se analizaron con el programa GenePix Pro v6.0.1.27.

La intensidad de señal obtenida se muestra en la Figura 20. En primer lugar, en cuanto a la sonda, vemos que no hay diferencias significativas entre usar 100 μ g/mL o 200 μ g/mL, por lo que se podría emplear menor cantidad de hlgG en los ensayos, ahorrando cantidad del reactivo, con unos resultados similares a usar el doble. No obstante, cuando se incubaba el chip con una concentración mayor de α -Mb* (primer bloque de columnas en color más claro), 100 μ g/mL en lugar de 50 μ g/mL, esta diferencia en concentración de hlgG sí es significativa, resultando en una señal mayor cuando se emplean 200 μ g/mL de hlgG sonda.

Por otra parte, existe también una progresiva disminución de la señal fluorescente a medida que la concentración de Mb con la que se ha incubado el chip es menor.

Finalmente, destacar que, según lo esperado, cuando se emplea una concentración de α -Mb* de 100 μ g/mL en lugar de 50 μ g/mL, la intensidad de señal fluorescente es mayor, fenómeno que se aprecia más en los spots correspondientes a 200 μ g/mL de hlgG sonda.

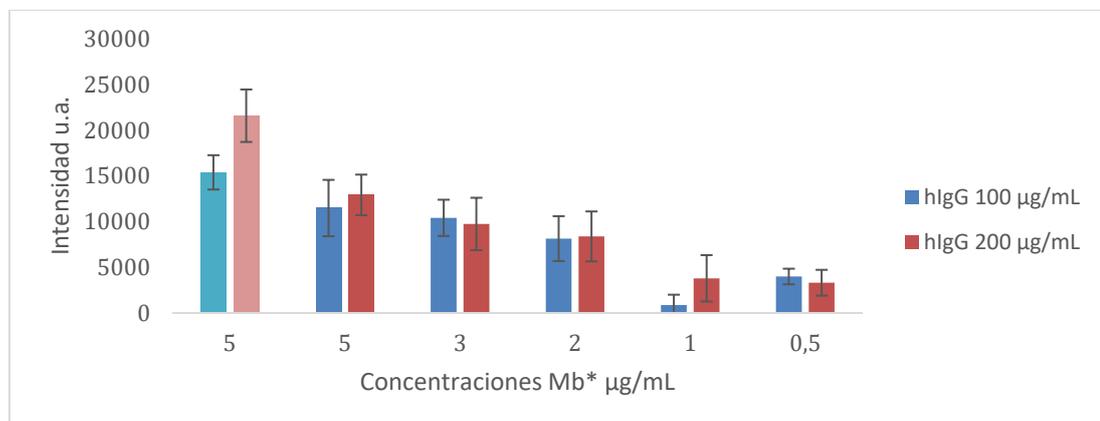


Figura 20. Gráfico de barras representando la intensidad de la señal fluorescente respecto a las diferentes concentraciones de Mb con las que se ha incubado el chip, para concentraciones de hlgG α -Mb de 100 μ g/mL y 200 μ g/mL. El segundo bloque corresponde al chip incubado con una concentración de 100 μ g/mL de α -Mb*, mientras que el resto de chips se incubaron con una concentración de α -Mb* de 50 μ g/mL.

Tras el análisis de la señal y una vez definidos los parámetros de trabajo, se realiza un ensayo de prestaciones para establecer la sensibilidad haciendo uso del escáner de fluorescencia Axon GenePix-4000B. De todo este trabajo previo de optimización se seleccionó el formato directo para realizar el ensayo de sensibilidad y se comparó la diferencia en la señal al emplear PBS-T 1x 10% suero (suero humano diluido 10% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%) o bien PBS-T 1x 1% suero (suero humano diluido 1% en PBS, BSA 0,1%, EDTA 5mM, Tween 0,1%) en la preparación de las disoluciones de Mb*. Se analizaron en ambos casos distintas condiciones, tanto de concentración de sonda como de Mb*. Por una parte, se imprimieron concentraciones de hlgG α -Mb sonda de 50 μ g/mL, 100 μ g/mL y 200 μ g/mL;

por otra parte, los chips se incubaron con Mb* a 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL y 0,5 ng/mL.

