



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

---Trabajo Fin de Grado en Biotecnología ---

Desarrollo de microarrays de anticuerpos en superficies interactivas para la determinación de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP)

Alumna: Núria Fuster Valls

Tutor Académico: Sergi Morais Ezquerro

Cotutora: Silvia Navarro Rosales



Curso académico 2017/2018

València, julio de 2018

RESUMEN

Desarrollo de microarrays de anticuerpos en superficies interactivas para la determinación de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP)

València, julio de 2018

La trombosis es un serio problema de salud pública a nivel mundial, siendo la tercera causa de muerte en patologías cardiovasculares. Pese a su elevado impacto en la sociedad, las actuales técnicas de laboratorio no identifican, en la mayoría de los casos, a los individuos con riesgo elevado de trombosis, por lo que es muy importante el diagnóstico en estadios tempranos.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación cuyo objetivo principal es validar un perfil de proteínas plasmáticas característico de pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y que previamente ha sido identificado mediante un abordaje con técnicas ómicas.

El objetivo principal es desarrollar un *microarray* de anticuerpos en formato sándwich frente a la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), como sistema modelo, utilizando la tecnología de disco compacto. El ensayo desarrollado permite la cuantificación de LBP humana en muestras de plasma, encontrándose diferencias significativas al analizar 59 muestras de plasma de pacientes con patología tromboembólica y 58 muestras de individuos control, por lo que la proteína LBP podría utilizarse como biomarcador diagnóstico en ETV.

Palabras clave: enfermedad tromboembólica venosa (ETV), biomarcador, inmunoensayo, DVD.

Alumna: Núria Fuster Valls

Tutor Académico: Sergi Morais Ezquerro

Cotutora: Silvia Navarro Rosales

RESUM

Desenvolupament de microarrays d'anticossos en superfícies interactives per a la determinació de la proteïna d'unió als lipopolisacàrids (LBP)

València, juliol de 2018

La trombosi és un problema greu de salut pública a nivell mundial, a més és la tercera causa de mort en patologies cardiovasculars. Tot i el seu elevat impacte en la societat, les tècniques de laboratori actuals no permeten la identificació, en la majoria dels casos, dels individus amb un risc elevat de trombosi, per això el seu diagnòstic en etapes primerenques és important.

Aquest treball s'emmarca en un projecte d'investigació l'objectiu principal del qual és la validació d'un perfil de proteïnes plasmàtiques característiques dels pacients amb malaltia tromboembòlica venosa (MTV) i que prèviament s'havien identificat amb un abordatge mitjançant tècniques òmiques.

El propòsit principal és desenvolupar un *microarray* d'anticossos en format sandvitx front a la proteïna d'unió als lipopolisacàrids (LBP), com a sistema model, emprant la tecnologia del disc compacte. L'assaig desenvolupat permet la quantificació de LBP humana en mostres de plasma, i ha trobat diferències significatives en analitzar 59 mostres de plasma de pacients amb patologia trombòtica i 58 mostres d'individus sans. Per tant, la proteïna LBP podria utilitzar-se com a biomarcador diagnòstic de la MTV.

Paraules clau: malaltia tromboembòlica venosa (MTV), biomarcador, immunoassaig, DVD.

Alumna: Núria Fuster Valls

Tutor Acadèmic: Sergi Morais Ezquerro

Cotutora: Silvia Navarro Rosales

ABSTRACT

Development of antibody microarrays on interactive surfaces for the determination of the lipopolysaccharides binding protein (LBP)

València, July 2018

Thrombosis is a serious problem of public health worldwide, being the third cause of death in cardiovascular pathologies. Despite its high impact on the society, actual laboratory techniques do not identify, in most cases, the individuals on high risk of thrombosis, so the diagnosis at early stages is very important.

This work belongs to a research project whose main goal is the validation of a plasmatic proteins profile characteristic of patients of venous thromboembolism (VTE) and which have been previously identified by omic techniques.

The main objective is the development of an antibody microarray in sandwich format against lipopolysaccharide binding protein (LBP), as a system model, using the compact disc technology. The developed assay allows the quantification of human LBP in plasma samples, finding significant differences when 59 samples of VTE patients and 58 samples of control individuals were analyzed, suggesting that LBP could be used as a biomarker in VTE diagnosis.

Key words: venous thromboembolism (VTE), biomarker, immunoassay, DVD.

Author: Núria Fuster Valls

Academic tutor: Sergi Morais Ezquerro

Cotutor: Silvia Navarro Rosales

AGRADECIMIENTOS

Los reactivos empleados en la realización de la parte experimental de este trabajo fin de grado se han financiado por el programa de ayudas de proyectos de colaboración UPV-La Fe (2017/C28), y ayudas del ISCIII (PI14/00512).

Gracias...

A Sergi, por confiar en mí aun cuando éramos unos completos desconocidos. Por ayudarme a ver el lado positivo de los resultados experimentales y por acompañarme en este camino lleno de aprendizaje.

A MJ, por su enorme paciencia, por enseñarme tanto en la bancada, por ser mi gemela perdida y por sacarme tantas sonrisas y algún que otro mote, ya sabes: si un perro...

A Pedro, por aquel primer día compartido en el laboratorio que nos unió, por tus consejos, los ánimos y los cafés del menjador.

A Natalia, Gabi, Salva, Maribel, Augusto, Miquel, Sara, Dani, Ana, Juan, Zeneida, Pilar y Vicky, investigadores del grupo, por la calurosa acogida que me brindaron. Por los almuerzos y los tappers en el césped o en el menjador con controvertidas conversaciones.

A Silvia, por impulsar PIEVEN y por asesorarme en todo lo relativo a la trombosis. Gracias también por tu visión neutra y crítica.

A mi familia, por darme las alas para volar hasta sitios insospechados. Por confiar siempre en mí y por el apoyo y comprensión en estos meses en los que mi vida ha estado en el laboratorio.

A mis amigos de siempre y a los compañeros y amigos de esta etapa universitaria, por la complicidad, las entregas en Poliformat apurando plazos, los cafés de la máquina del 3P, las cenas improvisadas o los abrazos reconfortantes. Gracias. Somos equipo en esto de la vida.

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Contextualización.....	1
1.2 La enfermedad tromboembólica venosa.....	1
1.2.1 Definición y clases.....	1
1.2.2 Incidencia.....	2
1.2.3 Factores de riesgo no genéticos.....	3
1.2.4 Factores de riesgo genéticos.....	4
1.2.5 Recurrencia.....	5
1.2.6 Diagnóstico.....	5
1.3 La proteína de unión a lipopolisacáridos.....	6
1.4 Técnicas inmunoanalíticas.....	6
1.4.1 Inmunoensayos.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Reactivos y materiales.....	10
3.2 Equipos.....	11
3.3 Protocolos empleados.....	12
3.3.1 Biotinilación del anticuerpo biG 412.....	12
3.3.2 Impresión de reactivos.....	12
3.3.3 Protocolo de ensayo.....	13
3.3.4 Lectura y análisis de los resultados del ensayo.....	14
3.3.5 Protocolo de cuantificación de LBP mediante placa ELISA.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1 Estudio de condiciones del inmunoensayo.....	15
4.1.1 Impresión de los reactivos en los <i>microarrays</i>	15
4.1.2 Reactivos del ensayo y revelado.....	15
4.2 Curva de calibrado.....	17
4.2.1 Comparación de las curvas de calibrado en PBST y plasma ovino.....	18
4.3 Ensayo de recuperación.....	19
4.4 Análisis de muestras.....	20
4.5 Comparación de metodologías.....	28
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Manifestaciones clínicas de la ETV.

Figura 2. Principales factores de riesgo para patología tromboembólica.

Figura 3. A) Dispensador de líquidos Biodot. B) Imagen de la impresión de un disco DVD.

Figura 4. Lector de discos DVD Labplayer.

Figura 5. Lector de placas ELISA modelo Victor 1420.

Figura 6. Diseño del *microarray*.

Figura 7. Esquema del inmunoensayo en formato *microarray* para la determinación de LBP.

Figura 8. Efecto del tiempo de incubación del anticuerpo detector biG 412 en la intensidad de señal.

Figura 9. Efecto de la dilución de la estreptavidina-HRP en la intensidad de señal.

Figura 10. Curva de calibrado de LBP en *microarray* (n=8).

Figura 11. Imágenes obtenidas tras la lectura del disco. A) Ausencia de LBP. En las imágenes B, C, D y E, la concentración de LBP fue 25, 50, 100 y 400 ng/mL, respectivamente.

Figura 12. Valores medios de LBP obtenidos en el análisis de muestras clasificados por grupo y metodología empleada.

Figura 13. Diagrama de dispersión de Pearson entre los valores de concentración de LBP determinados mediante inmunoensayo en placa ELISA y *microarray* en disco.

Figura 14. Curva ROC para la metodología de cuantificación de LBP en formato de placa ELISA.

Figura 15. Diagrama de puntos para la metodología de cuantificación de LBP en formato de placa ELISA. Las cifras 0 y 1 del diagnóstico corresponden a los individuos control y pacientes con ETV, respectivamente. La línea paralela al eje X representa el valor de corte.

Figura 16. Curva ROC para la metodología de cuantificación de LBP en formato de *microarray* en disco DVD.

Figura 17. Diagrama de puntos para la metodología de cuantificación de LBP en formato de *microarray* en disco DVD. Las cifras 0 y 1 del diagnóstico corresponden a los individuos control y pacientes con ETV, respectivamente. La línea paralela al eje X representa el valor de corte.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia de la ETV desglosada atendiendo a características de edad, raza y género.

Tabla 2. Recopilación de las condiciones del inmunoensayo en disco.

Tabla 3. Comparación del peso porcentual en el rango de señal de las curvas de calibrado de LBP en PBST y plasma ovino en disco.

Tabla 4. Resultados del ensayo de recuperación de LBP en muestras de plasma ovino dopadas. A: Añadida, D: determinada.

Tabla 5. Concentración de LBP en muestras de pacientes con ETV determinada mediante ELISA y disco DVD.

Tabla 6. Concentración de LBP en muestras de controles sanos determinada mediante ELISA y disco DVD.

Tabla 7. Resumen de los parámetros obtenidos mediante el análisis ROC.

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la sensibilidad diagnóstica.

Ecuación 2. Cálculo de la especificidad diagnóstica.

GLOSARIO

Especificidad diagnóstica: Es la probabilidad de que, para un sujeto sano, se obtenga un resultado negativo en el test diagnóstico, es decir, la capacidad del mismo para detectar individuos sanos.

Sensibilidad diagnóstica: Es la probabilidad de que, para un individuo enfermo, obtengamos en la prueba diagnóstica un resultado positivo, es decir, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

Analito: Componente específico de una muestra que quiere medirse en un análisis o ensayo.

Sensibilidad analítica: Cambio en la respuesta de un instrumento o ensayo asociado a cambios en la concentración del analito.

Límite de detección: Es la concentración mínima que, de forma fiable, puede ser detectada por un método analítico dado.

Recuperación: Cantidad de analito recuperada de la muestra analizada, que permite evaluar la eficiencia del método analítico. Se expresa en términos porcentuales.

Reproducibilidad: Capacidad de un ensayo de proporcionar los mismos resultados al ser repetido.

Robustez: Capacidad de un método analítico de no alterarse debido a pequeñas variaciones en sus condiciones, siendo indicativo de su fiabilidad para un uso normal.

Rango de cuantificación o rango lineal: Intervalo en el que un método analítico es capaz de dar resultados directamente proporcionales a la concentración de analito.

Curva patrón o curva de calibrado: Representación gráfica de la señal, medida como una función de la cantidad de analito.

Microarray: Disposición ordenada, en filas y columnas, de moléculas inmovilizadas sobre una superficie sólida.

ABREVIATURAS

LBP: Proteína de unión a lipopolisacáridos.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

PBS: Tampón fosfato salino.

PBST: Tampón fosfato salino con 0,05% (m/v) de Tween-20.

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

GAM: Inmunoglobulina de cabra anti-ratón.

BSA: Albúmina de suero bovino.

RiG: Inmunoglobulina G de conejo.

Bt: Biotinilado.

LD: Limite de detección.

EC₅₀: Mitad de la concentración efectiva.

ROC: Característica operativa del receptor.

AUC: Área bajo la curva.

SNR: Ratio señal-ruido.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contextualización

El presente trabajo de fin de grado se ha realizado en el marco de un proyecto de investigación conjunto entre el Grupo de Investigación en Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vasculardel Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) y el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico Universitat Politècnica de València-Universitat de València (IDM).

En una primera fase, los investigadores del IIS La Fe realizaron un estudio de proteómica diferencial no dirigido mediante SWATH LC-MS/MS. Analizaron muestras de plasma de 18 pacientes con historia de enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y 18 voluntarios sanos. En este estudio se identificaron un total de 522 proteínas, que tras un análisis de regresión logística con penalización ELASTIC NET quedaron reducidas a 28 proteínas capaces de diferenciar entre pacientes con ETV y controles (R v.3.2.3). De estas 28 proteínas, 9 están directamente relacionadas con los procesos de coagulación y 19 no lo están, resultando el estudio de estas últimas especialmente interesante por la novedad que puede representar su relación con la ETV y su uso como marcador diagnóstico.

En este trabajo se ha planteado, como prueba de concepto, el desarrollo de un método de diagnóstico para la determinación de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) en plasma, que forma parte del perfil de proteínas característico de pacientes con ETV no relacionadas con la coagulación, y que cumpla los requisitos de sensibilidad y selectividad a un precio reducido.

1.2 La enfermedad tromboembólica venosa

1.2.1 Definición y clases

La trombofilia se define como la condición que predispone al desarrollo de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), causada por anormalidades en el proceso de la coagulación sanguínea y que llevan a un estado de hipercoagulación. Se asocia con factores hereditarios, adquiridos o a la interacción entre ambos. La trombofilia heredada llega a explicar el 40% de los casos de ETV (Beckman *et al.* 2010; Cannegieter and van Hylckama Vileg 2013; Martinelli *et al.* 2014; Manucci and Franchini, 2015).

La manifestación más evidente de la ETV se da en forma de trombos, que se desarrollan como resultado de una lesión endotelial o un desequilibrio entre los sistemas de coagulación y fibrinolítico.

Dentro del término “Enfermedad tromboembólica venosa” se distinguen la trombosis venosa profunda (TVP), que ocurre cuando los trombos se hallan en las venas profundas, y los embolismos pulmonares (EP), cuando el trombo se adentra en las arterias pulmonares (Figura 1) produciendo su embolización (Beckman *et al.* 2010; Martinelli *et al.* 2014). No obstante, se desconoce el motivo por el que algunos pacientes cursan con EP y otros simplemente con TVP (Fahrni *et al.* 2015).

Se estima que el 60-80% de los pacientes con ETV padecen EP, aunque aproximadamente el 70% de ellos son asintomáticos o no han sido diagnosticados, y la causa de la muerte se esclarece en la autopsia (Bruni-Fitzgerald, 2015).

