

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***PUESTA A PUNTO DE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA C- REACTIVA (CRP) MEDIANTE RECONOCIMIENTO MOLECULAR. ESTUDIO DE PRESTACIONES***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: ALEJANDRA VARGAS VALDERRAMA

TUTORA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

*Curso Académico: 2013-2014*

VALENCIA, 30 DE JUNIO DE 2014

## PUESTA A PUNTO DE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP) MEDIANTE RECONOCIMIENTO MOLECULAR. ESTUDIO DE PRESTACIONES.

---

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cerca de 17 millones de personas murieron en 2008 debido a enfermedades cardiovasculares (CVD) convirtiéndose en un problema serio para la salud pública. Debido a esto, muchos grupos de investigación centran sus esfuerzos en la caracterización de nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico rápido y fiable de las mismas.

La proteína C-reativa ha sido reconocida como uno de los biomarcadores de CVD y procesos inflamatorios. Así pues, dada su importancia clínica, actualmente es posible encontrar sistemas de detección de la misma en suero sanguíneo, principalmente mediante el inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Sin embargo, las técnicas tradicionales presentan inconvenientes como la necesidad de grandes cantidades de muestra para el diagnóstico o tiempos de detección largos. Es por eso que tecnologías alternativas, como son los biosensores, van ganando terreno en el campo del diagnóstico clínico ya que sus prestaciones son cada día mayores.

Con el presente trabajo se pretende poner a punto un sistema de detección para la proteína C-reativa en formato *microarray*. Para ello, se analizan y comparan los distintos parámetros críticos que componen un *microarray*: 1) formato del biosensor (inmunoensayo competitivo directo o indirecto); 2) tipo de bioreceptor (anti-CRP monoclonal o policlonal o CRP); y 3) inmovilización del bioreceptor (pasiva o covalente).

Con este fin, se llevaron a cabo distintos experimentos sobre superficies funcionalizadas con distintos organosilanos para añadir a la misma grupos vinil, tiol y flúor, que fueron empleados para inmovilizar el bioreceptor por adsorción en el caso de los grupos vinil y mediante enlace covalente con los grupos tiol en superficies mixtas compuestas con flúor y tiol.

Así, se obtuvo un sistema de detección de la CRP dentro del intervalo de interés clínico (1-3 µg/mL), con porcentajes de recuperación entre 70 y 136%, mediante inmunoensayo directo competitivo en formato *microarray* usando superficies de vidrio funcionalizadas con una mezcla 1:1 en volumen de 1H, 1H, 2H, 2H Perfluorodecyl-trietoxisilano 97% y 3-Mercaptopropyl trimetoxisilano 85%.

Finalmente, en el trabajo se plantea una alternativa al inmunoensayo, basándonos en la capacidad de CRP para unirse específicamente a la fosforilcolina y se plantea la puesta a punto de un sistema donde dicha molécula actúe como bioreceptor en una superficie de resina SU-8.

Palabras claves: CRP, *microarray*, fosforilcolina, inmunoensayo, anti-CRP, biomarcador de enfermedades cardiovasculares.

Alumna: Dña. Alejandra Vargas Valderrama  
Valencia, 30 de junio de 2014  
Prof. Dña. María José Bañuls Polo

## DETECTION SYSTEM OPTIMIZATION FOR C-REACTIVE PROTEIN (CRP) BY MOLECULAR RECOGNITION. STUDY OF PERFORMANCE.

---

According to the WHO (World Health Organization), around 17 million of people died in 2008 due to cardiovascular diseases (CDV), then, becoming a public health hazard. Due to this, many researching groups have already started to characterized new biomarkers or molecules present in the human fluids to diagnose CVDs in a reliable way.

C-reactive protein is one of the already recognized biomarkers of CVD and inflammatory processes. Because of its clinic importance, it's currently available detection system of it from human blood, mainly by ELISA immunoassay (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). However, traditional techniques have some disadvantages such as the requirement of high sample amounts or long detection times. Biosensors overcome those problems, that is the reason why their design is gaining ground in the diagnostic field.

Therefore, the main objective of this thesis is the development of a system for CRP detection. For that, different critical parameters regarding to *microarray* design are analyzed and compared: 1) Biosensor format (direct or indirect competitive immunoassay); 2) type of bioreceptor (monoclonal or polyclonal antibody); 3) bioreceptor immobilization (passively or covalently).

Regarding to this, glass surfaces were functionalized with different organosilanes in order to add vinyl, thiol and Fluor groups to it, that were used further to immobilized the bioreceptor by either adsorption (with vinyl groups) or covalent bounds (with thiol groups in mixed surfaces with thiol and fluor).

Finally, it was developed a detection system for CRP within clinical range (1-3 mg/mL), with a recovery percentage around 70 and 136%, through a direct competitive immunoassay in a *microarray* printed in glass surfaces previously functionalized with a mixture 1:1 (in volume) of 1H, 1H, 2H, 2H Perfluorodecyl-triethoxysilane 97% and 3-Mercaptopropyl trimethoxysilane 85%.

In addition, we suggested an alternative to the immunoassay. So, based on the CRP capability to bind specifically phosphorylcholine (PC) is possible to optimize a new detection system in *microarray* format where PC is immobilized in a functionalized SU-8 surface.

Keywords: CRP, *microarray*, phosphorylcholine, immunoassay, anti-CRP, biomarkers of cardiovascular diseases.

Student Mrs. Alejandra Vargas Valderrama  
Valencia, 30 de junio de 2014  
Prof. Mrs. María José Bañuls Polo

# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutora, María José Bañuls, por su incondicional apoyo y ayuda en todo momento. En ella encontré la motivación y el amor a una rama que no se potencia plenamente en nuestra carrera y que aun así requiere del trabajo mano a mano de biotecnólogos y químicos.

Por supuesto, quisiera agradecer a mis padres y mi hermana que han estado apoyándome siempre en la distancia, que me han motivado no sólo durante la elaboración de este trabajo sino durante estos 4 años.

Finalmente, a Robin Van Havermaet, a Lucía Estellés y a Cristina Velasco por ser mis confidentes y animarme cuando las cosas no salían como se esperaban.

# ÍNDICE

---

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	PROTEÍNA C-REACTIVA.....	1
1.1.1.	DETECCIÓN DE LA CRP.....	3
1.2.	EL INMUNOENSAYO Y SU APLICACIÓN EN BIOSENSADO.....	3
1.2.1.	INMUNOSENSOR: DEFICINIÓN Y CLASIFICACIONES.....	5
1.3.	BIOSENSADO EN FORMATO <i>MICROARRAY</i> .....	7
1.3.1.	<i>MICROARRAYS</i> DE PROTEÍNAS.....	8
1.3.2.	TIPOS DE SOPORTE.....	9
1.4.	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN EN VIDRIO.....	10
1.4.1	INMOVILIZACIÓN QUÍMICA POR ENLACE COVALENTE.....	10
1.4.2.	INMOVILIZACIÓN FÍSICA O PASIVA.....	11
1.5.	ANTECEDENTES EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE CRP MEDIANTE INMUNOENSAYO EN FORMATO <i>MICROARRAY</i> .....	11
II.	OBJETIVOS.....	13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1	REACTIVOS.....	14
3.2	INSTRUMENTACIÓN.....	14
3.3	MÉTODOS.....	15
3.3.1.	ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE.....	15
3.3.2.	FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE.....	15
3.3.3.	INMOVILIZACIÓN PASIVA DE LAS MICROMATRICES DE CRP y Ab Y ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO.....	16
3.3.4.	INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LAS MICROMATRICES DE Ab Y ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO.....	18
IV.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	20
4.1.	ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN.....	20
4.1.1.	MARCAJE DE ANTICUERPO Y PROTEÍNA CRP.....	20
4.1.2.	FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE CON GRUPOS VINIL Y ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN DE CRP Y DE ANTI-CRP MONOCLONAL (mAb) POR ADSORCIÓN.....	21
4.2.	ENSAYOS DE BIORECONOCIMIENTO MEDIANTE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN.....	27
4.2.1.	CON CRP INMOVILIZADA EN SUPERFICIES DE VINIL.....	27
4.2.2.	CON mAb INMOVILIZADO EN SUPERFICIES DE VINIL.....	29
4.3.	ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN COVALENTE.....	30
4.3.1.	FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES TIOLADAS Y MIXTAS.....	30

4.4. PUESTA A PUNTO DEL INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE CRP EN FORMATO COMPETITIVO DIRECTO.....	33
4.5. ALTERNATIVAS AL INMUNOENSAYO: FOSFORILCOLINA (FC) COMO BIORECEPTOR .....	35
V. CONCLUSIONES. ....	37
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	378

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 Estructura cuaternaria de la CRP. A..	2
Figura 2 Esquema general de un biosensor..	4
Figura 3 Tipos de inmunoensayos.....	7
Figura 4 Tecnologías implicadas en la producción de arrays.....	9
Figura 5 Esquema de la micromatriz empleada para la realización de la recta de calibrado.....	19
Figura 6 Esquema de la funcionalización de superficies de vidrio con organosilanos.....	21
Figura 7 Ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie antes de la activación, después de la activación y después de la funcionalización.....	22
Figura 8 Curvas de calibrado para CRP-Ax.....	23
Figura 9 Curvas de calibrado para mAb-Ax inmovilizado.....	23
Figura 10 Relación señal detectada-inmovilización de CRP-Ax en vidrio funcionalizado con grupos vinil antes del lavado.....	24
Figura 11 Relación señal detectada-inmovilización de mAb-Ax en vidrio funcionalizado con grupos vinil antes del lavado.....	25
Figura 12 Fluorescencia obtenida tras los ensayos de inmovilización de CRP-Ax antes y después del lavado.....	25
Figura 13 Fluorescencia obtenida tras los ensayos de inmovilización de mAb-Ax antes y después del lavado.....	26
Figura 14 Chips de (A) CRP-Ax y (B) mAb-Ax inmovilizados en superficie de vinil antes y después del lavado.....	26
Figura 15 <i>Microarrays</i> de CRP inmovilizada a distintas concentraciones en chips de vinil e incubadas con tres concentraciones distintas de mAb-Ax.....	27
Figura 16 <i>Chips</i> para el calibrado del inmunoensayo competitivo indirecto.....	28
Figura 17 <i>Microarrays</i> de mAb inmovilizado a distintas concentraciones en chips de vinil e incubadas con tres concentraciones distintas de CRP-Ax.....	29
Figura 18 Esquema de la funcionalización con 3-Mercaptopropil trimetoxisilano.....	30
Figura 19 Ensayo de bioreconocimiento con anti-CRP inmovilizado (mAb y pAb, 500 µg/mL) y CRP-Ax en disolución (2,4 µg/mL).....	31
Figura 20 Ensayos de reconocimiento en distintas superficies mixtas (funcionalizadas con MPTS y PTFS a tres ratios distintos). .	33
Figura 21 Recta de calibrado para el inmunoensayo competitivo directo en superficie de vidrio funcionalizada con PFTS: MPTS 1:1.....	34
Figura 22 <i>Arrays</i> de hidrogel de FC, tratado con suero real, sin diluir dopado con CRP-AX a las concentraciones que se indican bajo cada chip.....	36

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

A	Analito
Ab	Anticuerpo
Ab*	Anticuerpo marcado
Ag	Antígeno
CVD	Enfermedades cardiovasculares
CRP	Proteína C-reactiva
CRP-Ax	Proteína C-reactiva marcada con fluorófor Alexa 647
FC	Fosforilcolina
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
mAb	Anticuerpo (anti-CRP) monoclonal
mAb-Ax	Anticuerpo (anti-CRP) monoclonal marcado con fluorófor Alexa 647
MPTS	3-Mercaptopropyl trimetoxisilano 85%
pAb	Anticuerpo (anti-CRP) policlonal
PBS	Tampón fosfato salino
PFTS	1H, 1H, 2H, 2H Perfluorodecyl-trietoxisilano 97%
UA	Unidades arbitrarias
Vinil	Aliltrimetoxisilano

# I. INTRODUCCIÓN

---

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cerca de 17 millones de personas murieron en 2008 (un tercio del total de muertes) debido a enfermedades cardiovasculares (CVD, por sus siglas en inglés) y para 2030 se esperan alrededor de 23,3 millones de muertes asociadas a ésta misma causa (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2013), convirtiéndose en un grave problema para la salud pública, del que no quedan exentos los países ricos. Es por ello, que en los últimos años se han acrecentado los esfuerzos en el estudio de estas enfermedades para su prevención y adecuado tratamiento.