Tras el análisis empleando el software GenePix Pro v6.0.1.27 se concluyó que el sistema de detección de Mb* funciona mejor en condiciones de PBS-T con suero al 1% que con suero al 10%. En la Figura 21 se muestra la intensidad de señal fluorescente detectada mediante el escáner Axon empleando una ganancia de 700 para el caso de PBS-T 1% suero. El límite de detección resulta en 1 ng/mL de Mb*, puesto que para Mb* a 0,5 ng/mL se intuyen los *spots* correspondientes a hIgG 200 µg/mL pero la señal no es suficiente como para poder tratarla. Como se esperaba, a mayor concentración, bien de hIgG o bien de Mb*, la interacción entre sonda y analito es mayor y, en consecuencia, la señal fluorescente detectada. Destacar que para la Mb* a 10 ng/mL hubo un problema con la funcionalización del chip y la señal fue deficiente en todas las réplicas.

No obstante, en el ensayo realizado con Mb* diluida en PBS-T 10% suero, el límite de detección se encuentra en 100 ng/mL empleando una ganancia de 700, aunque si se aumenta a 900 sí que somos capaces de obtener señal fluorescente del *array* de Mb* a 50 ng/mL. Finalmente, destacar que, para unas condiciones determinadas, la intensidad de señal es 5 veces mayor cuando la Mb* se encuentra en PBS-T 1% suero que cuando se diluye en PBS-T 10% suero.

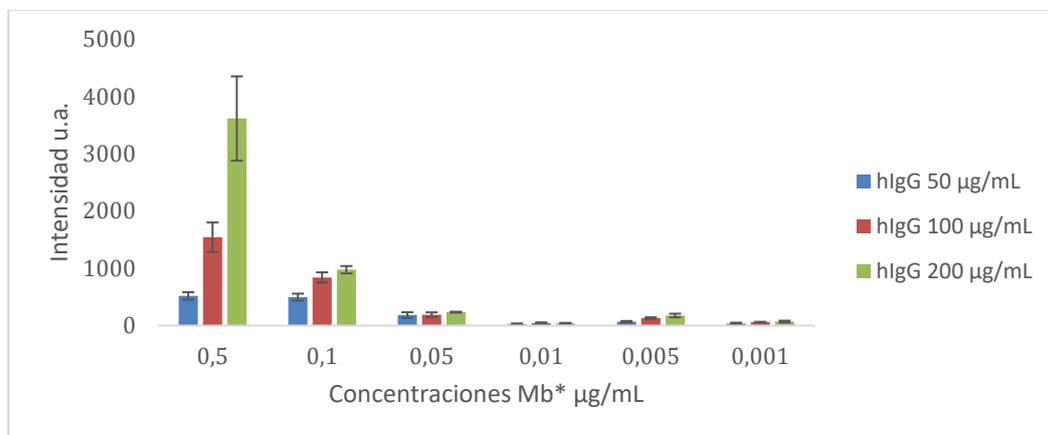


Figura 21. Gráfico de barras representando la intensidad de la señal fluorescente (ganancia 700) respecto a las diferentes concentraciones de Mb* con las que se ha incubado el chip, para concentraciones de hIgG α-Mb de 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL en PBS-T 1% suero humano.

4.5. ENSAYOS MB/A-MB EN SOI.

El siguiente paso del trabajo fue trasladar los análisis realizados en vidrio a chips de SOI. El *Silicon-on-insulator* es un material de base silicio que incorpora, entre las láminas del semiconductor, una capa de material aislante. Podemos trasladar a SOI los resultados de *microarray* en superficie de vidrio porque se puede funcionalizar usando la química de organosilanos de manera análoga. Se utilizó hIgG α-Mb como sonda a 100 µg/mL y a 200 µg/mL en tampón acetato, imprimiendo 50 nL de disolución en cada *spot*. En el siguiente paso se incubaron 30 minutos con disoluciones de Mb* en PBS-T 1x 10% suero a 5 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL y 0 µg/mL. Se detectó la fluorescencia con el lector SFR casero, sin embargo, no se obtuvo señal. En consecuencia, se regeneraron los chips de SOI y se

repitió el ensayo aumentando la concentración de hlgG α -Mb de captura a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no obstante, tampoco se detectó señal fluorescente. La razón de la ausencia de señal se debe, muy probablemente, a que el SOI es un material que *quenchea* mucho la fluorescencia, y la desactivación fluorescente a estas concentraciones puede ser tal que el lector SFR casero no sea capaz de detectarla.