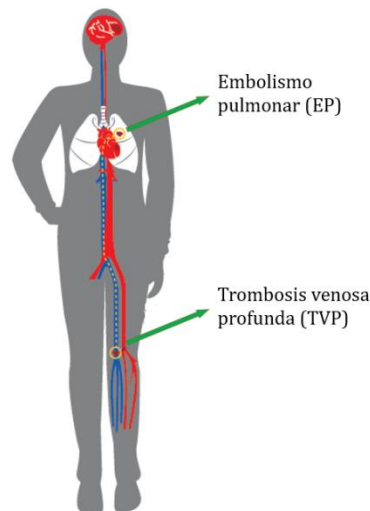


Figura 1. Manifestaciones clínicas de la ETV.

(Adaptado de <http://www.worldthrombosisday.org>)

1.2.2 Incidencia

La ETV es la tercera causa de mortalidad dentro de las enfermedades cardiovasculares, detrás del infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular (Goldhaber, 2012; Martinelli *et al.* 2014; Bruni-Fitzgerald, 2015; Morange *et al.* 2015).

Como puede verse en la Tabla 1, las cifras de incidencia son estimaciones imprecisas y varían entre las fuentes, en parte porque la ETV es una patología multifactorial que afecta de manera muy diferente a la población según el género, la edad y la raza.

Observamos que la incidencia aumenta con la edad, por la propia biología del envejecimiento, así como por una exposición a un mayor número de factores de riesgo trombótico (Beckman *et al.* 2010; Liumbruno and Franchini, 2013). Las diferencias étnicas parecen afectar primordialmente por las causas genéticas, así la raza negra no suele ser portadora de las mutaciones del factor V Leiden o de la protrombina g.20210A>G (Bounameaux and Rosendaal, 2011).

En España, durante el 2016, la tasa de morbilidad de las patologías del sistema circulatorio se situó en 2.606 casos por cada 100.000 habitantes (EMH-Año 2016 INE). En términos de defunciones hospitalarias, las enfermedades del sistema circulatorio suponen el 29,2% de los casos con casi 120.000 fallecimientos. En el informe se detalla que, de estas, alrededor de 32.000 corresponden a enfermedades isquémicas del corazón y 27.000 a enfermedades cerebrovasculares (EDCM-Año 2016 INE).

Tabla 1. Incidencia de la ETV desglosada atendiendo a características de edad, raza y género. Adaptada de (García-Róspide *et al.* 2004; Beckman *et al.* 2010; Grosse 2011).

Característica	Incidencia (‰)
Edad	
<15	<0,5
15-44	1,5
45-80	1,9
65-70	1,5-1,8
>80	5-6
85-90	2,8-5,1
Raza	
Caucásica	1,04-1,17
Negra	0,77-1,41
Asiática	0,26-0,29
Hispana	0,55-0,61
Género	
Mujer	1,1
Varón	1,3

1.2.3 Factores de riesgo no genéticos

La causalidad multifactorial con componente genético, así como con factores de riesgo transitorio y adquirido de la enfermedad tromboembólica venosa, hace que, cuando varios factores de riesgo se adicionan, se alcance un umbral que desencadena el episodio trombótico. En aquellos factores de tipo transitorio, una vez superada la convalecencia, el paciente se alejará de dicho umbral. Por este motivo, la recurrencia es menor al 1% en pacientes que tuvieron el episodio con posterioridad a una operación (Cannegieter and van Hylckama Vileg 2013; Kreidy 2014). A continuación, se describen brevemente algunos de los principales factores de riesgo de ETV (Figura 2):

- **Edad avanzada:** Mayor riesgo debido a comorbilidad, inmovilidad o estado de hipercoagulación (Beckman *et al.* 2010; Goldhaber, 2012; Kreidy, 2014; Manucci and Franchini, 2015).
- **Anticonceptivos orales y reemplazo estrogénico:** El riesgo de ETV por la ingesta de estrógenos es proporcional a la cantidad tomada, y es mayor en mujeres postmenopáusicas. En cifras estadísticas, hablamos de entre 20 y 30 casos por 100.000 mujeres al año (Bruni-Fitzgerald, 2015; Manucci and Franchini, 2015). En el caso de la trombosis de venas cerebrales, se estima un riesgo trombótico 6 veces superior en las mujeres que toman contracepción oral respecto de las que no la toman (Martinelli *et al.* 2014).
- **Cirugía y traumatismos:** Sufrir una cirugía mayor o traumatismos causan una predisposición a episodios trombóticos debido a la activación de los factores de la coagulación, la inflamación y la inmovilización que lleva asociada la recuperación de una cirugía mayor o traumatismo. Las amputaciones de miembros inferiores o las operaciones de cadera, pelvis o médula se asocian con los mayores riesgos trombóticos (Beckman *et al.* 2010; Goldhaber, 2012; Bruni-Fitzgerald, 2015; Manucci and Franchini, 2015).

- **Estasis venosa:** La estasis venosa consiste en un enlentecimiento de la circulación venosa, sobre todo en las piernas, que produce la acumulación de plaquetas y trombina en las venas. Un aumento de la viscosidad puede deberse a la deshidratación, inmovilidad, mayor presión venosa en un fallo cardíaco o por la compresión de una vena debido a la presencia de un tumor (Beckman *et al.* 2010; Goldhaber, 2012; Bruni-Fitzgerald, 2015).
- **Estado de hipercoagulación:** El delicado y complejo equilibrio entre coagulación y anticoagulación está alterado por muchas enfermedades y factores, tales como la obesidad, la cirugía o los traumatismos, o procesos inflamatorios. Este estado puede ser genético o adquirido (Martinelli *et al.* 2014; Bruni-Fitzgerald, 2015).
- **Embarazo:** El embarazo incrementa el riesgo trombótico, especialmente cuando las mujeres son mayores de 35 años (Martinelli *et al.* 2014). Se cree que el aumento de riesgo se debe a los cambios en los sistemas venoso y de la coagulación que se experimentan durante el embarazo. En las tres semanas posteriores al alumbramiento se concentran el 80% de los episodios, debido a los daños endoteliales en los vasos pélvicos producidos durante el parto (Greer, 2012).
- **Cáncer:** Numerosos artículos mencionan el cáncer como uno de los factores de riesgo adquiridos para padecer ETV. De hecho, sufrir cáncer incrementa 4,1 veces el riesgo de padecer trombosis, mientras que el tratamiento con quimioterapia lo aumenta en 6,5 veces (Lee and Levine, 2003). Los pacientes con cáncer que tengan un episodio trombótico tienen entre 4 y 8 veces más riesgo de fallecer que los pacientes sin cáncer (Falanga and Zacharski, 2005). Los motivos por los que esto se da son la alteración del flujo sanguíneo, los daños en células endoteliales o la producción de procoagulantes (Al Diab 2010).



Figura 2. Principales factores de riesgo para patología tromboembólica.

1.2.4 Factores de riesgo genéticos

Hay dos polimorfismos que destacan por su contribución a la trombofilia, son el factor V Leiden g.1691G>A, que confiere resistencia a la acción anticoagulante de la proteína C activada, así como el polimorfismo de la protrombina g20210A>G.

Además, el hecho de tener un grupo sanguíneo distinto del grupo O es también uno de los factores de riesgo hereditario más común. Aquellos individuos con trombofilia y que no sean del grupo sanguíneo O tienen hasta 23,2 veces más riesgo de padecer ETV (Martinelli *et al.* 2014; Manucci and Franchini, 2015).

1.2.5 Recurrencia

Después de un episodio de ETV, la mayoría de los pacientes reciben tratamiento anticoagulante durante un periodo de tres a seis meses para evitar la extensión o embolización del trombo original. Pasado este tiempo, la medicación anticoagulante puede interrumpirse o mantenerse. Si se interrumpe, el riesgo de recurrencia aumenta. El 15-20% de los pacientes de ETV tendrá una recurrencia en los primeros 3 años, (Cannegieter and van Hylckama Vileg, 2013) y el 33% en la primera década (Beckman *et al.* 2010). Por otra parte, si se mantiene la medicación, el riesgo de hemorragias aumenta, siendo la cifra del 1-4% del total de los casos (Cannegieter and van Hylckama Vileg 2013, Fahrni *et al.* 2015), y de entre estos, un 25% fallecen en los 30 días posteriores a la hemorragia (Fahrni *et al.* 2015).

Para tomar una decisión informada es necesario mejorar las técnicas de predicción de la recurrencia de los episodios trombóticos. Sin embargo, las investigaciones hasta la fecha apuntan a que los factores de riesgo de un primer episodio de trombosis en ocasiones están alejados de aquellos considerados de riesgo en el segundo y sucesivos (Cannegieter and van Hylckama Vileg, 2013). Es el caso de la edad, que carece de influencia; de la trombofilia que solamente aumenta el riesgo 1,5 veces; o del sexo que pese a no ser significativo en un primer episodio sí lo es en el segundo, ya que los varones tienen hasta el doble de riesgo que las mujeres (Fahrni *et al.* 2015).

En relación con los factores de riesgo genéticos, el riesgo de recurrencia aumenta en los pacientes con deficiencia en las proteínas anticoagulantes y en aquellos homocigotos para las mutaciones con ganancia de función (Martinelli *et al.* 2014).

Hasta el momento, uno de los pocos test que permiten predecir el riesgo de recurrencia es el test del dímero-D, que debe realizarse una vez se ha interrumpido la terapia anticoagulante, de resultar negativo, el paciente presenta bajo riesgo de recurrencia (Fahrni *et al.* 2015).

1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de ETV es complejo debido a la ausencia de exámenes físicos sensibles o específicos, ya que solamente la mitad de los pacientes presentan la sintomatología clásica: dolor, inflamación y sensibilidad en la zona (Suwanabol and Hoch, 2013), además tampoco existen ensayos biológicos con especificidad suficiente y un valor predictivo positivo (Liumbruno and Franchini, 2013).

No obstante, hay varias pruebas que se realizan:

En el caso de la trombosis venosa profunda, es común el empleo de la **escala de Wells** que establece tres niveles de riesgo de TVP, que se asocian a prevalencias del 3%, 17% y 75% respectivamente (García-Róspide *et al.* 2004; Suwanabol and Hoch, 2013). Cabe mencionar que la escala de Wells es de uso extendido en pacientes con un primer episodio trombótico, pero que no existe una equivalente para las recurrencias (Fahrni *et al.* 2015).

-Ecografía Doppler: Es la técnica de referencia, ya que resulta inocua, tiene un coste bajo y es rápida. El correcto diagnóstico depende en gran medida de quién realice la prueba y pierde efectividad al realizarse en determinadas zonas, como la pelvis o la pantorrilla. El diagnóstico se basa en la visualización del trombo (García-Róspide *et al.* 2004; Suwanabol and Hoch, 2013).

-Análisis del dímero-D: Esta prueba se basa en la medición de la concentración en sangre del dímero-D. El dímero-D es un subproducto de la degradación del coágulo de fibrina. Se ha fijado un umbral de 500 ng/mL. Si la concentración es menor, permite excluir la ETV. No obstante, un valor superior también puede deberse a otros fenómenos como sepsis, fallo cardíaco o embarazo. Esta prueba es sensible al diagnóstico de la ETV, pero no es específica (García-Róspide *et al.* 2004; Suwanabol and Hoch, 2013; Bruni-Fitzgerald 2015; Streiff, 2015).

La combinación de las tres pruebas anteriormente mencionadas resulta, de entre las disponibles actualmente, la vía más efectiva a nivel de costes para el diagnóstico.

Teniendo en cuenta las elevadas cifras de incidencia y recurrencia, la identificación de nuevos biomarcadores que sean de utilidad en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la patología tromboembólica resulta prioritaria desde el punto de vista clínico-asistencial. Ello beneficiaría a los pacientes con tratamientos anticoagulantes personalizados, mejorando su calidad de vida y permitiendo ahorro en los costes sanitarios si el tratamiento de estas patologías pudiera realizarse a nivel ambulatorio.

El desarrollo de una tecnología capaz de identificar, de forma sencilla, individuos con un alto riesgo trombótico a partir de muestras de plasma, permitiría su implantación en la rutina de los laboratorios, y por lo tanto posibilitaría una detección precoz de la enfermedad.

1.3 La proteína de unión a lipopolisacáridos

La LBP es una glicoproteína de 58 kDa implicada en la fase aguda de la respuesta inmunológica en infecciones causadas por bacterias gramnegativas. Estas bacterias contienen un lipopolisacárido (LPS) en su pared celular. La LBP actúa potenciando la asociación de dicho LPS con el receptor CD14, ya que se une a la porción del lípido A de dichos lipopolisacáridos; promoviendo la liberación de citoquinas como respuesta (UniProt; *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*).

En el presente trabajo fin de grado se ha seleccionado la proteína de unión a lipopolisacáridos, LBP, que pertenece al perfil proteómico característico de pacientes de ETV, como biomarcador modelo. El mismo se ha utilizado para la puesta a punto de un ensayo que podría permitir el diagnóstico de pacientes con patología tromboembólica

1.4 Técnicas inmunoanalíticas

1.4.1 Inmunoensayos

Los inmunoensayos incluyen aquellas herramientas bioanalíticas que se basan en la interacción antígeno-anticuerpo y que la utilizan para la detección y cuantificación de analitos. Cabe destacar que el reconocimiento antígeno-anticuerpo ocurre con una alta selectividad; que los inmunoensayos permiten el marcaje e inmovilización tanto del

anticuerpo como del antígeno, y que existe una amplia variedad en lo que a métodos de marcaje y sistemas de detección se refiere.

Los métodos inmunoanalíticos empezaron a desarrollarse en 1950 con el trabajo pionero de Yalow y Berson (Yalow, R.S., Berson, S.A. 1959), los cuales describieron el desarrollo de un radioinmunoensayo cuantitativo para el análisis de insulina humana a niveles de picogramos. Esta aportación a la metodología analítica moderna planteó el futuro potencial de los inmunoensayos, ya que, en principio, se pueden utilizar para el análisis de cualquier compuesto dada la propiedad natural de los anticuerpos de reconocer específica o selectivamente una molécula o un fragmento de ésta. Posteriormente, los inmunoensayos fueron y siguen siendo ampliamente perfeccionados y difundidos, encontrando una gran aceptación en el campo de la biotecnología, o el análisis clínico, alimentario y medioambiental.

En 1986 Ekins y colaboradores describieron el desarrollo de ensayos miniaturizados de múltiples analitos. Los primeros resultados, acuñados bajo el término “*Ambient analyte immunoassays*”, no aparecieron publicados hasta 1989. Desde los inicios, la necesidad de disponer de ensayos con una mayor sensibilidad y obtener información más rápidamente (menores tiempos de incubación y procesado) impulsaron la evolución de las técnicas bioanalíticas (Ekins 1998; Sutandy *et al.* 2013). Los *microarrays* son disposiciones ordenadas, en filas y columnas, de moléculas inmovilizadas generalmente en superficies sólidas, en forma de microgotas con tamaño variable en función de la densidad del *microarray* (Arnandis-Chover *et al.* 2014; Cretich, Damin and Chiari, 2014).