En este sentido, muchos grupos de investigación concentran sus esfuerzos en encontrar marcadores biológicos de CVD o lo que es lo mismo analitos (proteínas o moléculas) presentes en los fluidos humanos como sangre, saliva u orina cuya presencia y concentración está fuertemente relacionada con la probabilidad de sufrir CVDs. Muchos de estos marcadores son proteínas relacionadas con la inflamación (marcadores de la inflamación) puesto que forma parte de la patogénesis de las CVDs.

Actualmente, se hallan caracterizados varios biomarcadores sanguíneos que permiten la predicción de valores de riesgo de CVDs. Entre ellos se encuentran la proteína *serum amyloid A*, interleucina-6 (IL-6), SICAM-1, troponina I, *fibrinogen* y la proteína C-reactiva; siendo ésta última una de las más estudiadas (Ramachandran, 2006).

Sin embargo, los valores obtenidos por un solo marcador no suelen ser suficientemente rotundos para diagnosticar el riesgo de padecer la enfermedad, por ello, es más conveniente realizar un multi-test, en los cuales se determina la concentración de distintos biomarcadores, añadiendo así precisión los resultados (Melin *et al.* 2010).

En cualquier caso, el desarrollo de dispositivos de diagnóstico basado en la detección de una o varios de estos marcadores comienza con la puesta a punto de una metodología que sea capaz de determinar la concentración del analito en sangre (saliva u orina) de forma específica y precisa. A lo largo de este trabajo, se discutirán distintos ensayos de detección de la CRP que se están llevando actualmente a cabo con el fin de, si no mejorar, sustituir el habitual protocolo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) que se utiliza en los test clínicos para dicha proteína (Baldini *et al.*, 2009).

## 1.1 PROTEÍNA C-REACTIVA.

La CRP es una proteína de fase aguda producida por el hígado y presente en el plasma sanguíneo de humanos, muy conservada entre vertebrados y algunos invertebrados. Su importancia radica en los procesos inflamatorios y su concentración en sangre aumenta cuando la inflamación tiene lugar. Su naturaleza y estructura le confieren un gran papel en la defensa del huésped uniéndose a patrones moleculares o PAMPs, característicos de células en apoptosis o a la superficie de patógenos (Black *et al.*, 2004).

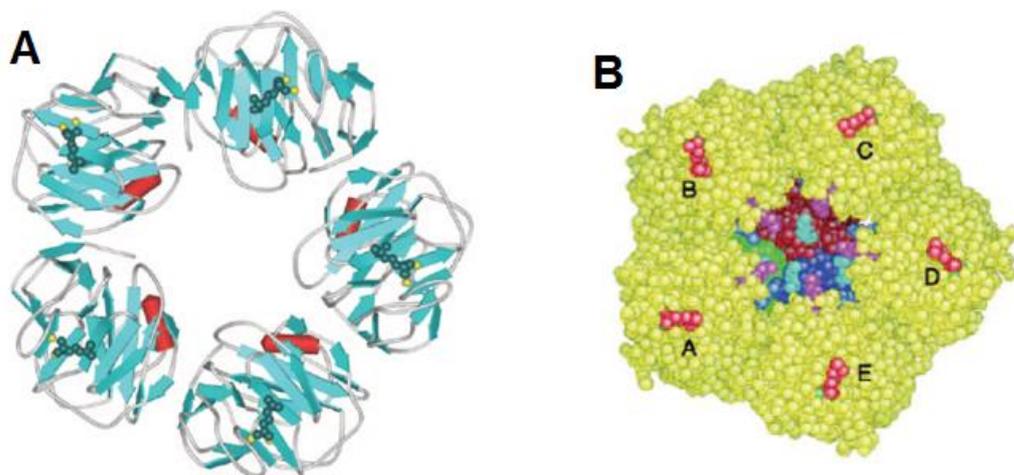
Los conocimientos sobre esta proteína se remontan al descubrimiento de la misma por el laboratorio de Oswald Avery en pacientes con *Streptococcus pneumoniae*, luego de comprobar

que ésta era capaz de precipitar los polisacáridos “C” presentes en la pared celular del mencionado microorganismo (Algarra *et al.*, 2012).

Posteriormente, Volanakis y Kaplan (Culley *et al.*, 1999) identificaron uno de sus principales ligandos específicos, la fosforicolina (FC), parte del ácido teicoico, componente de la pared celular del *Streptococcus*.

Como cualquier proteína, la CRP debe su función a su estructura. Según la misma, pertenece a la familia de las pentraxinas, es decir, está compuesta por 5 protómeros o subunidades, cada una con una cara de reconocimiento con sitio de unión a la fosforicolina formado por dos iones de calcio adyacentes a una región hidrofóbica. Varios estudios demuestran que los residuos Phe-66 y Glu-81 son fundamentales para la unión proteína-ligando (Black *et al.*, 2004).

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, ésta proteína actúa como defensa del huésped, concretamente, en la respuesta inmunitaria innata activando, por la ruta clásica, el complemento. Esto es posible gracias a una de las caras del pentámero, la cara efectora, capaz de unirse al complemento C1q y a los receptores Fcγ (Ver figura 1).



**Figura 1 Estructura cuaternaria de la CRP.** **A.** Estructura cristalográfica cuaternaria de la CRP con la fosforicolina de Thompson *et al.* (1999) El software ViewerPro 4.2 fue usado para generar el diagrama de cintas a partir de la estructura obtenida con rayos X del complejo CRP-PC obtenido de “Brookhaven Protein Data Bank” (entrada 1B09 de la PDB). Los iones de calcio están en amarillo y la fosforicolina en verde. **B.** Modelo de interacción de la CRP con C1q de Gaboriaud *et al.* (2003) Vista perpendicular. Los módulos A, B y C de la subunidad C1q están representados en azul, verde y rojo, respectivamente. A-E designa los protómeros tal como fueron descritos por Shrive *et al.* (1996) El ligando fosforicolina es la molécula roja junto con iones  $\text{Ca}^{2+}$ , en verde.

Adicionalmente, una de las mayores características de la CRP, y que la convierte en una molécula interesante para la detección de la inflamación, es su distribución equitativa a lo largo de todo el sistema vascular sin que presente retención significativa de la misma en los sitios de inflamación. Así pues, se han definido tres niveles de CRP atendiendo a la relación de la concentración de la misma en sangre con las probabilidades de sufrir una CVD: riesgo mínimo (<1 mg/L), riesgo medio (1-3 mg/L) y riesgo alto (>3 mg/L) (Algarra *et al.*, 2012).

### 1.1.1. DETECCIÓN DE LA CRP

Una vez definidos los valores de la CRP que pueden ser directamente extrapolados al riesgo de padecer una CVD, es importante definir una metodología para su detección que nos permita obtener unos valores fiables, es decir, la detección tiene que ser específica y reproducible. En este sentido, muchos análisis clínicos tradicionales, y en concreto aquellos para la CRP, se basan en el inmunoensayo, es decir, la asociación selectiva de la proteína con un ligando específico, un anticuerpo (Wu, 2007).

En este campo, es posible encontrar técnicas como los radioinmunoensayos, inmunodifusión radial (y su versión cuantitativa), aglutinación lipídica, turbidimetría asociada a la partícula, fluorescencia polarimétrica y nefelometría. Ésta última junto con la aglutinación en látex va ganando terreno en los laboratorios clínicos aunque presentan ciertas desventajas como el bajo límite de detección de la primera (10-20 mg/L), que no se ajusta a la normal distribución de los analitos en sangre, o la propiedad semicuantitativa de la segunda, que disminuye sus aplicaciones (Algarra *et al.*, 2012).

Es por ello que para la detección de la CRP, el método más extendido es la técnica ELISA o *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* debido a su gran sensibilidad y a que permite la cuantificación de la CRP en sangre. Sin embargo, el tiempo total del ensayo tiene como orden de magnitud horas (4 horas, en muchos casos), lo que dificulta el diagnóstico rápido y continuo que es requerido en este tipo de enfermedades (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Por ello, sigue existiendo un interés en el desarrollo de sistemas de análisis de CRP que mejoren las prestaciones de los actuales, siendo la sensibilidad, sencillez en el manejo y selectividad las características que se pretenden obtener de las nuevas tecnologías; pero sobretodo, se busca un dispositivo que confraternice con las nuevas tendencias en el ámbito clínico como son la medicina personalizada y el diagnóstico precoz.

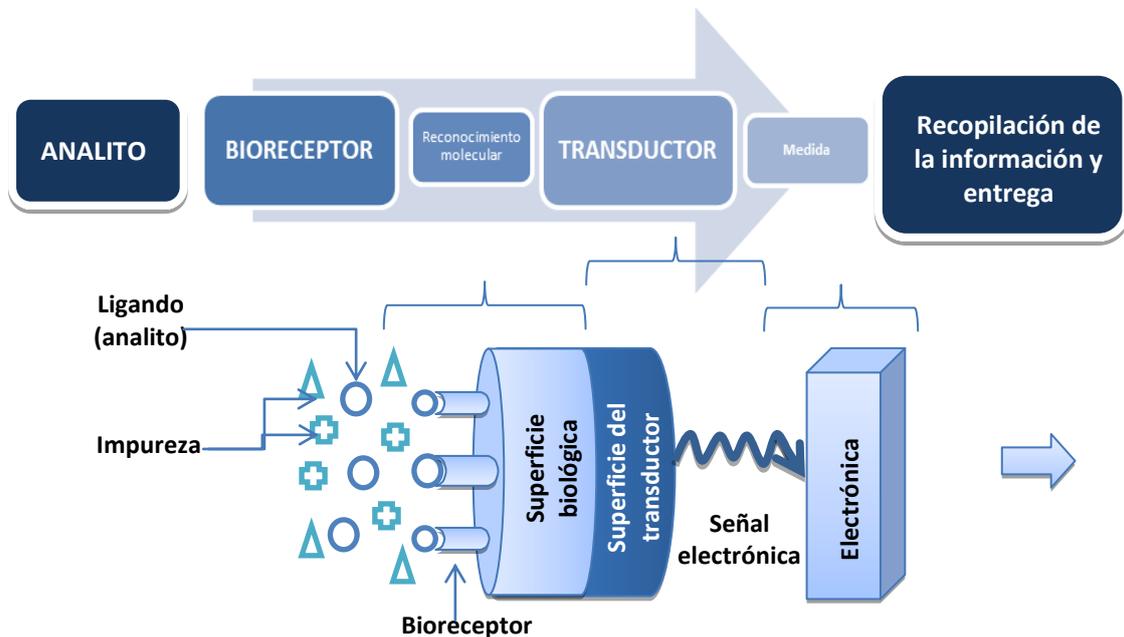
Adicional a esto, se busca establecer las bases para el desarrollo de sistemas *Point Of Care* (POC) que permitan a pacientes crónicos realizarse un análisis rutinario para controlar sus constantes. Por lo tanto, otras características como facilidad de manejo, portabilidad, tamaño reducido de los sistemas de detección y como consecuencia, reducción en la cantidad de muestra y reactivos requeridos (microlitros), deben ser tenidos en cuenta durante la puesta a punto de nuevos sistemas de detección.