Este fenómeno de quencheo se comprueba depositando una gota de disolución fluorescente, dejando secar y leyendo en el SFR. Al no observar fluorescencia se descarta emplear este método de detección sobre este tipo de material.

4.6. MEDIDA FOTÓNICA.

Pese a no ser capaces de detectar la fluorescencia se decidió funcionalizar un chip de SOI con estructuras nanofotónicas, ya que por WCA se demostraba que la funcionalización de la superficie con grupos vinilo se daba con éxito. Se introdujo el chip en el *set-up* de medida fotónico y se monitorizó la señal mientras se fluía una disolución de hlgG α -Mb en ausencia de luz y, transcurrido un tiempo, en presencia de luz. Es la primera vez que se realiza una monitorización en tiempo real del transcurso de esta reacción.

El objetivo del ensayo fotónico es comprobar que la irradiación a $\lambda = 254 \text{ nm}$ es necesaria para la reacción de acoplamiento tiol-eno entre la superficie del chip con grupos vinilo y los tioles libres de los hlgG α -Mb empleados como sonda.

En la primera parte del ensayo se fluyó hlgG α -Mb 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1x. Al inicio la lámpara UV no se encuentra encendida, por lo que las fracciones de hlgG simplemente pasarán y el único cambio que se verá en el índice de refracción será el del cambio de medio, de disolución que atraviesa las vías del chip. No obstante, en el momento en el que se enciende la luz UV y las hlgG se irradian a $\lambda = 254 \text{ nm}$, se produce la fijación de estas sobre el chip funcionalizado con grupos vinilo, lo que se traduce en una bajada de la potencia y un aumento del índice de refracción. Estos cambios se observan en la Figura 22. En el minuto 0 hay PBS fluyendo por las corrugadas del chip fotónico, y a continuación se cambia a la disolución de hlgG en PBS. Este pequeño cambio del medio es lo que produce una ligera subida de la potencia con la consiguiente bajada leve del índice de refracción. No obstante, la lámpara UV se enciende en el minuto 20, donde se puede ver un rápido y considerable aumento del índice de refracción correspondiente a la fijación de la sonda hlgG a la superficie del chip fotónico, alterando la naturaleza de la superficie. Con esto queda demostrado que la irradiación a $\lambda = 254 \text{ nm}$ es una etapa necesaria para que se dé la reacción del tiol-eno y, en consecuencia, el anclaje de la sonda.