Uno de los formatos más utilizados para la determinación de proteínas es el formato sándwich, en el que se requiere la participación de al menos dos anticuerpos. Uno de ellos, el anticuerpo de captura, se inmoviliza en la fase sólida y reconoce una región específica de epítomos del antígeno. El segundo anticuerpo, el detector, reconoce otra región epitópica del antígeno, formando un inmunocomplejo conocido como sándwich. El anticuerpo detector puede estar marcado o no, diferenciando así un ensayo sándwich directo de uno indirecto. Esta clase de formato de ensayo logra combinar la especificidad, precisión y elevada sensibilidad que caracterizan a los inmunoensayos en formato de *microarray*. (Cretich, Damin and Chiari, 2014; Nielsen and Geierstanger, 2004; Saviranta *et al.* 2004; Sutandy *et al.* 2013).

Las superficies que pueden emplearse para la fabricación de *microarrays* van desde materiales inorgánicos como la silicona, a metales o sus óxidos pasando por superficies de naturaleza polimérica, aunque el material cuyo uso está más extendido es el vidrio. La elección del soporte condiciona en gran medida el rendimiento del ensayo, debido a que afectará a la densidad de inmovilización de los analitos, a su biodisponibilidad, así como a su predisposición para formar uniones inespecíficas (Bañuls *et al.* 2016).

El empleo de superficies plásticas tipo disco resulta especialmente atractivo por el bajo coste de los soportes, especialmente respecto del vidrio. Las superficies resultan uniformes y son planas y químicamente activas. Además, los lectores de estos materiales plásticos permiten que la prueba sea portable, rápida y fiable (Morais, Puchades and Maquieira, 2016).

Las principales ventajas que tienen los *microarrays* son:

- I. Capacidad de multiplexado y determinación simultánea de diversos analitos. (Cretich, Damin and Chiari, 2014; Sutandy *et al.* 2013)
- II. Uso de pequeños volúmenes de muestra, en comparación a los que se emplearían en caso de realizar ensayos individuales para cada una de las proteínas en estudio. (Cretich, Damin and Chiari, 2014; Sutandy *et al.* 2013; Templin *et al.* 2002)
- III. Alta sensibilidad, debido a mejores ratios señal-ruido, por una mayor densidad de moléculas por gota o *microspot*, así como a menores distancias de difusión. (Cretich, Damin and Chiari, 2014; Sutandy *et al.* 2013; Templin *et al.* 2002)
- IV. Rápida obtención de resultados respecto de otras técnicas tradicionales o de ensayos tradicionales de detección de proteínas. (Cretich, Damin and Chiari, 2014)

No obstante, los *microarrays* para la cuantificación de proteínas también presentan desventajas como las siguientes:

Diversos estudios establecen un límite de unos 50 analitos diferentes por *microarray*, dado que por encima de esta cifra empiezan a mostrarse de forma significativa fenómenos de reactividad cruzada (Nielsen and Geierstanger, 2004, Saviranta *et al.* 2004; Sutandy *et al.* 2014) que repercuten en la selectividad del ensayo.

Elevada dependencia de la afinidad de los anticuerpos implicados para obtener un ensayo eficaz. Solamente aquellos con una alta afinidad son capaces de capturar de forma eficiente la proteína diana, evitando las uniones no específicas que podrían llegar a generar ruido de fondo y falsos positivos (Nielsen and Geierstanger, 2004; Sutandy *et al.* 2014).

Disponibilidad de reactivos biológicos. Se estima que solamente 5-20% de los anticuerpos comerciales dan buenos resultados en formato *microarray*. No podemos obviar el hecho de que el formato sándwich requiere de dos anticuerpos con afinidad por distintos epítomos de una misma proteína (Cretich, Damin and Chiari, 2014).

Falta de uniformidad en la impresión de las biomoléculas que componen los *microarrays*, en términos de morfología o cantidad dispensada, lo que genera variabilidad y condiciona la reproducibilidad de la tecnología (Cretich, Damin and Chiari, 2014; Nielsen and Geierstanger, 2004).

Pese a los inconvenientes mencionados anteriormente, el empleo de *microarrays* en el ámbito del diagnóstico clínico resulta prometedor por su bajo coste en relación con la cantidad de información que aporta, así como por su capacidad de acercar el descubrimiento de biomarcadores a la práctica del diagnóstico clínico. (Cretich, Damin and Chiari, 2014).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es el desarrollo de *microarrays* de anticuerpos en una superficie interactiva tipo DVD para la determinación de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) en plasma sanguíneo.

Para ello, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- (I) Estudio de condiciones y puesta a punto del ensayo sándwich.
- (II) Determinación de las prestaciones analíticas del ensayo.
- (III) Análisis de muestras de plasma de personas sanas y pacientes con patología tromboembólica y comparación de resultados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y materiales

Las disoluciones reguladoras empleadas en el procedimiento experimental fueron tampón fosfato salino (PBS), preparado a partir de KH_2PO_4 , NaCl, KCl y Na_2HPO_4 procedentes de Scharlau (Sentmenat, Barcelona, España); tampón fosfato salino con 0,05% (m/v) de Tween-20 (PBST), elaborado a partir del PBS y de Tween-20 de Scharlau (Sentmenat, Barcelona, España); tampón fosfato 50 mM y pH 7,5 preparado utilizando KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 procedentes de Scharlau (Sentmenat, Barcelona, España); tampón Tris 50 mM y pH 8,5 preparado a partir de trizma base y trizma HCl de Sigma (Madrid, España) y tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 preparado a partir de las sales NaHCO_3 y Na_2CO_3 de Scharlau (Sentmenat, Barcelona, España).

Como controles positivos se emplearon inmunoglobulinas G de cabra anti-ratón (*GAM*) de Abcam (Cambridge, Reino Unido) e inmunoglobulinas G de conejo biotiniladas (*RiGg-Bt*), a una concentración de impresión de 25 y 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. El control negativo empleado fue una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) de Sigma Aldrich (Madrid, España) a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El anticuerpo de captura (biG 43), es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-LBP humana (Biometec, Greifswald, Alemania) que se preparó a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de impresión (Tris 50 mM y pH 8,5).

Para la elaboración de las curvas de calibrado se empleó LBP humana recombinante de Biometec (Greifswald, Alemania). El anticuerpo de detección (biG 412) es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-LBP humana (Biometec, Greifswald, Alemania), que se biotiniló, empleando el kit *EZ-Link Micro NHS-PEG₄ Biotinylation Kit* (Thermo Scientific, Madrid, España). Como sistema de amplificación de la señal, se utilizó estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) de la empresa Dr. Fooke (Neuss, Alemania). Como sustrato cromogénico para el revelado de los resultados se utilizó 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) de SDT-Reagents for life (Baesweiler, Alemania).

Las muestras de plasma de personas sanas y pacientes diagnosticados de patología tromboembólica fueron proporcionadas por el Grupo de Investigación del ISS La Fe de València. La concentración de LBP humana en plasma fue determinada mediante ELISA, utilizando el kit de Biometec (Greifswald, Alemania).

El soporte en el que se realizaron los ensayos fueron discos DVD-R (Mediarange 16X). También se utilizaron superficies de policarbonato transparentes de 0,6 mm de espesor del Grupo Condor S.L., (Calatayud, Zaragoza, España) para la distribución homogénea de la disolución de revelado.

3.2 Equipos

Los *microarrays* se prepararon utilizando un dispositivo de impresión de líquidos automático de no contacto Biodot (AD 1500 BioDot Inc. Irvine, CA, USA). (Figura 3).

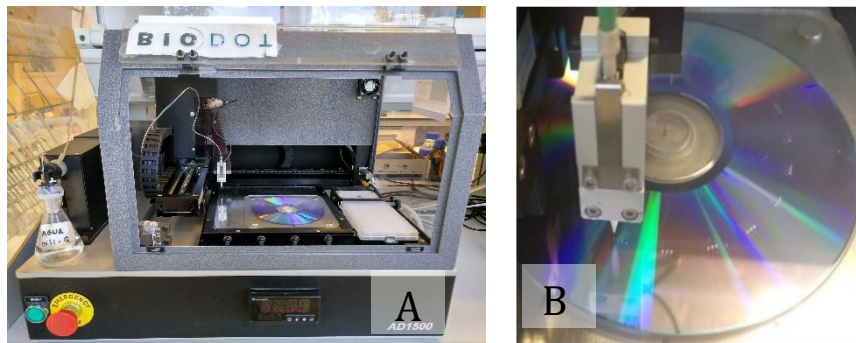


Figura 3. A) Dispensador de líquidos Biodot. B) Imagen de la impresión de un disco DVD.

La centrífuga de motor de inducción de alta frecuencia (Medifriger BL-S 7001377) de J.P Selecta (Barcelona, España), se utilizó en el proceso de biotinilación del anticuerpo de detección biG 412.

La lectura de las señales analíticas en DVD se realizó con un lector de discos digitales ópticos (Lab-Player) en modo de reflexión, utilizando una longitud de onda de 650 nm. (Figura 4).



Figura 4. Lector de discos DVD Labplayer.

Los resultados del método de cuantificación de LBP mediante placa ELISA, se leyeron a 450 nm con un espectrofotómetro de placas, modelo Victor 1420 (Wallac Oy, Turku, Finlandia.) (Figura 5).



Figura 5. Lector de placas ELISA modelo Victor 1420.

3.3 Protocolos empleados

3.3.1 Biotinilación del anticuerpo biG 412

El proceso de biotinilación del anticuerpo detector biG 412, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-LBP humana, proporcionado por Biometec (Greifswald, Alemania) se realizó utilizando el kit *EZ-Link Micro NHS-PEG₄ Biotinylation Kit* de Thermo Scientific (Madrid, España), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante:

En primer lugar, se diluyeron 50 µg de biG-412, previamente reconstituido en 50 µL agua milliQ, en 250 µL de PBS.

Por otra parte, se reconstituyó el preparado de biotinilación comercial con 170 µL de agua milliQ. De esta disolución se tomaron 10 µL que a su vez se diluyeron en otros 20 µL de agua milliQ. A continuación, se mezclaron los 300 µL de la disolución que contenía el biG 412 con 2,45 µL del preparado de biotinilación. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente, el exceso de biotina se eliminó empleando una columna *Zeba Spin Desalting Columns 2mL* (Thermo Scientific, Madrid, España).

La columna se introdujo en un tubo Falcon de 15 mL, se centrifugó durante 2 minutos a 1000 g, descartándose el eluido resultante. Después, la columna se lavó y equilibró, añadiendo 1,0 mL de PBS y centrifugando durante 2 minutos a 1000g, y el eluido se descartó. Esta etapa se repitió tres veces.

A continuación, la disolución de biG-412 biotinilada se cargó en la parte superior de la columna, y una vez absorbida por completo en la resina, se añadieron 40 µL de PBS para asegurar que toda la muestra se introducía completamente. A continuación, la columna se metió en un nuevo tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 2 minutos a 1000 g. El eluido (biG412 biotinilada y purificada) se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se conservó a 4 °C hasta su uso.

3.3.2 Impresión de reactivos

Las diferentes disoluciones se dispensaron en microgotas de 35 nL en la superficie de policarbonato de los discos DVD-R en un formato de *microarray*, empleando un dispensador de líquidos, a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 90%. El diseño del *microarray* consiste en 16 puntos, distribuidos en forma de matriz 4 × 4, como puede verse en la Figura 6. Con esta disposición, se imprimen cuatro réplicas de cada reactivo y 20 *microarrays* por disco.

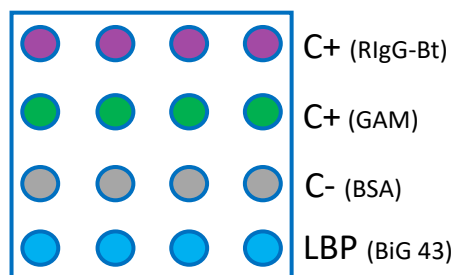


Figura 6. Diseño del *microarray*.

Como se ha mencionado en el apartado 3.1 los reactivos presentes en cada *microarray* son, de arriba abajo, la inmunoglobulina G de conejo biotinilada (RlgG-Bt) a una concentración de impresión de 4,5 µg/mL como control positivo (C+) de la etapa de amplificación con estreptavidina-HRP, GAM a 25 µg/mL como control positivo (C+) del reconocimiento del biG 412, BSA a 50 µg/mL como control negativo (C-) y el anticuerpo de captura (biG 43) a

50 µg/mL para la determinación de LBP humana. En todos los casos las disoluciones se prepararon en tampón Tris 50 mM y pH 8,5.

Tras su impresión, los discos se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37 °C, para la inmovilización de los reactivos en la superficie del disco por adsorción.

3.3.3 Protocolo de ensayo

Transcurrido el tiempo de incubación a 37 °C, el disco se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) antes de utilizarlo. Seguidamente, el disco se lavó con PBST primero y agua destilada después y se secó por centrifugación durante un minuto a 1000 rpm en una centrífuga adaptada para superficies planas. A continuación, 30 µL de cada una de las muestras, previamente diluidas a 1/200 en PBST, se depositaron con una micropipeta sobre las diferentes micromatrices. Transcurridos 30 minutos, el disco se lavó y secó como antes. Posteriormente, el anticuerpo BiG-412 biotinilado (dilución 1/100) se añadió a razón de 30 µL/*microarray* y se dejó incubar durante 15 minutos. Pasado este tiempo se llevó a cabo la etapa de lavado y secado como se ha descrito anteriormente. A continuación, se añadió estreptavidina-HRP a una dilución 1/1000, depositando 30 µL/*microarray* y se dejó incubar durante 15 minutos. La disolución se preparó en dos etapas, en la primera se mezclaron 2 µL de estreptavidina- HRP con 38 µL de PBST y posteriormente, 16 µL de esta disolución se llevaron a 800 µL con PBST. El disco se lavó y secó como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se añadió 1,0 mL de TMB que se distribuyó de manera homogénea con la ayuda de un disco de policarbonato de 12 cm de diámetro y 0,6 mm de grosor. Durante los 10 minutos de revelado, se genera un precipitado azul de diferente intensidad (densidad óptica) en cada uno de los puntos del *microarray*, de acuerdo con la cantidad de proteína LBP presente en la muestra. La reacción colorimétrica se para a los 10 minutos, lavando el disco con agua destilada. El disco se seca como se ha descrito anteriormente antes de su lectura.

En la Figura 7 se muestra un esquema del inmunoensayo para la determinación de LBP.

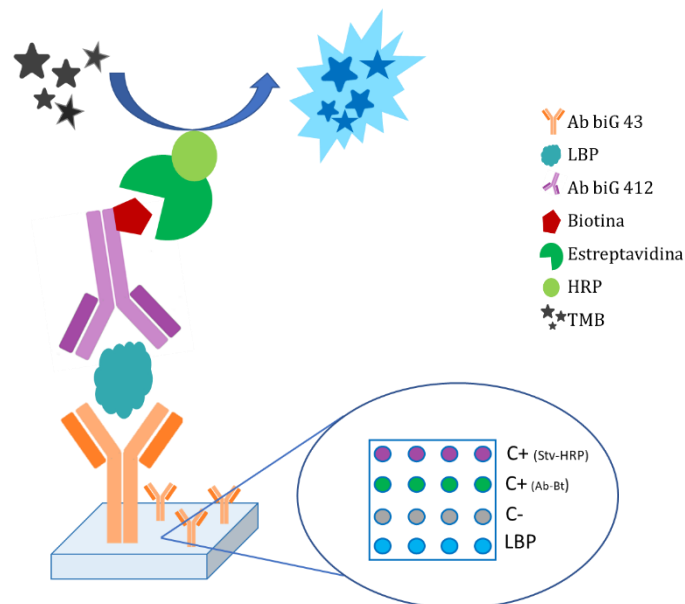


Figura 7. Esquema del inmunoensayo en formato *microarray* para la determinación de LBP.