Finalmente, los tiempos de análisis y el multiplexado son fundamentales en este campo. Así pues, se busca disminuir los tiempos de detección actuales a minutos y establecer un sistema de diagnóstico robusto de CVDs que combine varios biomarcadores (entre ellos la CRP) en un solo ensayo.

## 1.2. EL INMUNOENSAYO Y SU APLICACIÓN EN BIOSENSADO.

Según la IUPAC, un biosensor es un dispositivo integrado que permite la detección analítica, cuantitativa o semicuantitativa de analitos, combinando un componente biológico (ácido nucleico, anticuerpo, enzima, tejido, etc.) con un componente detector físico-químico (elemento de transducción). Dicho elemento de transducción permite obtener información específica a partir de la señal generada por la interacción del componente biológico o elemento de reconocimiento y el analito (Theâvenot *et al.*, 1999). En la figura 2 se representan

las partes fundamentales de un biosensor basado en el ejemplo por excelencia: el glucómetro o sensor de glucosa.



**Figura 2 Esquema general de un biosensor.** El comportamiento general de un biosensor viene dado por la interacción de un analito, que está presente en una muestra heterogénea, con un bioreceptor que constituye la superficie biológica (Vo-Dinh *et al*, 2000). Acoplada a ésta capa, se encuentra el componente transductor que transforma el resultado de la interacción en una señal detectable por un detector para finalmente, obtener una información fiable y útil (MEDICAL ELECTRONICS LABORATORY, 2013).

Así mismo, los biosensores vienen definidos por sus características de calibrado (sensibilidad, rango lineal y operativo de concentraciones, detección y determinación de los límites cuantitativos), selectividad, estado estacionario y respuestas transitorias en el tiempo, muestreo a gran escala, reproducibilidad, estabilidad y vida media (Theâvenot *et al.*, 1999).

El trabajo en este campo puede datarse a partir de 1962, cuando L.C. Clark y su grupo de investigación diseñaron el primer biosensor (más adelante definido como biosensor biocatalítico) que permitía determinar la concentración de glucosa en sangre a partir de la disminución de la concentración de oxígeno, medida a su vez utilizando un electrodo de oxígeno que contenía la enzima glucosa-oxidasa (Theâvenot *et al.*, 1999). Desde entonces, muchos han sido los sistemas descritos, lo cual ha llevado a establecer una clasificación atendiendo al tipo de analito o reacción que monitorean (directos o indirectos), al sistema de transducción (amperometría, potenciometría, etc.), modo de detección (con o sin marcaje) o, lo que aquí nos atañe, tipos de bioreceptor (anticuerpos, oligonucleótidos, tejidos, etc.) (Vo-Dinh y Cullum, 2000).

Así pues, ésta nueva tecnología, que pretende imitar la eficiente capacidad de los organismos vivos para reconocer sustancias ajenas a estos combinando la biotecnología y la microelectrónica, se ha convertido en un prometedor campo para distintos sectores debido a sus innumerables ventajas. Concretamente, el sector médico se ha visto gratamente beneficiado de los biosensores, permitiendo así el monitoreo de constantes en pacientes por ellos mismos o la detección de enfermedades genéticas, entre otras aplicaciones (Vo-Dhin y Cullum, 2000). Todo esto gracias a que las mediciones son rápidas (minutos) y a que los

volúmenes de reactivos necesarios para el calibrado son del orden de microlitros. Además, en muchos casos es posible eliminar la necesidad de marcaje radioactivo (Saldana, 2003).

Pero sin duda, las mayores características de los biosensores son la gran sensibilidad (del rango de  $10^{-18}$ - $10^{-9}$  M) y especificidad que viene determinada por el reconocimiento específico de la estructura del analito y que permiten identificar la molécula problema en una matriz heterogénea a la vez que reduce el pre-tratamiento de la muestra. De la misma manera, actualmente es probable encontrar dispositivos que analizan más de un analito que pueden estar o no relacionados, pero que añaden más veracidad a los resultados (Saldana, 2003; Csöregi *et al.*, 2001).

Adicionalmente, muchos dispositivos han logrado conseguir un manejo sencillo y automatizado que no sólo evita la necesidad de personal cualificado para uso, sino que junto con su tamaño, también posibilita su portabilidad (Saldana, 2003).

Sin embargo, pese a todos los hitos ya alcanzados, siguen existiendo factores a mejorar y que requieren una atención más detallada. Entre ellos cabe destacar (1) la contaminación, es crucial asegurar que tanto los reactivos como las biomoléculas empleadas no se degradarán o perderán las propiedades a lo largo del tiempo; (2) la inmovilización de las biomoléculas que puede modificar su comportamiento puesto que muchas de ellas actúan generalmente en disolución pero que es fundamental para la efectiva transducción de la señal; (3) los procesos de esterilización requeridos en muchos casos pero que pueden desnaturalizar los bioreceptores; (4) uniformidad de la preparación de biomoléculas que no siempre puede ser garantizada; y finalmente, (5) se pretende conseguir una gran selectividad y rango de detección. Por otro lado, aunque no menos importante, (6) son los costos en producción que en muchos casos siguen siendo altos (Mohanty, 2006).

### 1.2.1. INMUNOSENSOR: DEFICINIÓN Y CLASIFICACIONES.

Una de las técnicas más usadas en el diseño de biosensores por afinidad es el inmunoensayo. En este caso se aprovecha la interacción específica entre un anticuerpo (Ab) y un antígeno (Ag) o un hapteno (en el caso de pequeñas moléculas, <5000Da), gracias a la gran afinidad ( $K_a=10^{12}$ - $10^{14}$ ) y a la naturaleza no covalente de la interacción (Borisov y Wolfbeis, 2008).

Aunque normalmente se emplea la palabra “inmunoensayo”, para la técnica basada en dicha interacción inmunológica, cabe destacar que debe ser sólo usada para ensayos realizados en disolución. Sin embargo, si el ensayo ocurre en una superficie sólida, se debe hablar de un inmunosensor. En cualquier caso, la aplicación más común de ambos es la determinación de concentraciones del analito que actúa como antígeno (Borisov y Wolfbeis, 2008). Así mismo, a diferencia de otras pruebas no hay reacciones químicas entre el reactivo y la muestra del paciente y su punto fuerte es pues, la gran sensibilidad y especificidad, permitiendo cuantificar analitos en suspensión con concentraciones del orden ng/mL o pg/mL (Andrade, 2006). En lo que concierne a este trabajo, se profundizará en los inmunosensores o inmunoensayos de fase-sólida aunque para ello es preciso comprender los mecanismos básicos que comparten ambos tipos de ensayos.

En líneas generales, o bien el Ab o bien el Ag se inmoviliza en una superficie inerte que sirve como soporte y que puede servir como elemento transductor (Borisov y Wolfbeis, 2008).

En cuanto a los tipos de inmunoensayos, se clasifican dependiendo del parámetro que varíe. En el caso del marcador o *reporter* que se usa para determinar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno, existen dos estrategias: si está ligado a un anticuerpo primario, es decir, al que reconoce directamente al antígeno, se denomina inmunoensayo directo; por el contrario, si la fluorescencia está en un anticuerpo secundario o aquel que reconoce un anticuerpo primario, hablamos de un inmunoensayo indirecto ya que la medida del analito no se detecta directamente. En el primer caso y a diferencia del ensayo indirecto, la posible reducción de la afinidad del anticuerpo hacia el Ag y la poca amplificación de la señal es compensada por la rapidez del inmunoensayo y la reducción de las uniones inespecíficas. En cuanto al indirecto, el uso de anticuerpos primarios y secundarios supone pasos extras de incubación, que se traducen finalmente, en mayor tiempo de análisis (INNOVA BIOSCIENCE, 2014).

Por otro lado, es posible clasificar los inmunoensayos dependiendo de la técnica que se use para generar la señal. En la tabla 1 se recoge la clasificación actual. En cualquier caso, es muy importante realizar curvas de calibrado para establecer una correcta relación entre la señal detectada y la concentración de analito presente en la muestra. Normalmente, se representa en un gráfico la señal detectada en función de la concentración del analito, para ello se utilizan una serie de muestras dopadas con concentraciones conocidas del mismo (Andrade, 2006).

Tabla 1 Tipo de inmunoensayo dependiendo del marcador usado (Andrade, 2006)

MARCADOR	INMUNOENSAYO
Isótopo radioactivo	Radioinmunoensayo/IRMA
Enzima	Enzimoinmunoanálisis/ ELISA
Partícula fluorescente (fluoróforo)	Fluoruroinmunoanálisis
Quimioluminiscencia	Ensayo inmunoquimioluminiscente

Según el tipo de interacción, podemos destacar dos inmunoensayos: competitivo y tipo sándwich o no competitivo (Cox *et al.*, 2012).

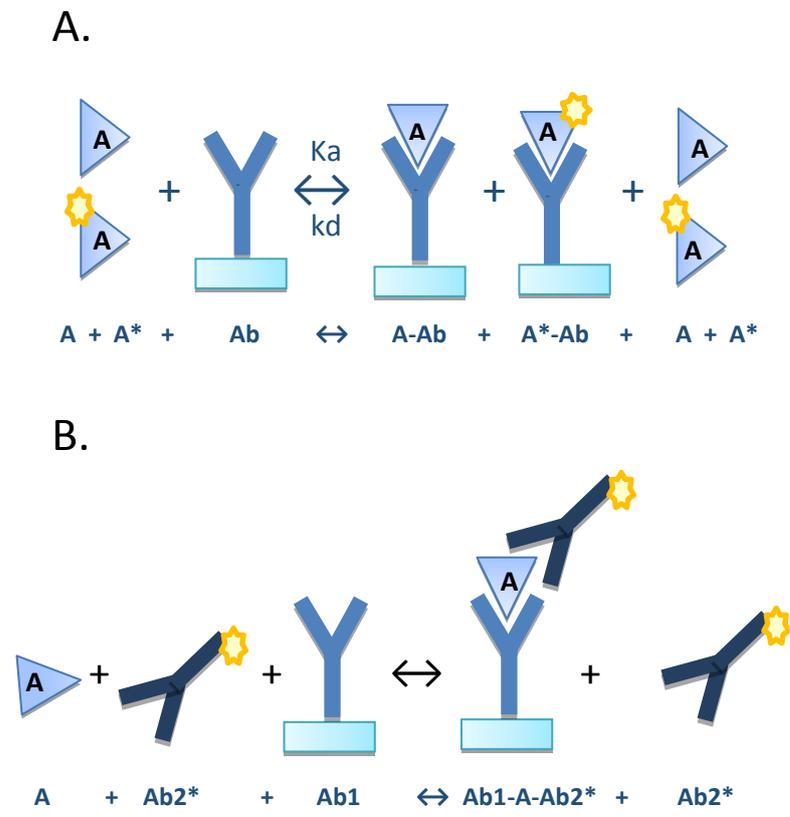
En el caso del ensayo competitivo (Figura 3A), se dispone de la molécula que se pretende detectar en la muestra, purificada de forma que pueda ser marcada (Vo-Dhin y Cullum, 2000). El anticuerpo que reconoce tanto el antígeno marcado como aquel sin marcar, se encuentra inmovilizado en una superficie previamente caracterizada. Posteriormente, se incuba el Ab al tiempo tanto con el antígeno marcado (A\*) como con el analito (A) hecho que hará que ambas moléculas compitan por la unión con el mismo. A una concentración determinada de A\*, la señal detectada variará dependiendo de la concentración de A en la muestra (Andrade, 2006). Así pues, para concentraciones altas de A la señal será muy reducida y para concentraciones bajas, la señal detectada será muy alta puesto que los sitios disponibles de unión al Ab serán ocupados en su mayoría por A\*. Por lo tanto, la relación concentración de A-señal detectada es inversamente proporcional siempre y cuando los lavados previos a la detección se hayan realizado debidamente (Vo-Dhin y Cullum, 2000).