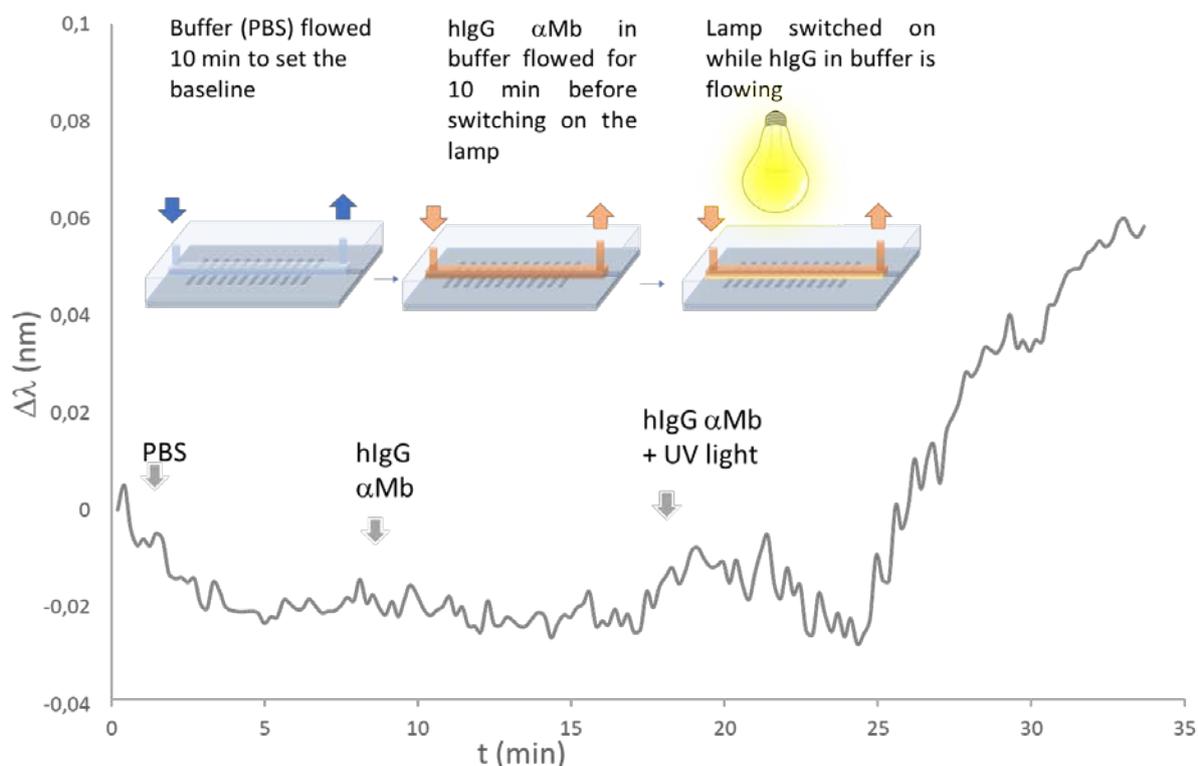


Figura 22. Representación del índice de refracción a medida que avanza el experimento fotónico. Se observa la subida abrupta del índice de refracción en el minuto 20, momento en el que se enciende la lámpara UV y las hlgG comienzan a fijarse en la superficie del chip, cambiando la naturaleza de la superficie.

En una segunda parte, se busca evidenciar la interacción de la Mb* con las hlgG ancladas previamente en la superficie del chip. Se comenzó fluyendo la proteína marcada a una menor concentración, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y, tras un lavado con PBS-T, se cambió a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La señal no es visible en este caso debido a varios factores. En primer lugar, la mioglobina es una proteína pequeña, por lo que la onda producida por el láser al rebotar puede no ser capaz de detectar la Mb* que haya interactuado debido a este cambio de tamaño tan pequeño. Si se hubiera realizado un ensayo tipo sándwich, al agregar un anticuerpo de detección $\alpha\text{-Mb}$ la diferencia de tamaño es mayor y es más detectable.

En conclusión, a pesar de ser la primera vez que se monitorizaba en tiempo real el transcurso de la reacción, se ha podido comprobar el anclaje de la sonda en el momento en el que había irradiación de luz UV, por lo que queda demostrado de forma inequívoca el papel de esta irradiación en el proceso de la reacción de acoplamiento tiol-eno.

En la actualidad, en el laboratorio se continúa trabajando en la modificación de las condiciones de medida para poder detectar el reconocimiento de proteína Mb sin marcaje con el chip fotónico.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se ha puesto a punto un inmunoensayo en formato micromatriz para detectar mioglobina, mediante detección fluorescente, en formato directo y sándwich. Para ello se emplean hlgGs anti Mb como sonda, y se ha comprobado que las hlgGs obtenidas tras la reducción de IgGs utilizando TCEP como agente reductor mantienen la selectividad de unión a su antígeno. Además, estas hlgG proporcionan una mayor sensibilidad al sistema, ofreciendo una señal dos veces mayor que cuando se realiza el ensayo utilizando la inmunoglobulina entera como sonda.

Por otra parte, se ha demostrado el papel de la luz UV como catalizador de la reacción de acoplamiento tiol-eno, metodología de "química-click" empleada en la fijación de la sonda a la superficie del chip. Se ha realizado la comprobación tanto en los ensayos en superficie de vidrio como en el chip fotónico, siendo la primera vez que se monitoriza en tiempo real la unión de la sonda a la superficie usando esta estrategia.

Más concretamente, en los ensayos con chip de vidrio, se han establecido las condiciones de trabajo y se ha caracterizado el comportamiento del sistema α -Mb tanto en formato directo como en sándwich. Tras definir estos parámetros de trabajo, en el ensayo de prestaciones haciendo uso del escáner de fluorescencia Axon se pudo comparar la sensibilidad del sistema cuando se emplea Mb en PBS-T 1% suero o PBS-T 10% suero, concluyendo que las condiciones que ofrecen una mejor señal son Mb en PBS-T 1% suero y hlgG α -Mb 200 μ /mL. En estas condiciones se alcanza una sensibilidad de detección de Mb de 0,5 ng/mL en formato directo.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos con el sistema en vidrio, se busca estudiar la posible transferencia a un soporte de SOI o a sistemas fotónicos, para facilitar la incorporación de la técnica a un dispositivo POC para el diagnóstico temprano de enfermedades cardiovasculares con detección basada en tecnología nanofotónica.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA.