3.3.4 Lectura y análisis de los resultados del ensayo

Los resultados de los discos se obtuvieron empleando un lector de discos digitales ópticos Lab-Player, en modo reflexión. El principio de detección con un lector de DVD se basa en registrar la intensidad de luz reflejada por la capa metálica del disco por medio del fotodiodo del cabezal del grabador. Cualquier alteración de las propiedades ópticas del disco modifica la intensidad de luz reflejada por este, atenuando la señal detectada por el fotodiodo. Las imágenes capturadas por el lector se procesaron con un *software* desarrollado por el grupo de investigación (Dobosz *et al.* 2015).

Para cada muestra se calcularon el promedio y la desviación estándar de sus réplicas. A continuación, se trataron y analizaron los datos con los programas MedCalc 14.8.1 y Statgraphics XVII. La determinación de las prestaciones analíticas (EC_{50} , Intervalo de cuantificación, límite de detección o R^2) así como los ajustes de las curvas de calibrado con un modelo de regresión no lineal de 4 parámetros logísticos, se realizaron con el programa SigmaPlot 11.0.

3.3.5 Protocolo de cuantificación de LBP mediante placa ELISA

El siguiente protocolo se corresponde con las instrucciones del Kit *Enzyme Immunoassay for Quantification of free human LBP* de Biometec (Greifswald, Alemania), proporcionado por el fabricante.

En primer lugar, se añadieron, por duplicado, 100 μ L de cada muestra o estándar, a una dilución de 1/800 en PBST; a los diferentes pocillos de la placa ELISA, previamente tapizados con anticuerpo de captura. La placa se dejó incubar durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. En lo que respecta a los patrones de calibración, estos se prepararon por dilución seriada (1/2) a partir de un patrón de LPB humana de 50 ng/mL. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se lavó tres veces con PBST. A continuación, se pipetearon 100 μ L de anticuerpo detector, marcado con HRP, en cada pocillo (14 ng/mL). Se dejó incubar durante 60 min, a temperatura ambiente y en agitación. Al término de este tiempo, se lavó por triplicado con tampón de lavado (PBS con 0,05% (m/v) de Tween-20). Posteriormente, se pipetearon 100 μ L de disolución de sustrato en cada pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurridos 14 min, se añadieron 100 μ L de disolución interruptora en cada pocillo. La absorbancia a 450 nm se midió, utilizando un lector de placas ELISA, modelo Victor 1420.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de condiciones del inmunoensayo

El inmunoensayo puesto a punto consta de cinco etapas: impresión de reactivos, incubación de la muestra, incubación del anticuerpo detector, incubación de la estreptavidina marcada y revelado enzimático. Las variables objeto de estudio de cada etapa fueron, principalmente, la concentración de los reactivos y tiempo de reacción, utilizando como criterio de selección la sensibilidad y reproducibilidad, así como el tiempo total de ensayo.

4.1.1 Impresión de los reactivos en los *microarrays*

Para la impresión de los reactivos se estudiaron tres tampones diferentes: tampón fosfato 50 mM y pH 7,5; tampón Tris 50 mM pH 8,5 y tampón carbonato 50 mM a pH 9,5. Los resultados se evaluaron cualitativamente, imprimiendo el anticuerpo de captura a diferentes concentraciones (12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los mejores resultados se obtuvieron, utilizando el tampón Tris 50 mM, pH 8,5, ya que el precipitado resultante de la inmunointeracción era más intenso (mayor densidad óptica) para el rango de concentraciones estudiadas.

4.1.2 Reactivos del ensayo y revelado

Como punto de partida, el tiempo de incubación de las etapas del inmunoensayo fue 30 minutos, y para la etapa de revelado cromogénico con TMB fue 10 minutos.

La aparición de señales relativamente altas en ausencia de LBP fue la causa que condujo a estudiar cómo contribuía el tiempo de incubación en la densidad óptica del producto de la inmunointeracción. Como se muestra en la Figura 8, el tiempo de incubación del anticuerpo detector tenía una gran influencia en la intensidad de la señal, es decir, en la sensibilidad del ensayo. Para evaluar este efecto se calcularon los ratios señal-ruido (SNR) expresada como la relación entre la señal promedio obtenida en *microarrays* expuestos a una concentración de LBP de 100 ng/mL respecto la señal obtenida en los *microarrays* en ausencia de LBP. Los valores de SNR fueron 4,2 y 1,4 para 15 y 30 minutos de incubación, respectivamente para la dilución 1/100 de anticuerpo detector. Las diluciones de anticuerpo 1/25 y 1/50 dieron resultados de SNR similares, mientras que diluciones de anticuerpo 1/200 y superiores proporcionaban intensidades de señal bajas. Así pues, se seleccionó la dilución 1/100 para estudios posteriores. Adicionalmente, se realizaron dos test-T de muestras pareadas para los tiempos de incubación de 15 y 30 minutos (dilución 1/100 de anticuerpo detector) con un nivel de confianza del 95%. El resultado fue que sí existían diferencias significativas entre los dos tiempos ($p < 0,001$) y ($p = 0,007$) para las concentraciones de 0 y 100 ng/mL de LBP, respectivamente. Por ello, el tiempo de incubación del anticuerpo se ajustó a 15 minutos.

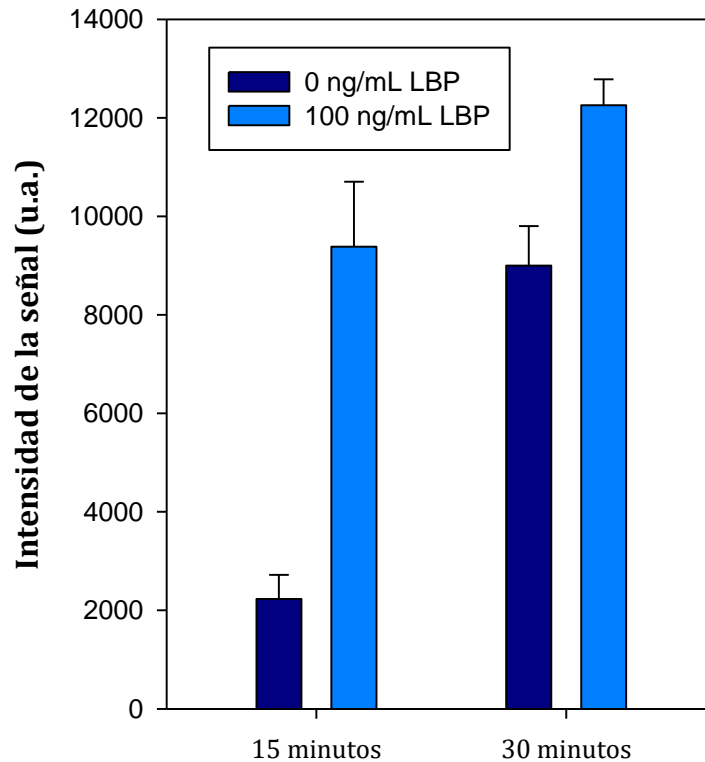


Figura 8. Efecto del tiempo de incubación del anticuerpo detector biG 412 en la intensidad de señal.

Por último, se estudiaron las condiciones relativas a la estreptavidina-HRP, probándose tiempos entre 5 y 30 minutos, y diluciones en el intervalo 1/500-1/8000. Los mejores resultados se obtuvieron para el tiempo de 15 minutos y diluciones 1/1000 y 1/2000. En la Figura 9 se muestran los resultados de intensidad de señal obtenidos para las diluciones seleccionadas. Los valores de SNR, calculados como se ha descrito anteriormente, fueron 3,1 y 29,2 para la dilución 1/2000 y 1/1000, respectivamente. Adicionalmente, se realizaron dos test-T de muestras pareadas para las diluciones de estreptavidina-HRP 1/1000 y 1/2000 con un nivel de confianza del 95%. El resultado fue que sí existían diferencias significativas entre ambas diluciones ($p < 0,001$) y ($p = 0,013$) para las concentraciones de 0 y 100 ng/mL de LBP, respectivamente. Por ello, se seleccionó la dilución 1/1000 de estreptavidina-HRP para los estudios posteriores.

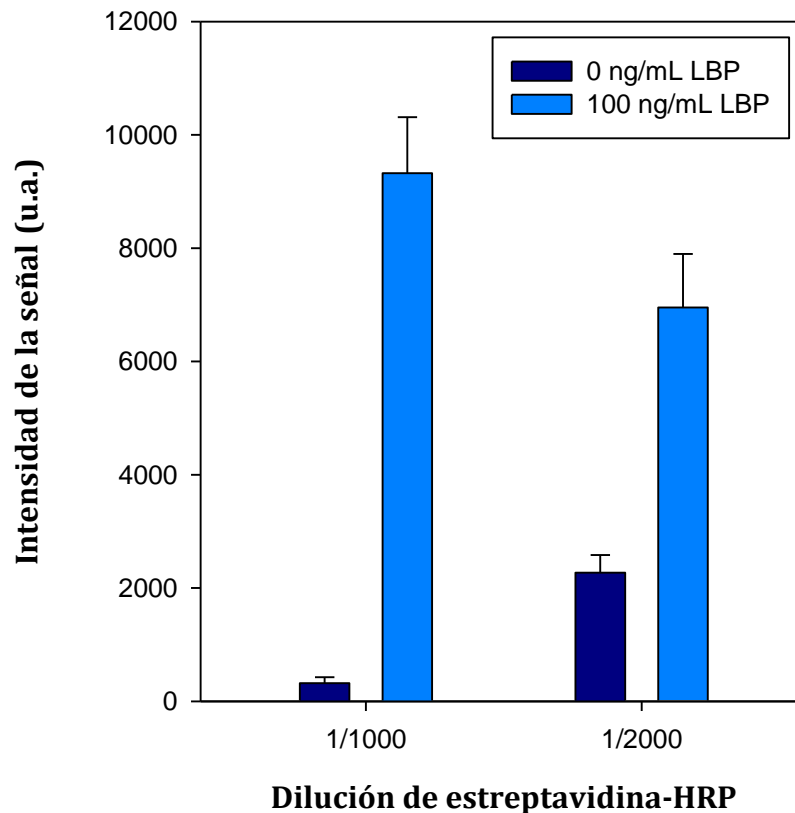


Figura 9. Efecto de la dilución de la estreptavidina-HRP en la intensidad de señal.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de las condiciones del inmunoensayo.

Tabla 2. Recopilación de las condiciones del inmunoensayo en disco.

Etapa	Dilución (PBST)	Tiempo de reacción (min)
LBP (muestra)	-	30
BiG 412 biotilado	1/100	15
Estreptavidina-HRP	1/1000	15
TMB	Lista para usar	10

4.2 Curva de calibrado

Una vez establecidas las condiciones del inmunoensayo en formato disco era necesario establecer, de forma sólida, una curva de calibrado en la que posteriormente se pudieran interpolar las muestras para su cuantificación. Para ello se prepararon los patrones de LBP en PBST en el intervalo de 0 a 800 ng/mL. En la Figura 10 se muestra la curva de calibrado obtenida, que es el resultado de promediar 8 curvas. Los parámetros analíticos fueron: (1) límite de detección (LD) de 22 ng/mL (2) intervalo de cuantificación 40-450 ng/mL (3) $R^2=0,9982$ (4) $EC_{50} = 131$ ng/mL.

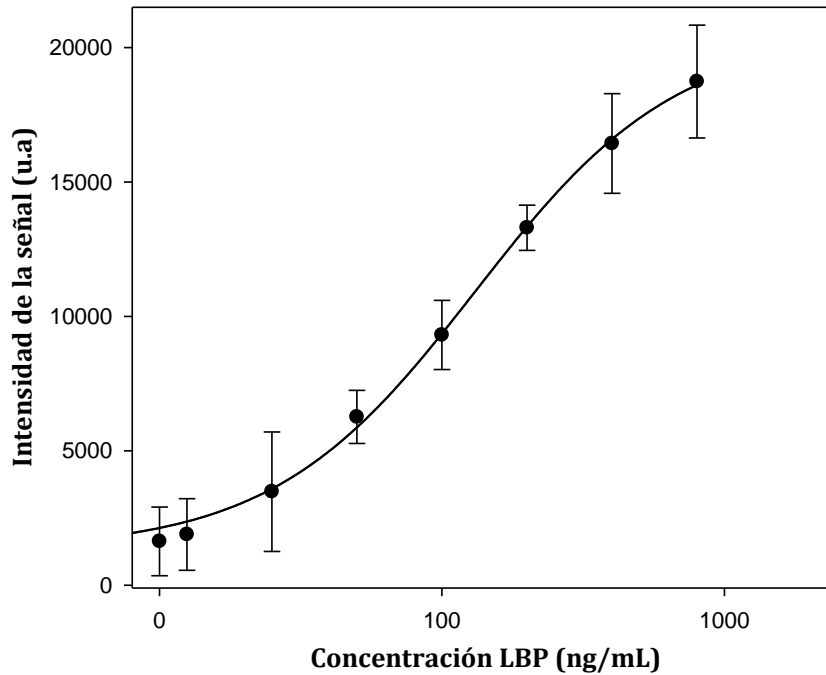


Figura 10. Curva de calibrado de LBP en *microarray* (n=8).

En la Figura 11, se muestran unas imágenes obtenidas al incubar los *microarrays* del disco con distintas concentraciones de LBP humana. En primer lugar, cabe destacar que la intensidad de los puntos correspondientes a ambos controles positivos (ver Figura 6) es independiente de la concentración de LBP y corroboran su papel en el ensayo. Por otro lado, las señales de los puntos correspondientes al control negativo son despreciables. Finalmente, se observa que la densidad óptica de los puntos correspondientes al ensayo de LBP (fila inferior) aumenta proporcionalmente con la concentración de LBP humana, indicando la selectividad del ensayo.

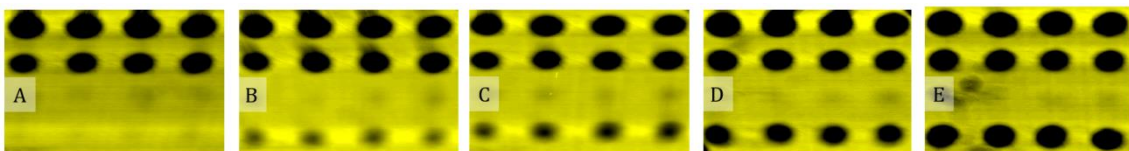


Figura 11. Imágenes obtenidas tras la lectura del disco. A) Ausencia de LBP. En las imágenes B, C, D y E, la concentración de LBP fue 25, 50, 100 y 400 ng/mL, respectivamente.