Por otro lado, el formato sándwich (Figura 3B) se basa en una doble interacción del antígeno con dos Abs. Uno de los Ab (Ab2\*) se añade en exceso al medio de reacción estableciendo nuevamente una reacción en equilibrio que se muestra en la figura 3. El otro Ab (Ab1) se encuentra inmovilizado en la superficie donde la señal será detectada (Cox *et al.*, 2012). Su nombre se debe precisamente a que el antígeno queda en medio de los dos Ab. El primero lo fija a la superficie, el segundo contiene el marcador que permite relacionar la señal con la concentración del analito. En algunos casos es posible añadir un tercer anticuerpo que

reconozca Ab2\*, por lo cual la molécula marcador se encuentra en Ab3 y no en Ab2\* (Cox *et al.*, 2012).

En resumen, la técnica sándwich presenta una mayor sensibilidad en comparación con el ensayo competitivo debido a que la señal se amplifica a raíz del uso de segundos y terceros Abs. En ensayos tan comunes como los ELISA es muy habitual.

Finalmente, es posible encontrar una tercera variante que aplica el mismo principio de competición con la diferencia de que es el Ab el marcado (Ab\*) y el antígeno purificado se encuentra inmovilizado. La competición tiene lugar cuando Ab\*, analito y antígeno inmovilizado se incuban al tiempo. Si hay una concentración alta de analito en la muestra, el anticuerpo no queda retenido en la superficie y la señal es reducida (Andrade, 2006).



**Figura 3 Tipos de inmunoensayos.** Según el tipo de interacción, existen dos tipos: A. Inmunoensayo competitivo, donde el anticuerpo (ab) se encuentra inmovilizado en una superficie solida y tanto el analito (A) como su homólogo marcado compiten por el mismo. La señal es inversamente proporcional a la concentración de la molécula a analizar (Andrade, 2006). B. Inmunoensayo sándwich, donde intervienen dos anticuerpos, uno inmovilizado (Ab1) que retiene la molécula y uno secundario que lleva asociado algún método de marcaje como fluoróforo (Ab2\*). La señal percibida es directamente proporcional a la concentración del analito (Cox *et al.*, 2012).

### 1.3. BIOSENSADO EN FORMATO MICROARRAY

Una vez comprendido el concepto de biosensado mediante inmunoensayo y teniendo en cuenta los requerimientos deseables en un sistema de análisis para CRP, y por extensión a biomarcadores CVD, el formato *microarray* se presenta como una posibilidad muy interesante para la implementación de este tipo de sistemas. Aunque hay controversia en si los

*microarrays* convencionales pueden considerarse un biosensor o no, si se integran a un sistema de detección adecuado se ajustarían a la definición de biosensor dada por la IUPAC.

Literalmente, *microarrays* significa pequeñas (micro) matrices y describen el depósito ordenado y bidimensional de, generalmente, biomoléculas sobre un substrato sólido, en posiciones determinadas (López *et al.*, 2002). Comúnmente, el término se asocia a matrices de ADN, ya que es a finales de los 90 cuando tiene lugar la aparición de ésta tecnología diseñada para identificar la presencia de ciertos genes o mRNAs en células (Hoopes, 2008). A partir de entonces, el desarrollo en este campo ha permitido su extensión tanto al estudio de metabolitos como de proteínas gracias a su capacidad de analizar a gran escala muestras complejas (López *et al.*, 2005).

En líneas generales, los ácidos nucleicos, proteínas o metabolitos son inmovilizados en una superficie sólida (siendo el vidrio y el sílice los materiales más usados para su diseño), en una posición concreta, que permite analizar grandes cantidades de material biológico haciendo uso de las técnicas de escaneado de alto rendimiento (*high throughput screening*). De manera análoga a los inmunoensayos, ésta técnica requiere de marcadores que permitan asociar la señal detectada no sólo con la presencia o no de la molécula a analizar, sino también con la concentración de la misma (Hall *et al.*, 2007). Por tanto, este biosensado confía en la química de superficies, métodos de detección y agentes de captura (Tomizaki, 2005).

Por ello, los *microarrays* se postulan como una de las herramientas más potentes para hacer frente a los nuevos desafíos en diagnóstico clínico, caracterizados por la obtención masiva de información analítica, en un tiempo reducido y al menor coste posible (Hall *et al.*, 2007).

### 1.3.1. MICROARRAYS DE PROTEÍNAS.

Los primeros *arrays* de proteínas surgieron ante la necesidad de estudiar los mecanismos post-traduccionales que conllevan a diferencias entre células con niveles similares de transcripción de ciertos genes. No obstante, a diferencia de los *arrays* de ácidos nucleicos, los *microarrays* de proteínas se caracterizan por su heterogeneidad, existiendo muchos tipos que intentan dar soluciones al complejo mundo proteico (Hall *et al.*, 2007).

En cuanto al diseño, son varios los factores a tener en cuenta como la naturaleza del soporte (superficie sobre la cual se inmovilizarán las proteínas), proteínas a inmovilizar, método de inmovilización, formato del *microarray*, agente de detección y método de detección (López *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la producción de *arrays* para proteínas se enfrenta a grandes retos dentro de los cuales cabe destacar la adquisición y unión estable de éstas a superficies donde puedan interactuar con otras proteínas o ligandos y la detección de dicha interacción. Sin embargo, es un campo prometedor dado que permite la criba de moléculas a gran escala y la reducción de los reactivos necesarios para el análisis de las mismas que finalmente se traduce en una reducción de costos (Angenendt *et al.*, 2003).

Finalmente, cabe destacar que las micromatrices permiten la realización de distintos tipos de ensayos siendo los inmunoensayos, los más comúnmente usados (anticuerpos como moléculas de captura) (López *et al.*, 2005).

### 1.3.2. TIPOS DE SOPORTE

La elección de la superficie del *array* es indispensable pues condiciona tanto el formato final de la matriz como el tipo de detección que debe emplearse. Así mismo, es de suma importancia que se tenga en cuenta la naturaleza de la proteína que va a inmovilizarse puesto que la superficie debe conservar la funcionalidad de la misma y/o su estructura dependiendo del análisis que se quiera llevar a cabo (Hérraez, 2010).

Por lo tanto, las características que debe tener la superficie ideal son: estabilidad química, buena morfología de los puntos o *spots*, mínimas uniones inespecíficas, baja señal de fondo, alto ratio superficie/volumen, baja fluorescencia y compatibilidad con los sistemas de detección (López *et al.*, 2005).

Pese a los intentos por encontrar una matriz idónea para cualquier tipo de proteína, éste sigue siendo un problema sin resolver. No obstante, hoy en día existen una variedad de superficies bien caracterizadas que pretenden cubrir un gran rango de proteínas con propiedades similares. Las tradicionales superficies porosas como las membranas de nylon, idóneas debido a sus características rugosas que aumentan la superficie y por ende, la capacidad de unión, están siendo actualmente reemplazadas por superficies químicamente producidas cuya base es el vidrio dado que no se requiere bloqueo de la misma y reducen la inmovilización inespecífica (Hall *et al.*, 2007).

En la figura 4 se muestran todas las tecnologías, y sus posibilidades, implicadas en el proceso global de diseño y fabricación de un *microarray*.

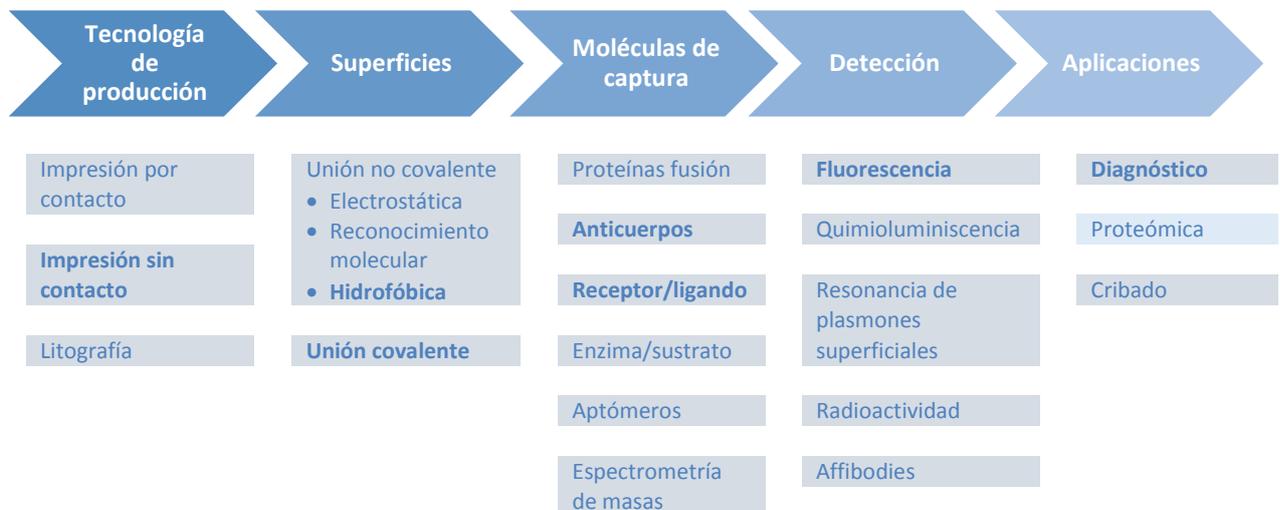


Figura 4 Tecnologías implicadas en la producción de arrays. (Joost y Bachmann , 2003)

## 1.4. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN EN VIDRIO

Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo de *microarrays* requiere de la inmovilización de una partícula activa en una superficie, por ejemplo, del anticuerpo para favorecer su interacción con el analito. No obstante, este proceso es complejo y debe ser optimizado con el fin de obtener la orientación adecuada para que los sitios de reconocimiento permanezcan disponibles y para mantener intactas las propiedades de la molécula bioreceptora (López *et al.*, 2005).

Aunque actualmente se trabaja con distintos tipos de superficie tales como el polipropileno, silicio, geles o incluso nanopartículas y membranas (Hérraez, 2010), el vidrio es uno de los materiales más extendido en este campo ya que tiene propiedades físicas convenientes y es fácil de modificar químicamente para la unión covalente de las biomoléculas. Además es económico y permite la producción de chips a gran escala. En cuanto a la detección, este soporte genera poca auto-fluorescencia lo que lo hace idóneo para ensayos con fluoróforos. Finalmente, es fácil de almacenar y producir, además de presentar una gran reproducibilidad (Angenendt *et al.*, 2005).

Hoy en día existen distintas técnicas de inmovilización dependiendo de la biomolécula problema y de la superficie de apoyo. En una primera clasificación general encontramos inmovilización física o pasiva, inmovilización química e inmovilización por afinidad. La primera se trata de inmovilizar los receptores sin que exista una reacción química (mediante adsorción o entrapamiento, por ejemplo). En el segundo caso, existe una reacción química entre algún grupo del receptor y un grupo de la superficie de forma que queda anclada covalentemente. Finalmente, la inmovilización por afinidad depende de la interacción biológica entre una molécula anclada a la superficie y un ligando (Hérraez, 2010). El ejemplo más ampliamente empleado es el tándem estreptavidin-biotina (THERMO SCIENTIFIC, 2014)

### 1.4.1 INMOVILIZACIÓN QUÍMICA POR ENLACE COVALENTE

Inmovilizar biomoléculas mediante el uso del enlace covalente supone mayores ventajas ya que aporta mayor estabilidad a la matriz, aumenta la densidad de moléculas sobre el soporte, admite proteínas más diversas y la respuesta es más reproducible (Du, 2005).