ALONSO, R., JIMÉNEZ-MENESES, P., GARCÍA-RUPÉREZ, J., BAÑULS, M. J., & MAQUIEIRA, Á. (2018). Thiol-ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chemical Communications*. 10.1039/C8CC01369A.

CHEN, Z., DODIG-CRNKOVIĆ, T., SCHWENK, J. M., & TAO, S. C. (2018). Current applications of antibody microarrays. *Clinical proteomics*, 15(1), 7.

ESCORIHUELA, J., BAÑULS, M. J., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2012). Development of oligonucleotide microarrays onto Si-based surfaces via thioether linkage mediated by UV irradiation. *Bioconjugate chemistry*, 23(10), 2121-2128.

ESCORIHUELA, J., BAÑULS, M. J., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2014). Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol-yne reaction. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8510-8517.

HERENCIA, J. A. C. (2012). Nuevos marcadores de riesgo cardiovascular. ¿Pueden influir en la clasificación del riesgo cardiovascular? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 24(2), 57-70.

HUGHES, M., LILLEKER, J. B., HERRICK, A. L., & CHINOY, H. (2015). Cardiac Troponin Testing in Idiopathic Inflammatory Myopathies and Systemic Sclerosis-Spectrum Disorders: Biomarkers to Distinguish between Primary Cardiac Involvement and Low Grade Skeletal Muscle Disease Activity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(5), 795-798. <http://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206812>.

INSTITUTO ROCHE (2018). Nanotecnología en Proteómica: microarrays de proteínas y nuevos sistemas de detección. Visto el 20 de mayo de 2018. https://www.instituto-roche.es/biotecnologia/69/nanotecnologia_en_proteomica_microarrays_de_proteinas_y_nuevos_sistemas_de_deteccion

KARAİSMAİLOĞLU, E., DİKMEN, Z. G., AKBIYIK, F., & KARAAĞAOĞLU, A. E. (2018). A statistical approach to evaluate the performance of cardiac biomarkers in predicting death due to acute myocardial infarction: time-dependent ROC curve. *Turkish journal of medical sciences*, 48(2), 237-245.

KOLB, H. C., FINN, M. G., & SHARPLESS, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004-2021.

MIRA, D., LLORENTE, R., MORAIS, S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, Á., MARTÍ, J. (2004). High throughput screening of surface enhanced fluorescence on industrial standal digital recording media. *Proc SPIE*, 5617, 364-373.

MORAIS, S., CARRASCOSA, J., MIRA, D., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2007). Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds. *Analytical chemistry*, 79(20), 7628-7635.

OMICSONLINE (2018). *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis - Open Access Journals*. Visto el 25 de abril de 2018
<https://www.omicsonline.org/molecular-biomarkers-diagnosis.php>

PHOCNOSIS CONSORTIUM (2018). PHOCNOSIS-Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases. Visto el 24 de abril de 2018.
<https://phocnosis.eu/>

PICIU, A., PICIU, D., MARLOWE, R. J., & IRIMIE, A. (2013). Highly-sensitive C-reactive protein, a biomarker of cardiovascular disease risk, in radically-treated differentiated thyroid carcinoma patients after repeated thyroid hormone withholding. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 121(02), 102-108.

RUSMINI, F., ZHONG, Z., & FEIJEN, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789.

SCITECHNOL (2018). *Best Journals in Diagnostic Techniques | SciTechnol*. Visto el 20 de mayo de 2018.
<https://www.scitechnol.com/diagnostic-techniques/best-journals-diagnostic-techniques.php>

SHARMA, H., & MUTHARASAN, R. (2013). Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity. *Analytical chemistry*, 85(4), 2472-2477.

STRIMBU, K., & TAVEL, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (2018). *Thermo Fisher Scientific - ES*. Visto el 10 de mayo de 2018.
<http://www.thermofisher.com/es/es/home.html>

WANG, E. H., SANTOS, L., LI, X. Y., TRAN, A., KIM, S. S., WOO, K., ... & MCELWEE, K. J. (2018). Alopecia Areata is Associated with Increased Expression of Heart Disease Biomarker Cardiac Troponin I. *Acta dermato-venereologica*. 10.2340/00015555-2964
10.2340/00015555-2964

ZHU, H., & SNYDER, M. (2001). Protein arrays and microarrays. *Current opinion in chemical biology*, 5(1), 40-45.