4.2.1 Comparación de las curvas de calibrado en PBST y plasma ovino

De acuerdo con la información suministrada por la empresa vendedora del kit de cuantificación de LBP, los niveles basales de LBP en plasma sanguíneo humano están en el rango de 5-15 $\mu\text{g/mL}$. Por ello, el uso de plasma humano para elaborar las curvas de calibrado no fue viable debido a la posible interferencia que causarían los niveles basales de LBP en la calibración.

Teniendo en cuenta que (1) los anticuerpos empleados en el ensayo en disco y en la placa ELISA son los mismos; (2) el fabricante indica que los anticuerpos no presentan reactividad cruzada con LBP ovina; (3) los niveles basales de LBP en oveja se encuentran

en el intervalo 10-30 ng/mL y (4) la sensibilidad del ensayo en disco, es necesario diluir las muestras de suero para poder cuantificarlas. Así, de acuerdo con los niveles basales de LBP en humanos (5-15 µg/mL) y el intervalo de cuantificación del ensayo en disco (40-450 ng/mL), las muestras de plasma deben de diluirse previa cuantificación. Así se prepararon las curvas de calibrado (n=4) en plasma ovino (dilución 1/100) en el intervalo de LBP (0-800 ng/mL). En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de señal que proporciona cada concentración de LBP preparada en PBST y plasma ovino diluido 1/100.

Tabla 3. Comparación del peso porcentual en el rango de señal de las curvas de calibrado de LBP en PBST y plasma ovino en disco.

LBP (ng/mL)	PBST (% señal)	RSD (%)	Ovino (% señal)	RSD (%)
0	0	6,8	0	3,6
25	10,8	11,7	19,3	7,0
50	27,1	5,3	24,7	7,0
100	44,9	6,7	42,1	11,2
200	68,2	4,5	62,3	15,1
400	86,5	9,9	80,5	14,6
800	100	11,2	100	7,2

Al comparar los valores obtenidos en PBST y en plasma ovino, por ejemplo, para 100 ng/mL, se observa que en un caso corresponden al 44,9% y en el otro al 42,1% con desviaciones estándar relativas del 6,7 y 11,2%; es decir, no se observan diferencias significativas entre las curvas de calibrado preparadas con ambas disoluciones para el rango de concentración de LBP estudiado, 0-800 ng/mL. Dado que la curva elaborada con PBST (Figura 10) cuenta con una muestra (n=8) mayor que la elaborada con plasma ovino (n=4), esta primera se utilizó para las cuantificaciones con muestras de pacientes y controles.

4.3 Ensayo de recuperación

Con el fin de determinar la exactitud del método desarrollado, se abordó un estudio de recuperación. Para ello, se doparon muestras de suero ovino con niveles de LBP humano conocidos y se cuantificaron, mediante interpolación en las curvas de calibrado. Así, se prepararon disoluciones de LBP humana a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL en plasma ovino.

Posteriormente, las muestras dopadas se diluyeron en PBST a una dilución 1/25, 1/50 y 1/100. El ensayo de recuperación se realizó tres veces y cada una de las réplicas para un mismo factor de dilución se estudió en discos distintos.

Las intensidades medias de las señales obtenidas para cada muestra se interpolaron en las curvas patrón de PBST y de plasma ovino 1/100. Los porcentajes de recuperación que se muestran en la Tabla 4 son el resultado de promediar ambas determinaciones. Como puede observarse, los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras oscilan entre el 75-120%; 85-110% y 89-97% para las diluciones 1/25, 1/50 y 1/100, respectivamente. Además, los porcentajes de recuperación son mejores en las muestras con mayor concentración de LBP: se han obtenido recuperaciones del 74,8%, 85,7% y 89,0% para las muestras con 5,0 µg/mL frente a recuperaciones del 106,6%, 109,1% y

97,8% para las muestras con 20,0 µg/mL. En cualquier caso, los porcentajes globales de recuperación, por encima del 93,5% para cualquiera de las diluciones aplicadas a las muestras, son indicadores de la exactitud y aplicabilidad de la metodología puesta a punto en disco.

Tabla 4. Resultados del ensayo de recuperación de LBP en muestras de plasma ovino dopadas.

Dilución muestra	LBP _A * (µg/mL)	LBP _D * (µg/mL)	Recuperación
1/25	0,0	<LD	-
	5,0	3,7 ± 1,1	74,8%
	10,0	12,0 ± 1,2	120,3%
	20,0	21,3 ± 1,0	106,6%
			100,6%
1/50	0,0	<LD	-
	5,0	4,3 ± 1,1	85,7%
	10,0	10,4 ± 0,5	103,8%
	20,0	21,8 ± 1,0	109,1%
			99,5%
1/100	0,0	<LD	-
	5,0	4,5 ± 0,3	89,0%
	10,0	9,4 ± 1,3	93,8%
	20,0	19,6 ± 0,9	97,8%
			93,5%

*A: Añadida, D: determinada.

4.4 Análisis de muestras

El Grupo de Investigación en Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascular del IIS La Fe proporcionó un total de 117 muestras de plasma, 59 correspondientes a pacientes de ETV y 58 a controles sanos. Las 117 muestras fueron analizadas para determinar la concentración de LBP por dos métodos: (1) el inmunoensayo en disco y (2) un inmunoensayo en placa ELISA de Biometec (Greifswald, Alemania).

El análisis en disco incluye cuatro réplicas por muestra. Para la cuantificación se interpolaron las señales obtenidas en la curva patrón de PBST. Cabe mencionar que en cada disco de incluyeron cuatro disoluciones de calibración: 0, 50, 100 y 200 ng/mL; a modo de control y para garantizar que las muestras incluidas en dicho disco podían cuantificarse interpolándose en la curva patrón de PBST.

En el caso del inmunoensayo en placa ELISA, las muestras se analizaron por duplicado en un total de tres placas ELISA comerciales. En cada placa se incluyeron dos réplicas del suero de referencia (11,9 ng/mL) y las disoluciones de calibrado (0-50 ng/mL). Para cuantificar las muestras se interpolaron los valores de absorbancia a 450 nm obtenidos en la curva patrón de cada una de las placas ELISA. El límite de detección (LD) del ensayo fue 0,51 ng/mL y una sensibilidad, calculada como el valor de EC₅₀, de 28 ng/mL.

En las Tablas 5 y 6 se muestran los resultados de la cuantificación de LBP para las muestras correspondientes a los pacientes con patología tromboembólica y para las muestras de individuos sanos, respectivamente. En cada una de las tablas se detalla el valor de LBP determinado con el inmunoensayo en placa ELISA y el determinado por el

inmunoensayo en disco en formato de *microarray*. Las muestras se diluyeron 1/800 y 1/200, respectivamente, para los citados formatos de ensayo. Los valores promedio de LBP para cada uno de los grupos, así como la desviación estándar de los mismos se muestra en la Figura 12.

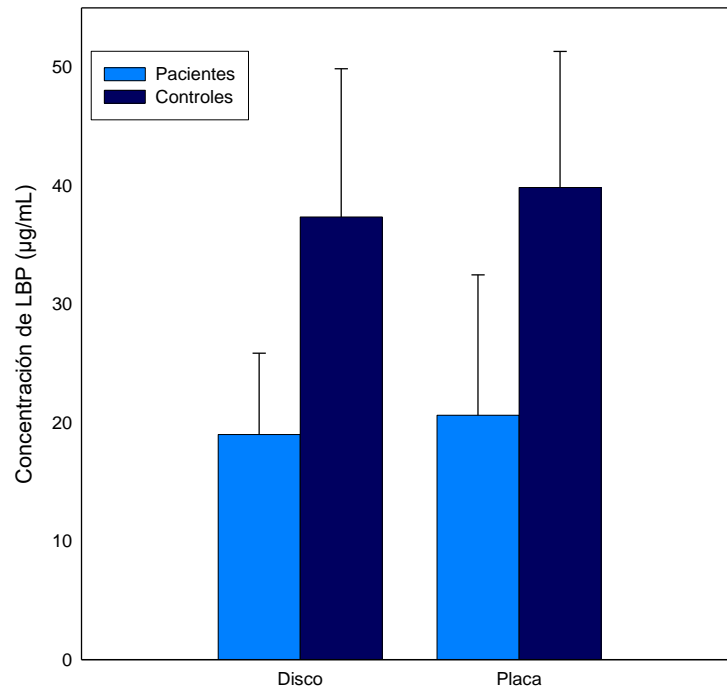


Figura 12. Valores medios de LBP obtenidos en el análisis de muestras clasificados por grupo y metodología empleada.

Tabla 5. Concentración de LBP en muestras de pacientes con ETV determinada mediante ELISA y disco DVD.

Muestra	LBP ($\mu\text{g/mL}$) ELISA	LBP ($\mu\text{g/mL}$) Disco
1	17,63 \pm 0,36	17,90 \pm 1,89
2	15,01 \pm 0,68	14,04 \pm 3,21
3	13,67 \pm 0,16	13,84 \pm 0,77
4	14,28 \pm 0,57	14,78 \pm 1,17
5	17,06 \pm 0,21	14,95 \pm 1,98
6	29,47 \pm 0,39	31,07 \pm 0,77
7	19,03 \pm 0,21	17,52 \pm 0,86
8	13,60 \pm 1,17	13,88 \pm 1,63
9	22,23 \pm 0,93	25,80 \pm 1,24
10	24,66 \pm 1,62	27,20 \pm 4,22
11	20,53 \pm 1,03	19,95 \pm 2,63
12	7,58 \pm 0,61	9,77 \pm 0,44
13	12,29 \pm 0,29	11,05 \pm 0,36
14	13,33 \pm 1,06	14,87 \pm 0,95
15	13,70 \pm 0,23	12,01 \pm 1,66
16	20,62 \pm 1,08	20,69 \pm 0,81
17	17,64 \pm 0,45	15,92 \pm 0,58
18	17,70 \pm 0,30	22,23 \pm 0,71
19	22,00 \pm 1,20	21,28 \pm 2,38
20	15,41 \pm 0,69	17,50 \pm 0,92
21	14,53 \pm 0,88	29,47 \pm 1,02
22	14,01 \pm 0,43	14,66 \pm 0,51
23	17,86 \pm 0,19	20,18 \pm 1,72
24	15,23 \pm 1,40	18,18 \pm 1,28
25	15,32 \pm 0,29	18,59 \pm 2,50
26	11,22 \pm 0,07	13,51 \pm 0,39
27	18,53 \pm 0,72	19,46 \pm 1,59
28	21,81 \pm 1,85	21,09 \pm 0,55
29	19,70 \pm 0,52	21,75 \pm 2,60
30	23,55 \pm 4,22	22,31 \pm 4,15
31	14,75 \pm 0,20	17,13 \pm 2,26
32	14,72 \pm 0,20	12,19 \pm 1,11
33	13,70 \pm 0,65	13,24 \pm 3,19
34	20,35 \pm 0,71	20,38 \pm 2,95
35	19,33 \pm 0,09	20,76 \pm 1,06
36	11,86 \pm 0,79	15,66 \pm 0,30
37	19,28 \pm 1,17	21,88 \pm 0,62
38	16,71 \pm 0,48	22,63 \pm 0,99
39	30,62 \pm 0,86	29,43 \pm 0,52
40	46,20 \pm 0,58	28,91 \pm 0,99
41	39,46 \pm 3,47	42,59 \pm 4,65
42	32,78 \pm 3,14	35,22 \pm 4,96

Tabla 5. Continuación.

Muestra	LBP ($\mu\text{g/mL}$) ELISA	LBP ($\mu\text{g/mL}$) Disco
43	20,25 \pm 0,15	17,38 \pm 1,21
44	15,76 \pm 0,61	16,09 \pm 1,62
45	22,79 \pm 0,61	15,06 \pm 0,79
46	21,80 \pm 2,73	13,94 \pm 0,42
47	25,71 \pm 0,20	31,81 \pm 1,25
48	21,49 \pm 0,33	12,35 \pm 0,67
49	21,49 \pm 0,84	16,74 \pm 0,93
50	26,61 \pm 0,16	22,01 \pm 1,00
51	21,77 \pm 1,05	28,05 \pm 2,80
52	21,87 \pm 1,79	22,53 \pm 3,00
53	11,74 \pm 0,07	8,67 \pm 1,44
54	93,10 \pm 1,44	20,38 \pm 0,30
55	24,21 \pm 1,34	8,35 \pm 0,57
56	17,68 \pm 0,85	8,59 \pm 0,85
57	10,43 \pm 0,25	12,15 \pm 0,76
58	30,21 \pm 0,98	17,69 \pm 1,00
59	10,59 \pm 0,44	13,26 \pm 0,87

Tabla 6. Concentración de LBP en muestras de controles sanos determinada mediante ELISA y disco DVD.

Muestra	LBP ($\mu\text{g/mL}$) ELISA	LBP ($\mu\text{g/mL}$) Disco
60	16,25 \pm 1,24	14,96 \pm 0,77
61	27,06 \pm 3,35	28,04 \pm 0,78
62	26,53 \pm 0,41	26,84 \pm 1,73
63	32,66 \pm 2,20	32,29 \pm 0,89
64	27,20 \pm 0,17	27,05 \pm 3,45
65	39,90 \pm 1,16	40,79 \pm 3,48
66	28,29 \pm 2,07	28,67 \pm 4,99
67	43,91 \pm 0,75	35,29 \pm 2,31
68	27,17 \pm 2,90	30,85 \pm 1,72
69	37,43 \pm 3,33	35,46 \pm 0,50
70	33,85 \pm 1,49	277,12 \pm 18,77
71	25,76 \pm 0,63	47,85 \pm 4,55
72	26,93 \pm 0,05	168,91 \pm 3,42
73	30,83 \pm 1,33	31,45 \pm 1,18
74	25,16 \pm 1,03	30,04 \pm 3,17
75	26,10 \pm 2,57	18,49 \pm 1,22
76	18,19 \pm 0,92	21,03 \pm 2,23
77	40,42 \pm 0,46	14,26 \pm 1,12
78	48,62 \pm 1,24	29,04 \pm 1,30
79	37,51 \pm 0,57	30,69 \pm 1,65

Tabla 6. Continuación.