Generalmente, para la inmovilización de proteínas, las superficies de vidrio más comunes son aquellas derivatizadas con monocapas de grupos orgánicos activos (aldehído, amino o epoxi) (Hall *et al.*, 2007). Mayoritariamente dicha funcionalización se lleva a cabo a través de enlaces covalentes entre distintos organosilanos y los grupos silanol de la superficie (Wang *et al.*, 2010). Los organosilanos más empleados son tricloro-, trimetoxi- o trietoxisilanos, que forman monocapas sobre los sustratos sólidos. El mecanismo de formación ha sido ampliamente estudiado, aunque existe cierta controversia en él. La reacción se basa en la condensación entre los grupos siloxanos del organosilano y los grupos hidroxilo presentes en la superficie de vidrio. De este modo, la densidad de grupos OH en la superficie del vidrio es esencial para la formación de una capa orgánica de calidad adecuada. Por ello, es muy común aplicar un proceso de oxidación previo a la funcionalización con organosilano (Rong *et al.*, 2008).

Así, los grupos hidroxilo de la sílice del vidrio permiten que éste reaccione con una molécula de silano bifuncional, es decir, que presenta dos grupos reactivos: uno que se utiliza para la unión al soporte (las terminaciones trietoxi, trimetoxi y tricloro) y el otro para inmovilizar la proteína (los más comunes son amino, tiol epoxi, aldehído y ácido carboxílico que reaccionan

con los grupos amino de la proteína o con algún grupo más específico bien directamente o usando un agente de entrecruzamiento).

En otros casos, se pueden encontrar superficies recubiertas de agarosa solidificada sobre el soporte que posteriormente es activada con peryodato para formar grupos aldehídos que reaccionan con grupos amino de las biomoléculas (Hérraez, 2010). Si el gel es de poliacrilamida, la activación puede llevarse a cabo con glutaraldehído o hidrazida (Hérraez, 2010).

El uso de dendrímeros cada vez se extiende más ya que al ser polímeros ramificados repetidamente permiten aumentar la densidad de grupos reactivos sobre la matriz aumentando la capacidad de carga del bioreceptor sobre el soporte (Angenendt *et al.*, 2003).

Finalmente, es posible encontrar soportes de vidrio recubiertos de oro que permiten por un lado la detección con métodos como *surface plasmon resonance* (SPR) y por otro el anclaje de grupos funcionales como los tioles (Hérraez, 2010).

Pese a que estos soportes cuentan con una gran aceptación, cabe mencionar que también tienen ciertas limitaciones como la orientación variable con la que las biomoléculas quedan ancladas a la superficie, traduciéndose claramente en una posible disminución de la interacción posterior entre bioreceptor-analito.

#### 1.4.2. INMOVILIZACIÓN FÍSICA O PASIVA

Es el método más simple pero el que genera peores resultados ya que es poco selectivo. Se basa en los fenómenos físicos de adsorción para fijar las moléculas a la superficie.

Aunque es más común en soportes tipo membranas de nylon o nitrocelulosa, también puede ser extrapolado a superficies como el vidrio y plástico. En éste último caso, las superficies deben ser modificadas con distintas moléculas para hacerlas más hidrofóbicas (Angenendt *et al.*, 2003). No obstante, esto genera gran cantidad de inmovilización inespecífica difícil de controlar y además puede desnaturar al bioreceptor afectando a su capacidad de reconocimiento (Hérraez, 2010).

### 1.5. ANTECEDENTES EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE CRP MEDIANTE INMUNOENSAYO EN FORMATO MICROARRAY

Como se ha comentado a lo largo de la introducción, en la actualidad, la medida de la CRP y su cuantificación en suero humano con fines diagnósticos se realiza por medio del inmunoensayo. Quizás, es el conocimiento de ésta técnica lo que ha llevado a considerarla como una de las mayores candidatas para su miniaturización y reducción a un formato *microarray*.

Tal es su popularidad que los estudios más recientes (a partir de 2011) consultados, inmovilizan anti-CRP en soportes sólidos para su detección. A continuación se presentan algunos resultados de estudios hechos en este campo y que demuestran el estado de ésta técnica.

En un esfuerzo por identificar nuevos posibles materiales como soportes, el equipo de Baldini (2009) planteó la posibilidad de utilizar un tipo de plástico (PMMA) para la detección de

CRP utilizando un inmunoensayo tipo sándwich. Los parámetros para definir la sensibilidad del *array* son el LOD (Límite de detección) y el LOQ (Límite de cuantificación), principalmente. En este estudio, debido a las propiedades del soporte, la autofluorescencia del mismo es crucial. Su alternativa es irradiar a una longitud de onda en la que dicho efecto disminuya. De la misma forma, el estudio deja patente la importancia de los anticuerpos como receptores y moléculas *reporters*. En este caso, el LOD reportado es de 0,004 ppm y el LOQ, 0,013 ppm. El rango de cuantificación es de 0,1-50 ppm lo que supone que para fines clínicos, las muestras deben ser diluidas.

Por otro lado, el interés por multi-análisis, donde se analiza más de un marcador, crece cada día. Así lo demuestran los estudios de Buchegger *et al.* (2012), Melin *et al.* (2010) o Krämer *et al.*(2011); siendo el primero el más ambicioso pues incluye 5 marcadores para el diagnóstico de sepsis neonatal. No obstante, en todos ellos queda patente la dificultad de miniaturizar inmunoensayos manteniendo la sensibilidad y especificidad.

En resumen, aunque el campo del biosensado, concretamente en formato *microarray* está siendo ampliamente estudiado, no hemos encontrado ninguna publicación que estudie en conjunto los distintos parámetros que comprometen la calidad de los sistemas de diagnóstico miniaturizados y que a su vez compare analíticamente distintas alternativas de inmunoensayo o receptores para la detección de CRP. En el presente trabajo, se presentan los resultados de la puesta a punto de un *microarray* para detectar CRP comparando distintas posibilidades de inmovilización, tipos de bioreceptor y formato de inmunoensayo.

## II. OBJETIVOS

---

Como objetivo general de este trabajo se pretende poner a punto un sistema de detección para la proteína C-reactiva (CRP) mediante reconocimiento molecular en formato *microarray* y estudiar sus prestaciones. Con este fin, se abordaron los siguientes objetivos particulares:

1. Comparar las prestaciones de la inmovilización por adsorción y por enlace covalente de una molécula receptora en una superficie de vidrio funcionalizada.
2. Analizar la influencia del tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) en un inmunoensayo competitivo directo.
3. Plantear alternativas a la técnica de bloqueo de superficie que favorezcan la reducción de ruido de fondo en micromatrices sobre superficies funcionalizadas de vidrio.
4. Plantear alternativas al uso del inmunoensayo para la detección de la CRP en formato *microarray*.

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 3.1 REACTIVOS

Para la activación y funcionalización de la superficie se utilizaron tres tipos distintos de organosilanos a saber: 1H, 1H, 2H, 2H Perfluorodecyl-trietoxisilano 97% (PFTS), 3-Mercaptopropyl trimetoxisilano 85% (MPTS), aliltrimetoxisilano (Vinil), todos provenientes de Acros Organics (Barcelona, España). Como soluciones de lavado se utilizaron metanol y hexano de Scharlau (Barcelona, España).

En cuanto a las biomoléculas, todas se obtuvieron en la compañía Sigma Aldrich (Madrid, España): CRP de plasma humano en solución 0,02 M Tris, 0,28 M cloruro de sodio, 0,005 M cloruro de calcio, pH 7,8 – 8,2, con 0,1% de azida de sodio; fosforilcolina (*Phosphorylcholine chloride calcium salt tetrahydrate*) al 98%; anticuerpos monoclonales (*Anti-CRP antibody*), inmunoglobulinas purificadas y producidas en ratón. Por su parte, los anticuerpos policlonales de cabra fueron amablemente cedidos por el grupo *Nanobiotechnology for Diagnostics*, Instituto de Química Avanzada de Cataluña - Nb4D-IQAC, dirigido por la Dra. Pilar Marco.

Los tampones utilizados para los distintos experimentos fueron: PBS (tampón fosfato salino:),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, NaCl 137mM y KCl 2,7 mM, pH 7,5); PBS-T (PBS con 0,05% de Tween 20 como surfactante no iónico para el lavado de los chips después de los inmunoensayos).

Como agentes de bloqueo se emplearon gelatina, albúmina de suero bovina (BSA) y caseína todas ellas de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Las muestras dopadas fueron obtenidas a partir de suero de sangre humana de un voluntario varón, sano, con niveles basales de CRP.

Los *microarrays* fueron fabricados sobre portamuestras de vidrio de 75 x 25 mm de DeltaLab (Barcelona, España) que fueron cortados por clivación en fragmentos de aproximadamente 20 x 25 mm. Los cubreobjetos de vidrio empleados para extender las disoluciones fueron de dimensiones 22 x 22 y 24 x 40 mm suministrados por DeltaLab (Barcelona, España).

## 3.2 INSTRUMENTACIÓN

Las micromatrices fueron impresas usando un microimpresor robótico de no contacto con punta cerámica, *Biodot*, modelo AD1500 (Irvine, CA, EE. UU).

Para la caracterización de la superficie se utilizó un sistema OCA20 equipado con el software SCA20 suministrado por DataPhysics Instruments GmbH (Filderstadt, Alemania) con el que se midió el ángulo de contacto (WCA).

Como fuente de luz UV para la inmovilización covalente de proteínas se empleó una lámpara de Mercurio ( $6 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ , Jelight Irvine, CA, USA).

Para la detección de la fluorescencia en la inmovilización covalente de proteínas se empleó un sistema casero basado en una cámara CCD de alta sensibilidad Retiga EXi de Qimaging Inc, (Burnaby, Canadá, EE. UU) con LEDs Toshiba TLOH157P como fuente de excitación (Llorente *et al.*, 2004). Las medidas se realizaron por acumulación de luz emitida por las muestras durante 15 s utilizando una ganancia del dispositivo CCD igual a 5.

Para el análisis y posterior cuantificación de las imágenes de los *microarrays* obtenidos se utilizó el paquete informático GenePix Pro 4.0 suministrado por Molecular Devices, Inc. (Sunnyvale, CA, EE. UU). Las curvas de competición de los inmunoensayos se analizaron matemáticamente con el paquete informático Sigmaplot (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania).

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1. ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE

Como paso previo a la funcionalización, los chips de vidrio fueron siempre tratados con una solución acuosa de NaOH 5M, incubando el soporte en la disolución durante 10 minutos a partir de la ebullición de la misma. Transcurrido este tiempo, las superficies se lavaron con agua desionizada y posteriormente con metanol y se secaron con corriente de aire.

#### 3.3.2. FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE

##### 3.3.2.1. SUPERFICIES MIXTAS CONTENIENDO GRUPOS FLÚOR Y GRUPOS TIOL

Los soportes de vidrio previamente activados se funcionalizaron por inmersión, durante 15 minutos y en agitación, en una solución de metanol con una mezcla de PFTS y MPTS en una proporción 1:1 en volumen, siendo la concentración total de organosilano del 1%.

Posteriormente, los chips fueron curados en estufa a 180 °C durante una hora, pasada la cual, cada chip fue lavado con hexano y metanol y secado con aire.

##### 3.3.2.2. SUPERFICIES MODIFICADAS CON GRUPOS ALQUENO

La superficie de los soportes activados fue funcionalizada por inmersión en una disolución de vinil al 2% en metanol durante 15 min. Posteriormente, cada chip se lavó con isopropanol, agua desionizada y se secó en corriente de aire.

Los chips fueron tratados en estufa a una temperatura de 110 °C durante 60 min. A este proceso nos referimos como “curado de los chips”.

##### 3.3.2.3. SUPERFICIES MODIFICADAS CON GRUPOS TIOL

Los soportes de vidrio activado fueron funcionalizados por inmersión en una disolución de MPTS en metanol al 2% volumen, durante 2 horas a temperatura ambiente. Al igual que en las otras funcionalizaciones, los chips se lavaron con isopropanol y agua desionizada y fueron secados en corriente de aire.

Finalmente, se curaron durante 60 min a 110 °C.

### 3.3.3. INMOVILIZACIÓN PASIVA DE LAS MICROMATRICES DE CRP y Ab Y ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO

#### 3.3.3.1. PROTOCOLO DE MARCAJE DE CRP CON ALEXA-647

Para el marcaje de la proteína C-reactiva se preparó una disolución 1M de bicarbonato de sodio añadiendo (pH~8,3) 1mL de agua deionizada al vial de bicarbonato de sodio del Protein labeling kit.

Posteriormente, se añadió 0,5 mL del tampón bicarbonato a una disolución de CRP (2 mg/mL) en PBS e inmediatamente después se mezcló con el marcador Alexa Fluor 647 en el vial predispuesto para ello por el kit. Para asegurar una mezcla homogénea, el vial contaba con un imán que se usó para disolver completamente el marcador, agitando la disolución durante una hora.

Por otro lado, la columna de separación presente también en el kit de marcaje se preparó atendiendo a las indicaciones del fabricante, a saber:

La columna o soporte se dispuso de forma vertical, conteniendo en la parte superior un embudo. Sobre la columna se depositó la resina de purificación (agitándola antes si fuera necesario para garantizar su homogeneidad) permitiendo que el exceso de tampón contenido en la resina drenara. La columna se consideró lista para la separación cuando la resina alcanzó una altura que solo distaba 3 cm de la parte superior de la columna.

A continuación, se diluyó el tampón de elución a razón 1:10 en agua deionizada (volumen total utilizado 10 mL). Antes de permitir que la disolución con la proteína y el marcador fueran purificados en la columna, se probó con el tampón para asegurar que el flujo era continuo, es decir, que la columna estaba correctamente empacada.

Comprobado esto, la muestra se introdujo en la columna y a continuación se añadió 100  $\mu$ L del tampón de elución. Durante cerca de 30 min se añadió tampón de elución constantemente teniendo cuidado de no perturbar la resina.

Se observaron dos bandas coloreadas durante la separación, la primera o más rápida en atravesar la columna contenía la proteína marcada. La segunda correspondía al marcador que no fue incorporado a la proteína.

Una vez la primera banda fue completamente extraída de la columna, se dio por terminado el proceso de marcado y purificación y se procedió a la determinación de la concentración de la proteína en la disolución final mediante el uso del *Nanodrop*.

#### 3.3.3.2. PROTOCOLO DE MARCAJE DE AB CON ALEXA-647

Similar al apartado anterior, el mAb se marcó con el fluoróforo Alexa 647 haciendo uso del kit de marcaje proveído por la compañía Life technologies.

Para ello, se utilizó una disolución de mAb (2mg/mL) en PBS a la que se añadió 0,5 mL del tampón bicabornato.

Se incubó en agitación dicha disolución con el vial de marcador y se depositó sobre la columna de purificación dispuesta como se indica en el apartado anterior, haciendo uso del tampón de elución para favorecer el movimiento a través de la columna.

De la misma forma se observaron dos bandas correspondientes al marcador sin incorporar en el anticuerpo (la banda más lenta) y al anticuerpo marcado (la banda más rápida); ésta última fue recuperada y medida más adelante para determinar la concentración de anticuerpo marcado en la disolución final.

### **3.3.3.3. PROTOCOLO DE INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNA CRP POR ADSORCIÓN PASIVA**

Para la inmovilización de CRP marcada (CRP-Ax), se utilizaron chips previamente funcionalizados con grupos vinil. Sobre ellos se imprimieron 10 líneas, de 4 puntos cada una con el microimpresor, siendo el volumen dispensado de 0,05  $\mu$ L de reactivo por punto.

Cada línea fue impresa partiendo de una disolución distinta de CRP-Ax en PBS (0; 0,5; 1; 4; 7,5; 15; 60; 120; 240; 480  $\mu$ g/mL) con el fin de comprobar no sólo las condiciones más idóneas de inmovilización respecto al tiempo de incubación, sino también respecto a la concentración de CRP-Ax inmovilizada evitando la saturación de la señal.

En total se imprimieron 6 chips para probar 3 condiciones de incubación después de la impresión, a saber: 1h, 2h o toda la noche (overnight) de incubación, es decir, 2 réplicas por condiciones a estudiar. Las incubaciones se realizaron en cámara húmeda.

Después del tiempo de incubación, se detectó la fluorescencia. Luego, se lavaron los chips con PBS y agua desionizada y se secaron en corriente de aire seco.

Posteriormente, se midió de nuevo la fluorescencia con el fin de comprobar si los lavados posteriores a la incubación mejoraban la especificidad de la inmovilización.

Finalmente, se analizaron los resultados y se construyeron curvas de inmovilización para cada condición.

### **3.3.3.4. PROTOCOLO DE INMOVILIZACIÓN DE ANTICUERPOS POR ADSORCIÓN PASIVA**

Se imprimieron 20 chips, previamente funcionalizados con grupos vinil, con el microimpresor (0,05  $\mu$ L) de manera que cada uno contenía una matriz 9 x 4 (9 líneas, cada una con 4 puntos). Cada una de las líneas corresponde a una concentración distinta de mAb-Ax (0; 0,19; 2,75; 8,6; 17,2; 86; 172; 860; 1272,8  $\mu$ g/mL).

Una vez impresos los 20 chips, se dividieron en 2 grupos de 10 para probar dos condiciones: los primeros 10 se incubaron durante 1h en la oscuridad; los 10 restantes se incubaron durante toda la noche, también manteniendo la oscuridad.

Pasado el tiempo de incubación, se detectó la fluorescencia de todos los chips. Se lavaron con PBS y agua desionizada y se secaron en corriente de aire seco. Después, se midió la fluorescencia de nuevo.

Como último paso, se realizó una curva que relacionó la concentración de mAb-Ax inmovilizado y la señal detectada, de forma que las mejores condiciones tanto en concentración como de tiempo de incubación pudieran ser escogidas.

### **3.3.3.5. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO PARA LA INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN**

**Chips con grupos vinil:** Se imprimieron 6 chips funcionalizados previamente con grupos vinil mediante el microimpresor, utilizando para cada punto 0,05  $\mu\text{L}$  de una disolución de CRP en PBS. La matriz resultante se compuso de 4 puntos por línea, cada línea correspondiente a una disolución de CRP (0; 0,5; 1; 4; 7,5; 15; 60; 120; 240; 480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Los chips se incubaron durante 1h en oscuridad y posteriormente se lavaron con PBS y agua desionizada. Se secaron con corriente de aire seco.

Seguidamente, se incubaron con 3 concentraciones distintas de mAb-Ax (0,42; 4,2 y 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 10 min, transcurridos los cuales, se lavaron y secaron siguiendo el procedimiento habitual para finalmente medir la fluorescencia de los mismos.

Éste procedimiento se repitió inmovilizando en chips de vinil mAb (0; 0,19; 2,75; 8,6; 17,2; 86; 172; 860; 1272,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubándolo durante 10 min con 3 concentraciones distintas de CRP-Ax (0,24; 2,4 y 24 ppm) en PBS. Los lavados y las medidas se tomaron siguiendo el protocolo habitual.

### **3.3.4. INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LAS MICROMATRICES DE Ab Y ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO**

#### **3.3.4.1. PROTOCOLO DE INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE Ab**

Para la inmovilización covalente de anti-CRP se procedió a imprimir una micromatriz de 3x4 (3 líneas de 4 puntos cada una; siendo la primera línea de pAb 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la segunda pAb a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la tercera, al control interno de CRP-Ax) en chips previamente activados y funcionalizados con grupos tiol o mezclas PFMS: MPTS (1:1; 1:2; 2:1 volumen).

Una vez el pAb se depositó en la superficie, los chips fueron irradiados durante 1h a 365nm para favorecer la activación de los radicales tiol presentes en los residuos de la cisteínas del anticuerpo.

Para comprobar la efectiva inmovilización, se procedió a realizar ensayos de reconocimiento con la proteína C-reactiva marcada, que se explica en el siguiente apartado.

#### **3.3.4.2. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO PARA LA INMOVILIZACIÓN COVALENTE**

**Chips de PFMS, MPTS y mezclas:** Chips funcionalizados con grupos flúor y tiol se imprimieron con matrices de 3x4 (3 líneas 4 puntos), correspondiendo la primera línea a una disolución de pAb 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la segunda a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la tercera, al control interno de CRP-Ax.

Los chips se irradiaron durante 1h a 365 nm y se lavaron posteriormente con PBS y agua desionizada. Se secaron y se incubaron, durante 10 min, con 40  $\mu\text{L}$  de una disolución de CRP-Ax (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS. A continuación, se lavaron y secaron como es habitual para medir, en última instancia, la fluorescencia de cada chip y comparar resultados.

### 3.3.4.3. PROTOCOLO PARA EL INMUNOENSAYO DIRECTO COMPETITIVO

Sobre las superficies funcionalizadas con PFTS-PMTS 1:1, se procedió a imprimir mediante el microimpresor un volumen de 0,05  $\mu\text{L}$  de reactivo por punto con formato de micromatriz de 3 líneas con 4 puntos en cada una, donde las dos primeras (8 puntos en total) pertenecen a una disolución de pAb en PBS (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La tercera línea (4 puntos) corresponde al control de inmovilización CRP-Ax en PBS (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Finalizada la impresión, los soportes se irradiaron durante una hora a temperatura ambiente.

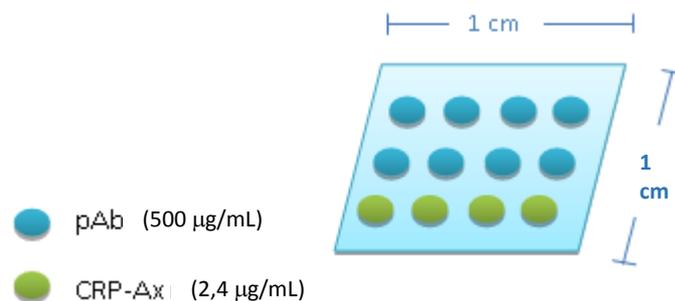
Pasada una hora, los chips se lavaron con PBS y se secaron en corriente de aire. Las muestras de suero sanguíneo fueron dopadas con CRP a 4 niveles (0,3; 1; 1,75 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los sueros dopados se diluyeron 1:10 en PBS-T y se añadió CRP-Ax a partir de una disolución madre de 480  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para alcanzar una concentración final de CRP marcada en la muestra de 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Seguidamente, cada chip se incubó con 20  $\mu\text{L}$  de la muestra así preparada durante 10 min.

A continuación, los chips se lavaron con PBS y agua desionizada y fueron secados nuevamente en corriente de aire.

Finalmente, se detectó y midió la fluorescencia para determinar la concentración de CRP en la muestra de suero utilizando la correspondiente curva de calibrado.

**Curva de calibrado:** Para realizar la curva de calibrado se procedió de la misma manera descrita arriba, con la salvedad de que se imprimieron 30 chips, cada uno con 2 líneas de 4 puntos de pAb (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tal y como se muestra en la figura 5. La tercera línea pertenece al control interno de CRP-Ax inmovilizada proveniente de una disolución de CRP-Ax 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS.