Muestra	LBP ($\mu\text{g/mL}$) ELISA	LBP ($\mu\text{g/mL}$) Disco
80	61,76 \pm 5,12	48,70 \pm 4,32
81	50,51 \pm 4,45	39,34 \pm 1,99
82	39,81 \pm 2,05	29,59 \pm 1,81
83	50,33 \pm 0,61	51,40 \pm 4,00
84	36,73 \pm 1,23	40,59 \pm 2,54
85	36,65 \pm 0,46	38,23 \pm 1,89
86	28,33 \pm 0,61	59,76 \pm 2,70
87	43,47 \pm 0,13	52,79 \pm 1,37
88	50,04 \pm 0,95	42,38 \pm 3,67
89	55,80 \pm 4,78	49,86 \pm 3,61
90	46,16 \pm 1,38	45,98 \pm 1,24
91	32,93 \pm 1,03	34,59 \pm 1,09
92	53,75 \pm 5,56	54,90 \pm 6,55
93	43,62 \pm 1,82	35,73 \pm 1,52
94	41,45 \pm 2,09	46,98 \pm 2,07
95	49,96 \pm 3,05	43,19 \pm 2,17
96	31,93 \pm 3,76	26,06 \pm 1,10
97	39,30 \pm 0,50	38,54 \pm 2,79
98	58,65 \pm 0,35	71,96 \pm 1,57
99	52,72 \pm 0,44	47,84 \pm 0,82
100	28,54 \pm 2,13	36,34 \pm 1,67
101	56,55 \pm 1,84	65,44 \pm 3,82
102	31,00 \pm 0,31	26,70 \pm 1,58
103	32,10 \pm 0,30	26,67 \pm 1,45
104	49,41 \pm 1,99	60,56 \pm 1,83
105	53,22 \pm 2,50	62,03 \pm 1,43
106	53,77 \pm 0,66	46,59 \pm 1,48
107	39,96 \pm 1,93	33,31 \pm 2,09
108	54,45 \pm 2,03	32,00 \pm 2,25
109	37,66 \pm 1,69	28,40 \pm 1,18
110	40,86 \pm 0,69	24,84 \pm 0,72
111	35,65 \pm 0,54	31,45 \pm 1,18
112	63,78 \pm 0,15	29,59 \pm 1,81
113	35,69 \pm 1,03	29,13 \pm 0,76
114	37,88 \pm 1,33	42,38 \pm 3,67
115	32,29 \pm 1,39	29,03 \pm 3,18
116	59,37 \pm 0,37	38,53 \pm 2,29
117	34,79 \pm 1,91	26,99 \pm 2,30

Cabe mencionar que las muestras 70 y 72, para su análisis en disco, mostraron niveles muy altos de LBP, probablemente debido a un efecto matriz no observado en el resto de 115 muestras analizadas.

En la Figura 13 se muestra un diagrama de dispersión comparando los valores de concentración de LBP determinada mediante inmunoensayo en placa ELISA y en disco. El coeficiente de correlación (r) obtenido fue de 0,73; indicando que existe una relación lineal positiva entre la concentración de LBP determinada por ELISA y disco con un intervalo de confianza para r al 95% de 0,63-0,80 y un nivel de significación $p < 0,0001$.

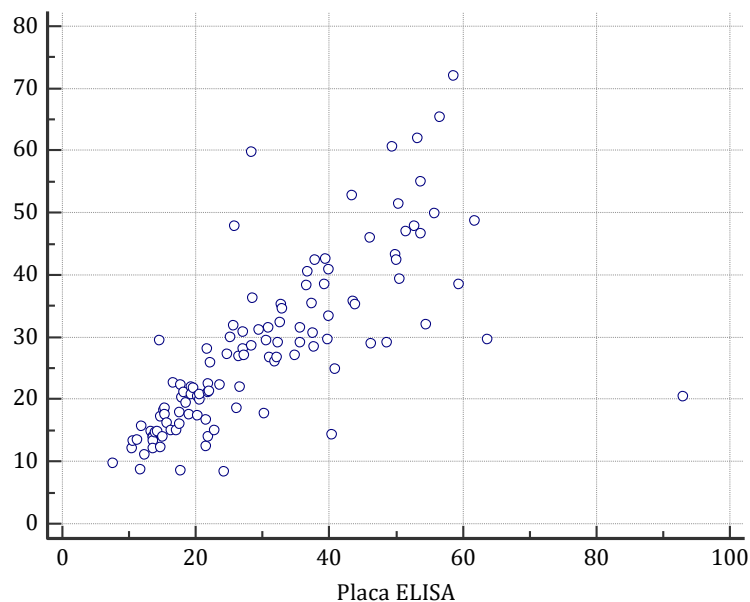


Figura 13. Diagrama de dispersión de Pearson entre los valores de concentración de LBP determinados mediante inmunoensayo en placa ELISA y *microarray* en disco.

Las muestras analizadas mediante el ensayo en disco se sometieron a un test-T de muestras pareadas para comparar los niveles de LBP entre pacientes con patología tromboembólica y controles sanos, con un nivel de confianza del 95%. El resultado mostró que existían diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$). El mismo análisis se realizó para las muestras analizadas empleando el inmunoensayo en placa ELISA, obteniéndose que existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$).

Los resultados de cuantificación de LBP en controles sanos obtenidos mediante placa ELISA y mediante *microarrays* en DVD se sometieron también a un test-T de muestras pareadas con un nivel de confianza del 95%. El resultado fue que no existían diferencias significativas entre ambas cuantificaciones ($p = 0,364$). Análogamente, el test-T se hizo con las muestras de pacientes con patología tromboembólica, también con un intervalo de confianza del 95% ($p = 0,275$), mostrando que tampoco había diferencias significativas entre ambos métodos de cuantificación.

En las Figuras 14 y 16 se muestran los resultados del análisis ROC para determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas de los inmunoensayos ELISA y en disco, respectivamente. Además, se llevó a cabo un diagrama interactivo de puntos que permitió determinar el valor de corte de la concentración de LBP con el fin de discriminar entre pacientes y controles sanos. Los resultados del ensayo en placa ELISA y en disco se muestran en las Figuras 15 y 17, respectivamente. La sensibilidad se entiende como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo (ecuación 1). Por su parte, la especificidad es la capacidad de clasificar correctamente a un individuo sano (ecuación 2). Cabe mencionar que las Figuras 14 y 16 representan gráficamente el par 100-especificidad y sensibilidad (Pita Fernández y Pértegas Díaz, 2003).

$$\text{Ecuación (1): } \textit{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Ecuación (2): } \textit{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}}$$

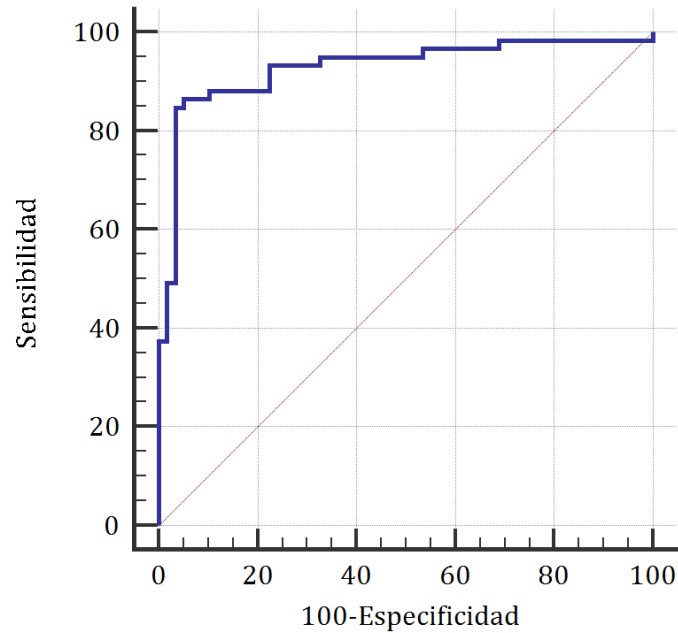


Figura 14. Curva ROC para la metodología de cuantificación de LBP en formato de placa ELISA.

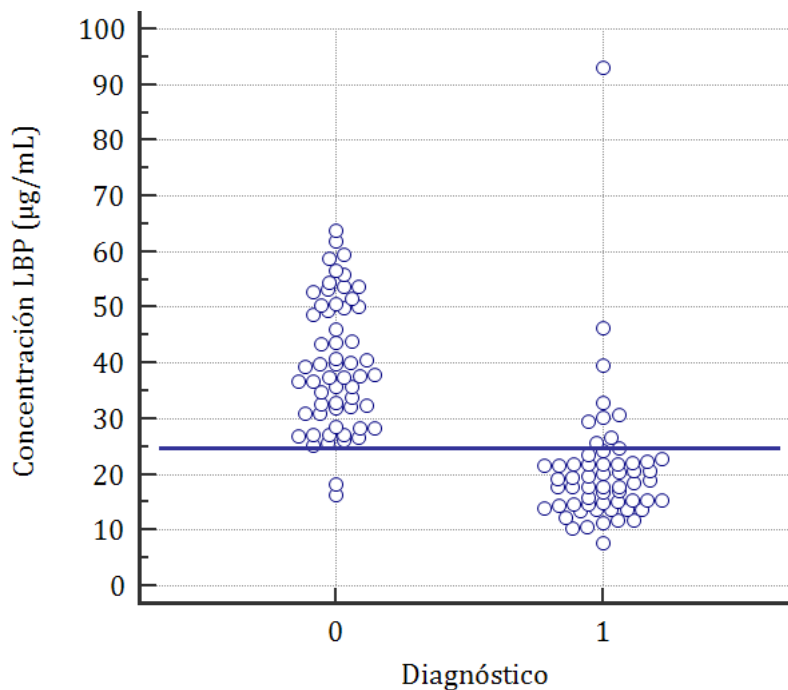


Figura 15. Diagrama de puntos para la metodología de cuantificación de LBP en formato de placa ELISA. Las cifras 0 y 1 del diagnóstico corresponden a los individuos control y pacientes con ETV, respectivamente. La línea paralela al eje X representa el valor de corte.

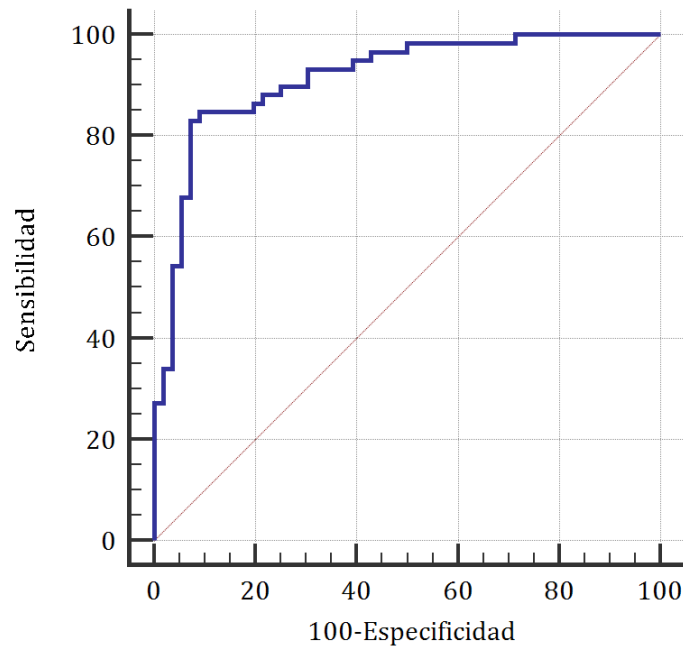


Figura 16. Curva ROC para la metodología de cuantificación de LBP en formato de *microarray* en disco DVD.

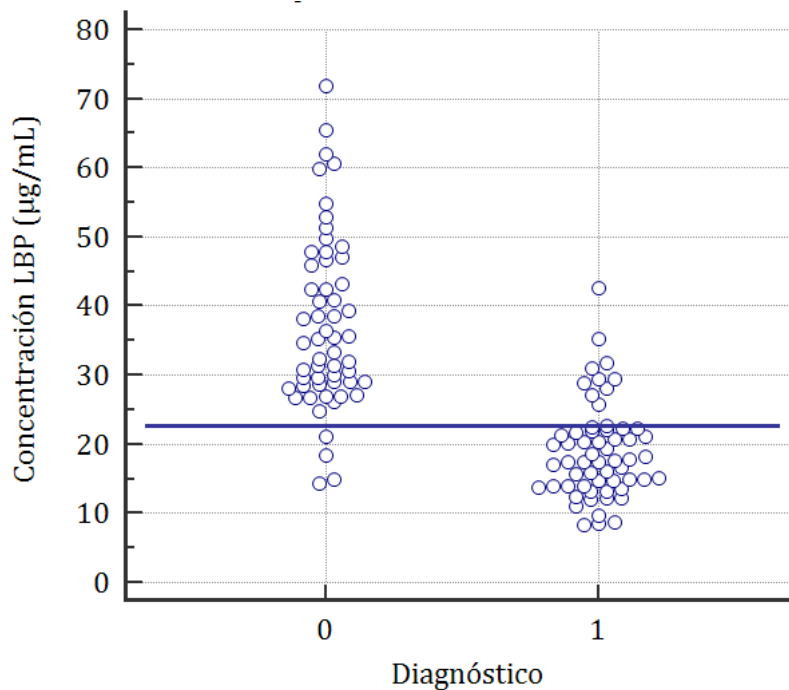


Figura 17. Diagrama de puntos para la metodología de cuantificación de LBP en formato de *microarray* en disco DVD. Las cifras 0 y 1 del diagnóstico corresponden a los individuos control y pacientes con ETV, respectivamente. La línea paralela al eje X representa el valor de corte.

El área bajo la curva en un análisis ROC oscila entre 0,5 y 1,0; y es un indicador de la exactitud diagnóstica de una prueba. De acuerdo con los datos que se muestran en la Tabla 7 se puede concluir que ambas metodologías muestran una exactitud aceptable ($> 0,90$) y una sensibilidad y especificidad diagnósticas elevadas, mayor del 83% y 92,5%, respectivamente. En el caso particular de la metodología de disco, la sensibilidad y especificidad del ensayo fue 83,1% y 92,9% respectivamente, ligeramente inferiores a las mostradas por el inmunoensayo en placa ELISA.

Tabla 7. Resumen de los parámetros obtenidos mediante el análisis ROC.

	Placa ELISA	Disco DVD
Área bajo la curva (AUC)	0,93	0,92
Intervalo de confianza 95% de AUC	0,87-0,97	0,85-0,96
Sensibilidad	84,7%	83,1%
Especificidad	96,6%	92,9%
Valor corte LBP ($\mu\text{g/mL}$)	24,66	22,63

Por último, el valor de corte de la LBP sirve para discriminar entre pacientes sanos y enfermos. Los recogidos en la Tabla 7 corresponden con aquellos que proporcionaban valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas más elevados para cada una de las metodologías utilizadas.

Hay que tener en cuenta que hasta el momento de la escritura de este TFG, no se han descrito documentalmente umbrales de concentración de LBP que se utilicen para discriminar pacientes de controles sanos en patología tromboembólica. Por lo tanto, se puede concluir que ambas metodologías son útiles como futuras pruebas de diagnóstico de ETV ya que son capaces de determinar LBP humana en plasma a niveles de ng/mL de forma fiable.

4.5 Comparación de metodologías

En apartados anteriores se han discutido las prestaciones analíticas de los inmunoensayos en placa ELISA y en disco DVD. No obstante, hay otros aspectos importantes que conviene tener en cuenta al comparar tecnologías diferentes. Para el estudio comparativo se ha valorado el tiempo y el coste del ensayo para analizar 50 muestras. Así, atendiendo a la capacidad multianálisis de ambas metodologías, el análisis de 50 muestras de plasma, por ejemplo, requiere el uso de una placa ELISA o tres discos DVD.

Si atendemos a criterios de tiempo, el tiempo total del ensayo en placa ELISA fue de 140 min, considerando que se realizan dos incubaciones de 60 min y otra de 14 min con la disolución de revelado. Además, las dos etapas de lavado tienen una duración total de 6 min. Por otro lado, el tiempo total de ensayo en disco fue aproximadamente de 80 min. Así pues, para un número reducido de muestras (<50), la reducción de tiempo al realizar el ensayo en disco es significativa.