A partir de la impresión se procede según el protocolo anteriormente mencionado con la diferencia de que los treinta chips se agruparon en grupos de 3, incubando cada uno con una concentración distinta de suero humano dopado y CRP-Ax 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las concentraciones de CRP en el suero humano dopado fueron: 0; 0,025; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,275; 0,3; 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 5 Esquema de la micromatriz empleada para la realización de la recta de calibrado.** Se imprimieron 2 líneas de 4 puntos de pAb (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) La tercera línea pertenece al control interno de CRP-Ax inmovilizada proveniente de una disolución de CRP-Ax en 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PBS.

# IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

## 4.1. ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN

### 4.1.1. MARCAJE DE ANTICUERPO Y PROTEÍNA CRP

En el diseño y posterior puesta a punto de un biosensor, concretamente de una micromatriz, se hace necesario establecer un sistema de detección de la interacción entre el analito y el chip. Para ello, tanto el anticuerpo anti-CRP (Ab) como la CRP fueron marcados con el fluoróforo AlexaFluor-647 siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En líneas generales, las dos proteínas se incubaron con el marcador en tampón carbonato. Posteriormente, tanto mAb como CRP fueron purificados por columna de exclusión molecular.

Tras el marcaje, se determinaron las concentraciones de ambas proteínas en las disoluciones finales con un espectrofotómetro para cuantificación con micro-volúmenes de muestra, Nanodrop-ND1000. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 2 Concentración de CRP tras el marcaje con Alexa Fluor 647 determinada espectrofotométricamente

	[CRP] mg/mL	Absorbancia	[Alexa Fluor 647] $\mu$ M	Absorbancia
	0,46	1,823	54,2	12,943
	0,48	1,910	56,6	13,532
	0,48	1,904	55,4	13,249
<b>Media <math>\pm</math> ds</b>	<b>0,47 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>1,88 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>55 <math>\pm</math> 1</b>	<b>13,2 <math>\pm</math> 0,3</b>

Tabla 3 Concentración de mAb tras el marcaje con Alexa Fluor 647 determinada espectrofotométricamente

	[mAb] mg/mL	Absorbancia	[Alexa Fluor 647] $\mu$ M	Absorbancia
	1,72	2,352	38	9,075
	1,68	2,438	39,2	9,386
	2,25	3,415	52,5	12,54
<b>Media <math>\pm</math> ds</b>	<b>1,9 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>2,7 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>43 <math>\pm</math> 2</b>	<b>10 <math>\pm</math> 2</b>

Una vez obtenidas las concentraciones tanto de CRP y mAb y conocidos sus pesos moleculares (24 kDa y 145 kDa), se determinó la relación de marcaje (moles del marcador por mol de proteína). Así, se obtuvo una relación de marcaje de  $2,8 \pm 0,1$  para la CRP y de  $3,3 \pm 0,7$  para el anticuerpo, que se considera aceptable según las recomendaciones del fabricante que sitúa esta relación para IgGs entre 3 y 7. En cuanto a la CRP, el valor se sitúa por debajo de este rango probablemente debido al hecho que su peso molecular es menor y por tanto, existen menos sitios de unión con el marcador.

#### 4.1.2. FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE CON GRUPOS VINIL Y ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN DE CRP Y DE ANTI-CRP MONOCLONAL (mAb) POR ADSORCIÓN

Como primera aproximación, se abordó la inmovilización tanto de proteína como de anticuerpo empleando adsorción pasiva sobre la superficie modificada. Así pues, se funcionalizó la superficie del vidrio, previa activación con NaOH, con un organosilano que contenía una cadena hidrocarbonada con una terminación vinil como se detalla en la figura 6.

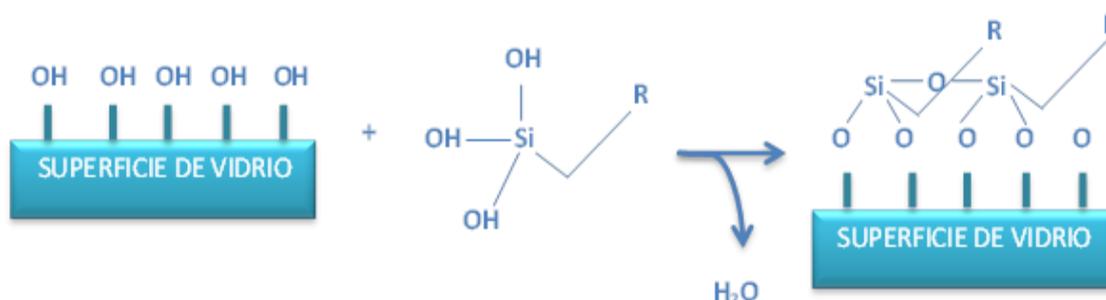


Figura 6 Esquema de la funcionalización de superficies de vidrio con organosilanos. Los radicales R difieren entre organosilanos y son los grupos funcionales disponibles para la interacción con la molécula a inmovilizar. En nuestro caso, R fue un grupo vinil  $-CH=CH_2$

Así mismo, dado que el objetivo de la funcionalización era crear una superficie hidrofóbica que permitiera la adsorción de un receptor biológico en ellas (CRP o mAb) y que por tanto, las propiedades finales del ensayo dependerían en gran medida de la homogeneidad de la superficie y del éxito de la funcionalización de la misma, se establecieron tres puntos de control durante el proceso para verificar su eficacia: antes de la activación, después de la misma y finalmente, después de la funcionalización.

Dicho control se llevó a cabo mediante la evaluación de la hidrofobicidad de las superficies observando los ángulos de contacto de una gota de agua depositada sobre cada una de ellas.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos antes y después de los tratamientos. Tras la activación con NaOH, la superficie activada del vidrio se vuelve más hidrofóbica debido al aumento de densidad de grupos hidroxilo del vidrio, es por ello que la gota de agua se extiende rápidamente sobre el chip.

En contraste, la funcionalización aumenta la hidrofobicidad de los chips y así se constata cuando la gota de agua es depositada sobre éste, puesto que el ángulo de contacto disminuye o lo que es lo mismo, la gota queda confinada a una esfera para reducir la superficie en contacto ya que son de naturalezas distintas.



Figura 7 Ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie antes de la activación, después de la activación y después de la funcionalización.

Los valores de ángulo de contacto fueron  $35^{\circ}$ ,  $0^{\circ}$ ,  $67^{\circ}$ ; respectivamente confirmando así el cambio de hidrofobicidad de la superficie dado por la activación y funcionalización.

Tras el marcaje de los bioreactivos y la funcionalización de las superficies, se abordaron los ensayos de inmovilización para CRP y mAb. El principal objetivo era, en primer lugar, obtener rectas de calibrado que permitieran relacionar la señal de fluorescencia registrada con la densidad de bioreceptor en la superficie. Esto se consiguió imprimiendo matrices de CRP-Ax y mAb-Ax a distintas concentraciones. Seguidamente, los chips se incubaron durante 1h, 2h y toda la noche en oscuridad y condiciones de humedad controlada para la CRP-Ax, y durante 1h y toda la noche para el mAb-Ax.

Transcurrido el tiempo de incubación, se registró la señal de fluorescencia y se cuantificó con el software *GenePix*. Las curvas obtenidas se muestran en las figuras 8 y 9.

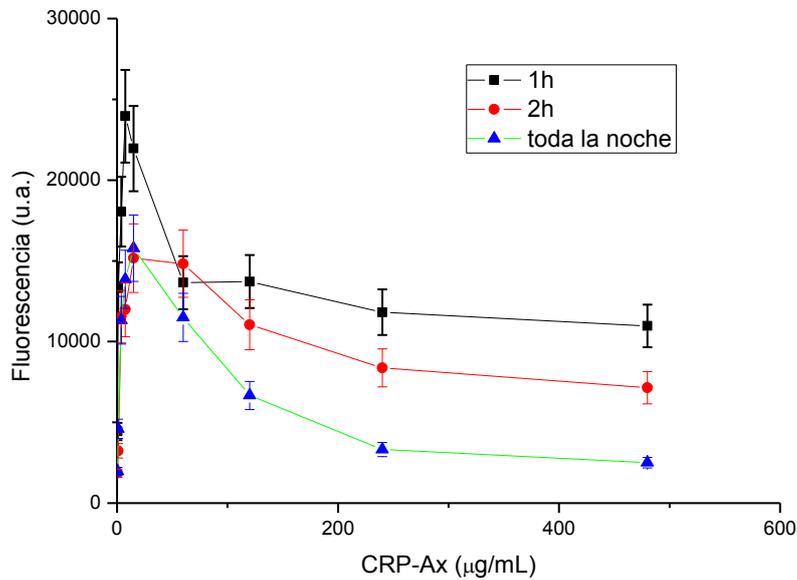


Figura 8 Curvas de calibrado para CRP-Ax. La señal detectada fue medida inmediatamente después de la incubación (1h, 2h o toda la noche) y antes de lavar los chips.

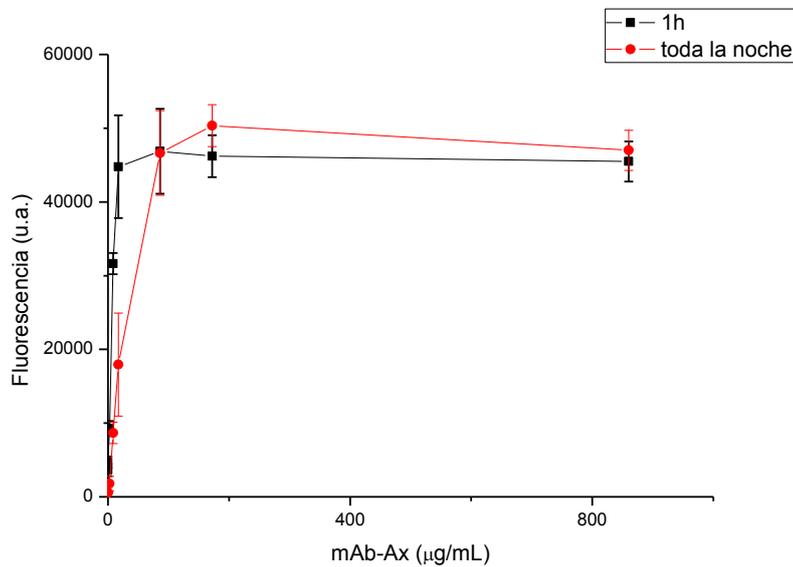


Figura 9 Curvas de calibrado para mAb-Ax inmovilizado. La señal detectada fue medida inmediatamente después de la incubación (1h o toda la noche) y antes de lavar los chips.

Cabe destacar que la señal de fluorescencia detectada sigue una función exponencial en relación al anticuerpo y proteína inmovilizado. Esto indica que a partir de una cierta concentración de mAb-Ax impreso, se obtiene una densidad tal que la señal detectada alcanza

la saturación sin variación alguna de la fluorescencia al aumentar la concentración de impresión. En la práctica, eso se traduce a la imposibilidad de caracterizar el sistema para concentraciones por encima de la saturación.

Además, en el caso de la CRP, es destacable la reducción de señal detectada que se observa una vez se alcanza el máximo tal y como se aprecia en la figura 8. Este fenómeno se conoce como efecto *crowding* que define la tendencia de las proteínas a formar agregados moleculares cuando la concentración de la misma en una disolución aumenta a partir de un cierto límite para alcanzar la máxima estabilidad (Martins *et al.*, 2009). La agregación de las proteínas podría dar lugar a un cambio de conformación que pudiera interferir con la fluorescencia emitida y más probablemente, con su inmovilización dado que su distribución espacial podría reducir el área de inmovilización efectiva e impedir que otras proteínas se adsorbieran. Además, se aprecia cómo ese proceso de agregación se va haciendo más acusado y la fluorescencia registrada va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de incubación, por lo que decidió trabajar con tiempos de incubación de 1 h para la inmovilización de CRP. Para el anticuerpo este efecto *crowding* no se observó, pero puesto que tras lavar, las intensidades de fluorescencia eran muy similares para el tiempo de incubación de 1 h y para la incubación durante toda la noche, se estableció también el realizar la inmovilización durante 1 h tanto para la proteína como para el anticuerpo.