La parte económica es otro aspecto importante a considerar cuando se comparan ambas metodologías. Así, un kit ELISA para la determinación de LBP tiene un precio de 350€, pudiendo analizar 50 muestras. Por otro lado, el coste del análisis de 50 muestras mediante el ensayo en disco DVD es de, aproximadamente, 20 €. Este precio se desglosa en: 1,5 € en discos DVD y superficies de policarbonato; 5,5 € por cada uno de los anticuerpos del ensayo (captura y detector); 1,5 € de la parte proporcional del kit

utilizado para el proceso de biotinylation; 1,5 € de LBP recombinante, así como 2,0 € por el sustrato de revelado. A esto hay que añadir el precio de los reactivos necesarios para la preparación del tampón Tris y del PBST, así como del *GAM* o la BSA empleados como controles. Podemos concluir pues, que el coste del análisis de 50 muestras de plasma mediante disco DVD es 17,5 veces menor que mediante la metodología de placa ELISA.

Por otra parte, cabe resaltar que en la placa ELISA si bien se incluye un suero de referencia como control y calibración, cada muestra se ha analizado por duplicado. En el caso del disco DVD, se promedian 4 réplicas. Además, el ensayo incluye dos controles positivos y uno negativo, lo que asegura la calidad de los resultados.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En el transcurso del presente trabajo fin de grado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- ❖ Se ha puesto a punto una metodología basada en *microarrays* en un disco DVD que permite la cuantificación específica de LBP en plasma humano en el intervalo de concentración de 40-450 ng/mL.
- ❖ Se han encontrado diferencias significativas en los niveles de LBP de individuos sanos frente a pacientes con ETV, al analizar muestras de plasma de pacientes e individuos control. Así, es la primera vez que se documenta que la LBP podría ser un biomarcador para el diagnóstico de la patología tromboembólica. En este sentido, sería muy interesante ampliar el tamaño de la muestra con el fin de afianzar estadísticamente las conclusiones extraídas en este trabajo.
- ❖ Las determinaciones de LBP realizadas con ambos métodos no presentan diferencias significativas, indicando la robustez del método desarrollado en lo que se refiere a exactitud y precisión. Así mismo, la metodología desarrollada en disco en formato de *microarray* presenta una sensibilidad y especificidad diagnósticas similares a la mostrada por el inmunoensayo en placa ELISA.

El estudio proteómico preliminar realizado en el marco del proyecto determinó un total de 28 proteínas que permitían establecer un perfil diferenciador entre pacientes de ETV y controles, de las cuales 19 no están relacionadas con el fenómeno de coagulación. En este trabajo fin de grado se ha trabajado solamente con una de esas 19 proteínas, la LBP. El estudio y puesta a punto del ensayo para otras proteínas de dicho perfil es la continuación natural de este proyecto. La determinación de estas otras proteínas en un único ensayo lo convertiría en una prueba diagnóstica muy sólida. Teniendo en cuenta que la tecnología de *microarrays*, en la que se sustenta el ensayo desarrollado en disco, permite el multiplexado, es decir, la cuantificación de diversas proteínas de forma simultánea se puede apuntar a que el inmunoensayo en formato *microarray* resultaría de gran interés como prueba diagnóstica para ETV de confirmarse la capacidad de esas proteínas para diferenciar entre pacientes y controles sanos.

Los resultados preliminares de este trabajo se presentaron como una comunicación tipo póster (Ver anexo al final del trabajo) en el *XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*, celebrado en la Facultad de Farmacia de la Universitat de València los días 5 y 6 de julio de 2018.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AL DIAB, A. (2010). Cancer-related venous thromboembolism: insight into underestimated risk factors. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 3(4), pp.191-195.
- ARNANDIS-CHOVER, T., MORAIS, S., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2014). High density MicroArrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, pp.109-114.
- BECKMAN, M., HOOPER, W., CRITCHLEY, S. and ORTEL, T. (2010). Venous Thromboembolism. A public health concern. *American Journal of Preventive Medicine*, 38(4S), pp.495-501.
- BAÑULS M.J, MORAIS S, TORTAJADA-GENARO L.A and MAQUIEIRA Á. (2016). Microarray developed on plastic substrates, en: *Microarray Technology: Methods and Applications*, vol. 1368. Humana Press.
- BOUNAMEAUX, H. and ROSENDAAL, F. (2011). Venous Thromboembolism: Why Does Ethnicity Matter? *Circulation*, 123(20), pp.2189-2191
- BRUNI-FITZGERALD, K. (2015). Venous thromboembolism: An overview. *Journal of vascular Nursing*, 33(3), pp.95-99.
- CANNEGIETER, S. and VAN HYLCKAMA VILEG A. (2013). Venous thrombosis: understanding the paradoxes of recurrence. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11, pp. 161-169.
- CRETICH, M., DAMIN, F. and CHIARI, M. (2014). Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? *The Analyst*, 139(3), pp.528-542.
- DOBOSZ, P., MORAIS, S., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2015) Massive immune multiresidues screening of water pollutants. *Analytical Chemistry*. 87: 9817-24.
- EKINS, R. (1998). Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clinical Chemistry*, 44:9, pp.2015-2030.
- FAHRNI, J., HUSMANN, M., GRETENER, S. and KEO, H. (2015). Assessing the risk of recurrent venous thromboembolism -: a practical approach. *Vascular Health and Risk Management*, p.451.
- FALANGA, A. and ZACHARSKI, L. (2005). Deep vein thrombosis in cancer: the scale of the problem and approaches to management. *Annals of Oncology*, 16(5), pp.696-701.
- GARCÍA-RÓSPIDE, V., LÓPEZ-ESPADA, C. and MALDONADO-FERNÁNDEZ, N. (2004). Estrategia diagnóstica ante la sospecha de trombosis venosa profunda. *Angiología*, 56(3), pp.253-258. (García-Róspide, López-Espada yMaldonado-Fernández, 2004).
- GOLDHABER, S. (2012). Venous thromboembolism: Epidemiology and magnitude of the problem. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 25(3), pp.235-242.

- GREER, I. (2012). Thrombosis in pregnancy: updates in diagnosis and management. *Hematology*, 1, pp. 203-207.
- GROSSE, S. (2011). Incidence-based cost estimates require population-based incidence data. A critique of Mahan et al. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(1), pp.192-193.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE). Nota de Prensa sobre la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria (EMH) 2016 (2018).
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE). Nota de Prensa sobre Defunciones según la Causa de Muerte (EDCM) 2016 (2017).
- KREIDY, R. (2014). Influence of Acquired and Genetic Risk Factors on the Prevention, Management, and Treatment of Thromboembolic Disease. *International Journal of Vascular Medicine*, 2014, pp.1-5.
- LEE, A. and LEVINE, M. (2003). Venous Thromboembolism and Cancer: Risks and Outcomes. *Circulation*, 107(90231), pp.I 17-I 21.
- LIUMBRUNO, G. and FRANCHINI, M. (2013). Proteomic analysis of venous thromboembolism: an update. *Expert Review of Proteomics*, 10(2), pp.179-188.
- MANNUCCI, P. and FRANCHINI, M. (2015). Classic thrombophilic gene variants. *Thrombosis and Haemostasis*, 114(11), pp.885-889.
- MARTINELLI, I., DE STEFANO, V. and MANNUCCI, P. (2014). Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology*, 11(3), pp.140-156.
- MORAIS, S., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2016). Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), pp.4523-4534.
- MORANGE, P., SUCHON, P. and TRÉGOUËT, D. (2015). Genetics of Venous Thrombosis: update in 2015. *Thrombosis and Haemostasis*, 114(11), pp.910-919.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). LBP lipopolysaccharide binding protein, visitada el 9 de julio de 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3929>.
- NEISWINGER, J., UZOMA, I., COX, E., RHO, H., SONG, G., PAUL, C., JEONG, J., LU, K., CHEN, C. and ZHU, H. (2016). Protein Microarrays: Flexible Tools for Scientific Innovation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), p.pdb.top081471.
- NIELSEN, U. and GEIERSTANGER, B. (2004). Multiplexed sandwich assays in microarray format. *Journal of Immunological Methods*, 290(1-2), pp.107-120.
- PITA FERNÁNDEZ, S. y PÉRTEGAS DÍAZ, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad. Aten Primaria* 10, pp.120-124. Actualizada el 7 de diciembre de 2010. Visitada el 12 de julio de 2018 https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp.
- SAVIRANTA, P., OKON, R., BRINKER, A., WARASHINA, M., EPPINGER, J. and GEIERSTRANGER, B. (2004). Evaluating Sandwich Immunoassays in Microarray

Format in Terms of the Ambient Analyte Regime. *Clinical Chemistry*, 50(10), pp.1907-1920.

- STREIFF, M. (2015). Predicting the risk of recurrent venous thromboembolism (VTE). *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 39(3), pp.353-366.
- SUTANDY, F., QIAN, J., CHEN, C. and ZHU, H. (2013). Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science*, 72(1), pp.27.1.1-27.1.16.
- SUWANABOL, P. and HOCH, J. (2013). Venous Thromboembolic Disease. *Surgical Clinics of North America*, 93(4), pp.983-995.
- TEMPLIN, M., STOLL, D., SCHRENK, M., TRAUB, P., VÖHRINGER, C. and JOOS, T. (2002). Protein microarray technology. *TRENDS in Biotechnology*, 20(4), pp.160-166.
- UNIPROT, UniProtKB-P18428 (LBP_HUMAN), visitada el 9 de julio de 2018 <https://www.uniprot.org/uniprot/P18428>.
- YALOW, R.S. and BERSON, S.A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184, 1pp.648-1649.

Núria Fuster-Valls¹, Sergi Morais^{1,2}, Silvia Navarro³, Ángel Maquieira^{1,2}

¹Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) Universitat Politècnica de València-Universitat de València. Camí de Vera s/n, 46022 València. España

²Departamento de Química, Universitat Politècnica de València Camí de Vera s/n, 46022 València. España

³Grupo de Investigación en Hemostasis, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascular. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Avda. Fernando Abril Martorell, 106. 46026 València. España
nufusval@etsiamn.upv.es

>>Contextualización<<

La enfermedad trombótica venosa (ETV) afecta al 1% de la población y los métodos existentes para identificar individuos en riesgo de padecerla resultan poco específicos. En el marco de un proyecto que pretende validar un perfil proteómico que caracteriza la ETV, se ha desarrollado, como prueba de concepto, un sistema de *microarray* en disco compacto para la detección de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP). Se han analizado un total de 46 muestras de suero sanguíneo de pacientes y controles mediante el sistema de *microarray*.

>>Ensayo<<

- Superficie policarbonato (DVD)
- *Microarray* de anticuerpos
- Inmunoensayo *sándwich*
- Detección cromogénica TMB

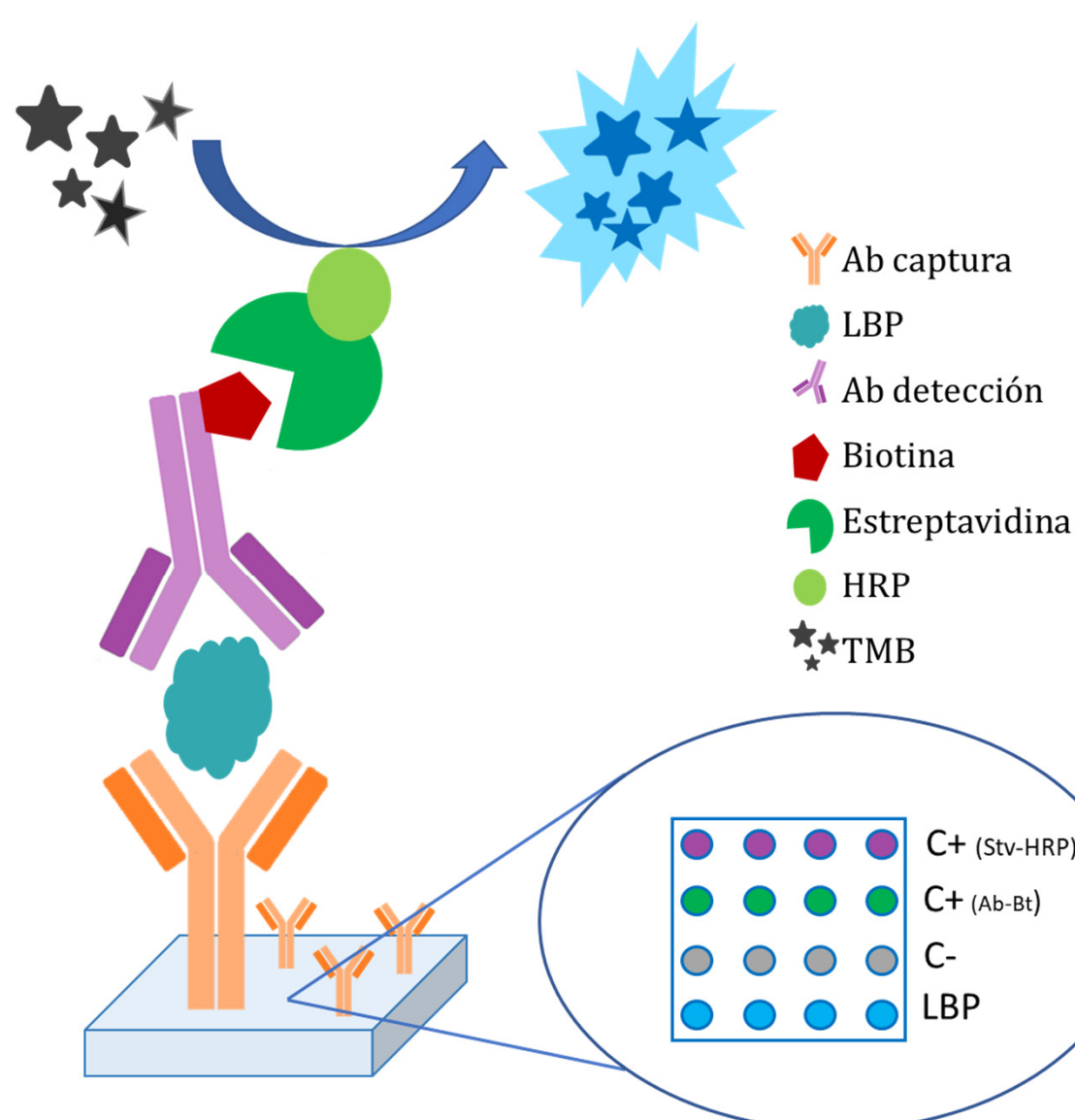


Figura 1. Esquema del ensayo tipo *sándwich*

>>Estudio de recuperación<<

LBP _A (mg/L)	LBP _D (mg/L)	Recuperación
0,0	<LD	-
5,0	4,5 ± 0,3	89,0%
10,0	9,4 ± 1,3	93,8%
20,0	19,6 ± 0,9	97,8%
		93,5%

*A: Añadida y D: Determinada

Tabla 1. Estudio de recuperación de LBP en suero mediante *microarray*.

>>Microarrays y Recta de calibrado<<

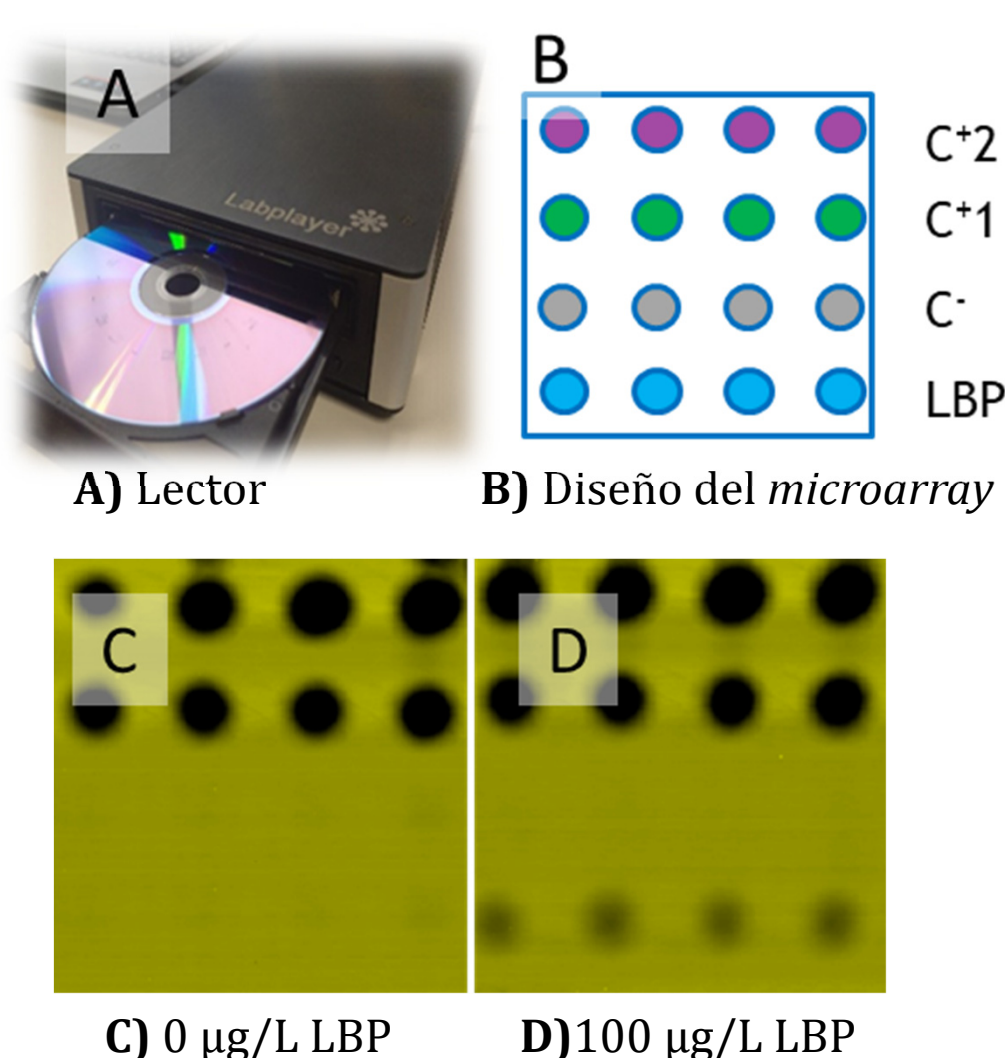


Figura 2. Características y resultados del *microarray*.

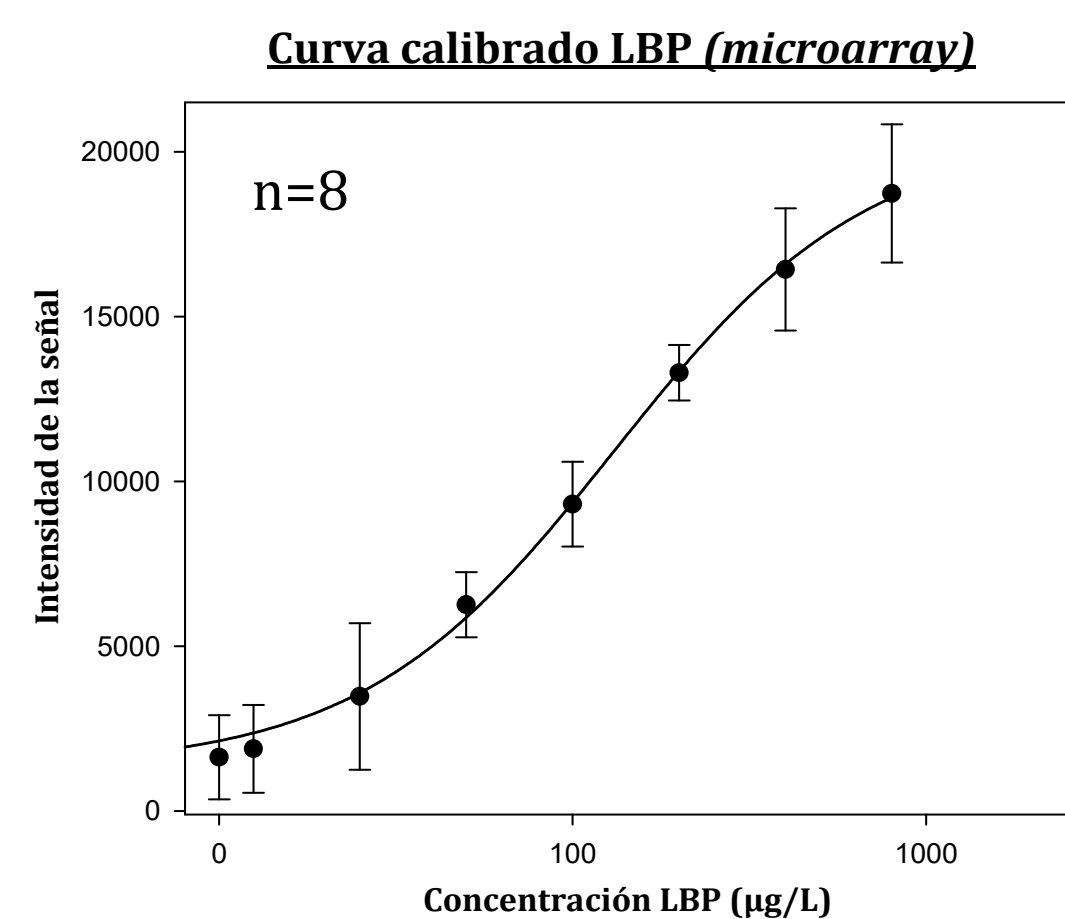


Figura 3. Curva de calibrado de LBP en *microarray*.
EC₅₀ = 131 µg/L R² = 0,99 LD = 22 µg/L
Intervalo cuantificación: 41-296 µg/L

>>Análisis de muestras<<

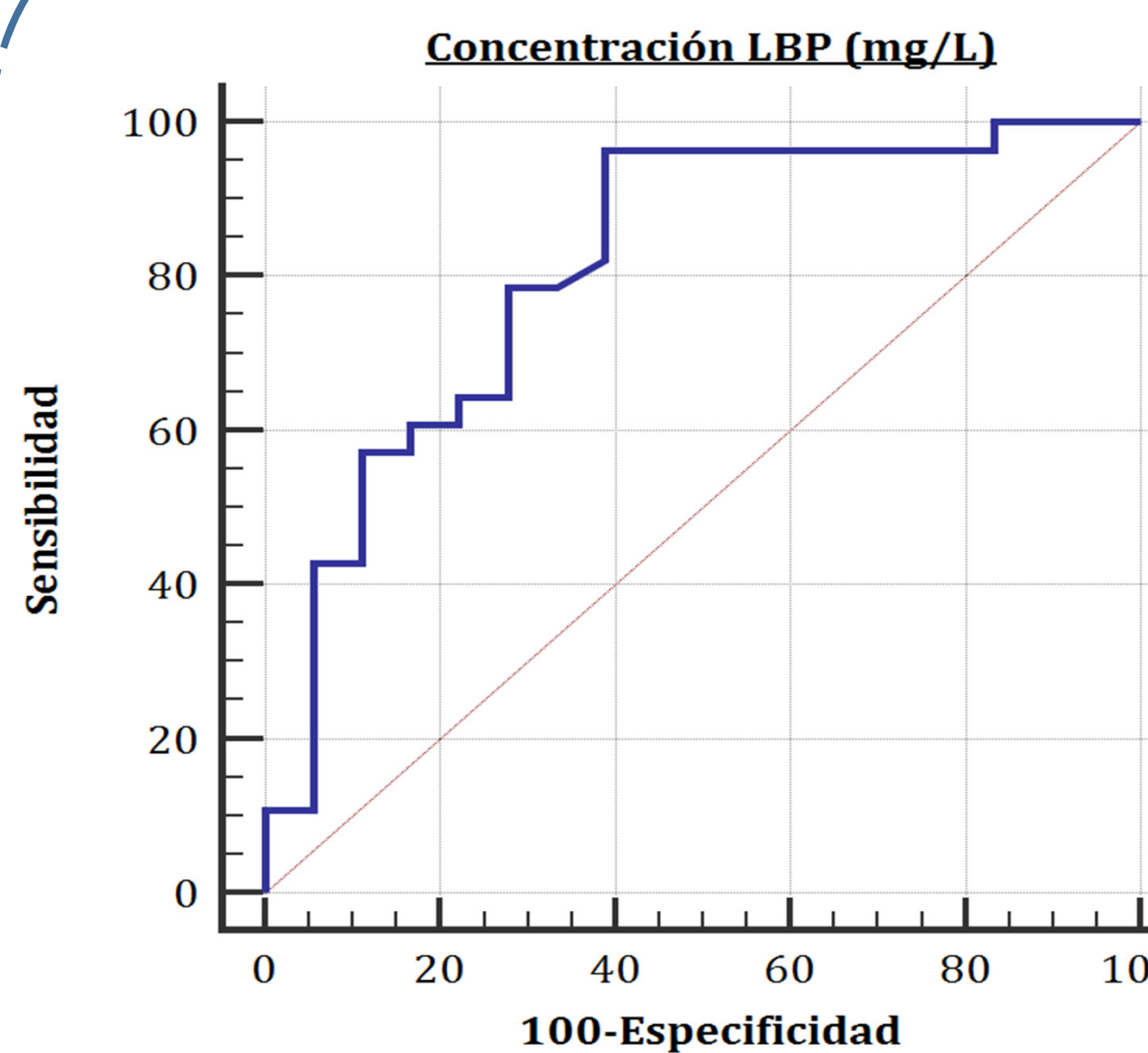


Figura 4. Análisis ROC del ensayo en *microarray*.
AUC = 0,814
Valor de corte ≤28,4 (mg/L)
Sensibilidad: 78,6%
Especificidad: 72,2%

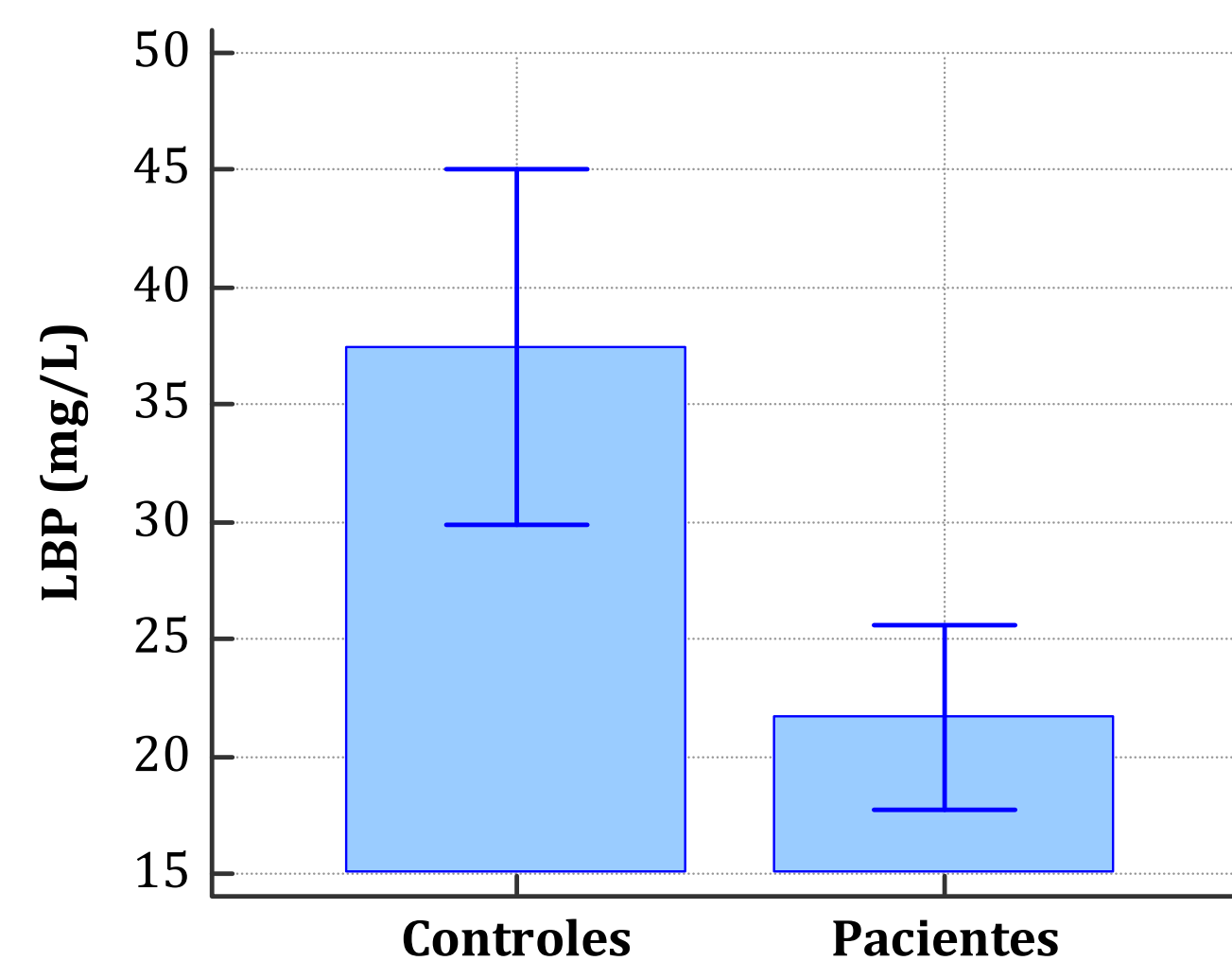


Figura 5. Valores medios de LBP cuantificados en las muestras analizadas.
n = 46: 28 pacientes y 18 controles

>>Conclusión<<

Se ha desarrollado un ensayo en formato *microarray* que permite la determinación de LBP en suero sanguíneo a niveles de µg/L, permitiendo discriminar entre pacientes de ETV e individuos control, con una sensibilidad y especificidad superiores al 72%. Las prestaciones del ensayo hacen pensar que puede utilizarse como prueba diagnóstica para la identificación de pacientes con enfermedad trombótica venosa.

>>Agradecimientos<<

Este trabajo ha sido financiado por el programa de ayudas de proyectos de colaboración UPV-La Fe (2017/C28), y ayudas del ISCIII (PI14/00512).