Para construir las curvas de calibrado a partir de estos datos, se tomaron los intervalos de fluorescencia que mantenían una relación lineal con la concentración de bioreceptor depositado en la superficie, y que se hallaban dentro de los valores de intensidad de fluorescencia que se obtuvieron en los chips tras realizar el lavado y registrar de nuevo la señal. En las rectas de calibrado se representó la intensidad de fluorescencia frente a la densidad de masa por unidad de superficie de bioreceptor. Dicha densidad se determinó teniendo en cuenta el volumen depositado sobre el *array* (0,05  $\mu\text{L}$ ) por punto y el área de cada punto, que se calculó a partir del diámetro de punto obtenido con el programa GenePix, siendo la media de  $0,15 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ . Las rectas de calibrado se muestran en la figura 10 y 11.

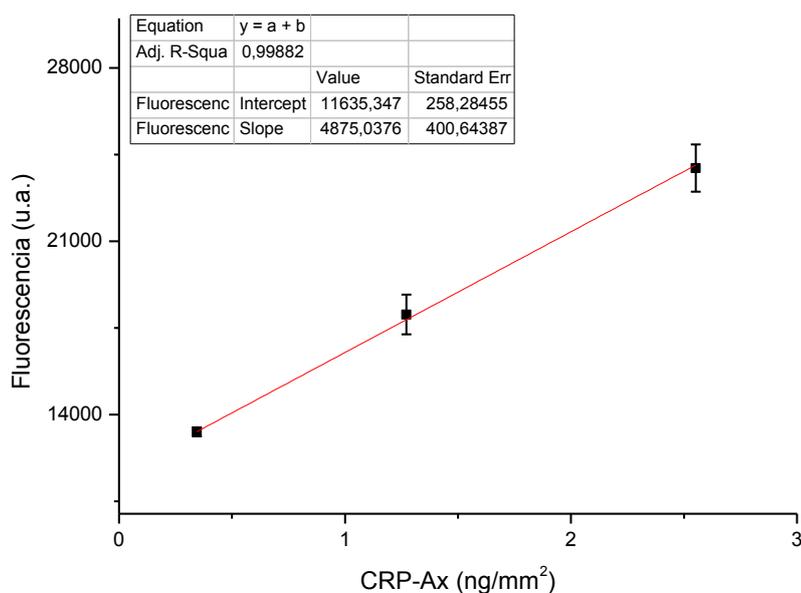


Figura 10 Relación señal detectada-inmovilización de CRP-Ax en vidrio funcionalizado con grupos vinil antes del lavado.

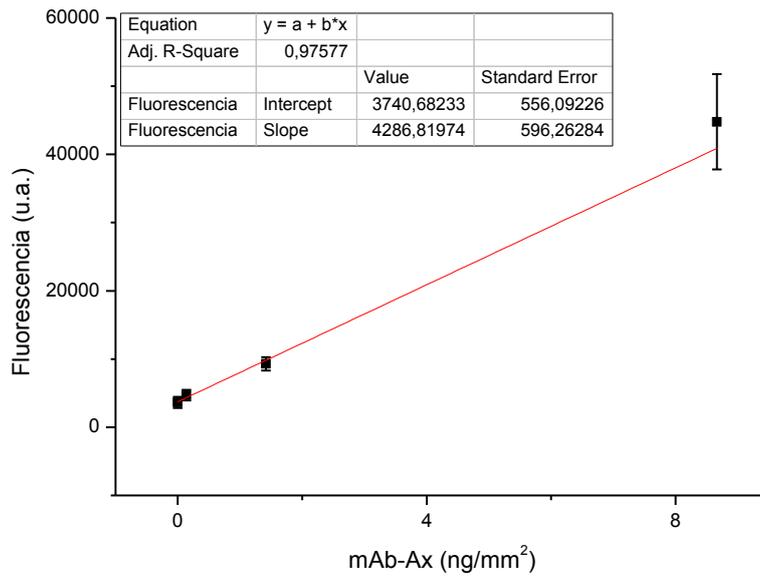


Figura 11 Relación señal detectada-inmovilización de mAb-Ax en vidrio funcionalizado con grupos vinil antes del lavado.

Para determinar la cantidad de mAb-Ax y CRP-Ax inmovilizada en las superficies, tras registrar la fluorescencia, se lavaron los chips con PBS y agua desionizada, de manera que cualquier molécula no inmovilizada fuera retirada de la superficie y se volvió a medir la señal en el array. Los intensidades de fluorescencia obtenidas para CRP-Ax y mAb-Ax a las distintas concentraciones de impresión ensayadas tras la incubación durante 1 h y el lavado, se muestran en la figura 12 y 13, comparadas a su vez con las intensidades obtenidas antes del lavado.

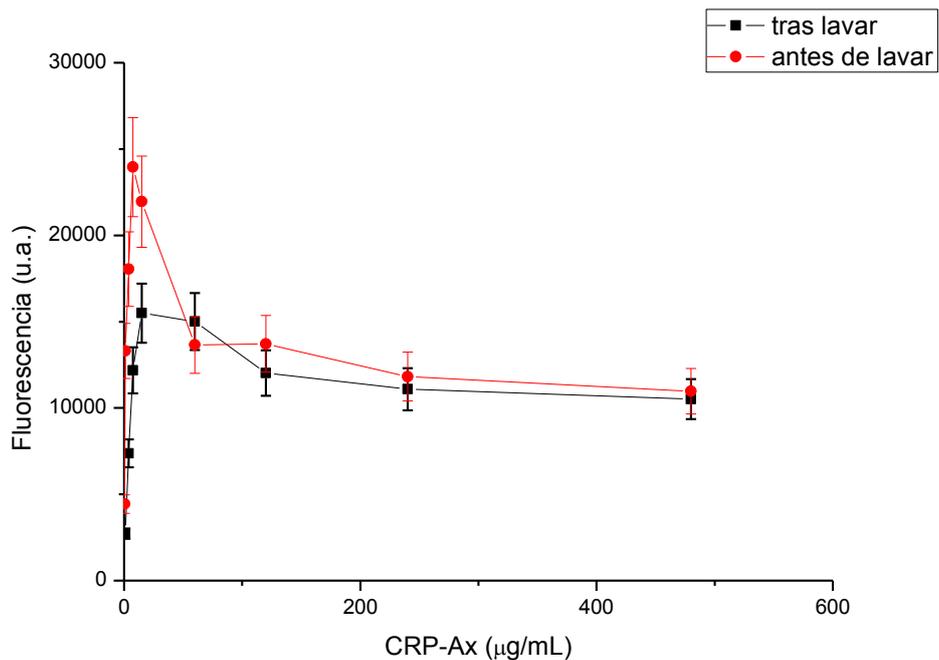


Figura 12 Fluorescencia obtenida tras los ensayos de inmovilización de CRP-Ax antes y después del lavado.

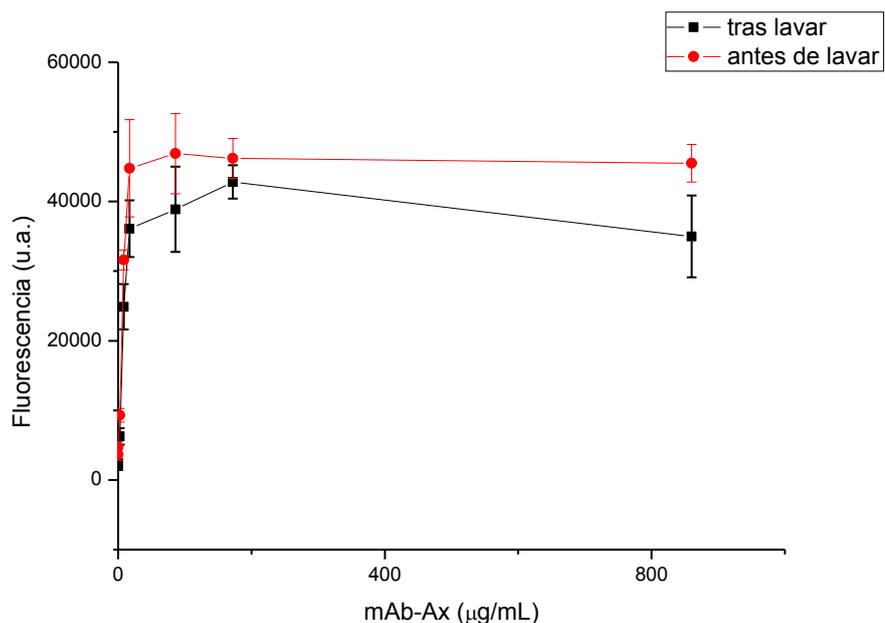


Figura 13 Fluorescencia obtenida tras los ensayos de inmovilización de mAb-Ax antes y después del lavado.

En la figura 14, se puede apreciar la apariencia de un chip antes y después del lavado. Como se ha dicho antes, para establecer qué cantidad de mAb-Ax o CRP-Ax fue inmovilizada, se debe recurrir a las rectas de calibrado presentadas en las figuras 10 y 11 ya que no se puede asumir que toda la proteína proveniente de la disolución fue adsorbida y de hecho, así se constata con la reducción de la señal en las matrices analizadas después del lavado. A partir de la fluorescencia obtenida tras los lavados, por interpolación en las correspondientes rectas de calibrado se determinaron unas densidades máximas de inmovilización de 9,11 y 0,79  $\text{ng}/\text{mm}^2$  para mAb-Ax y CRP-Ax, respectivamente (trabajando con unas concentraciones de impresión de 172  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el mAb-Ax y de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la CRP-Ax)

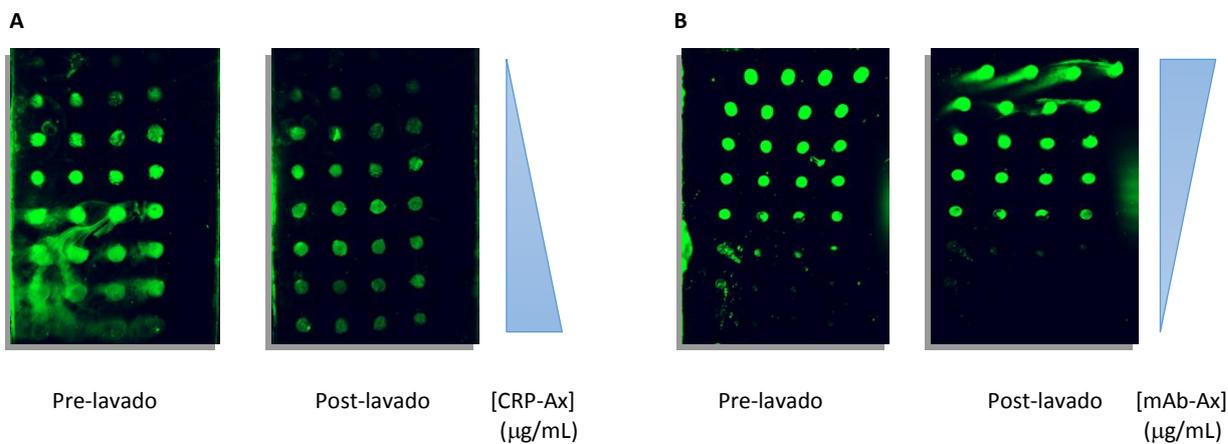


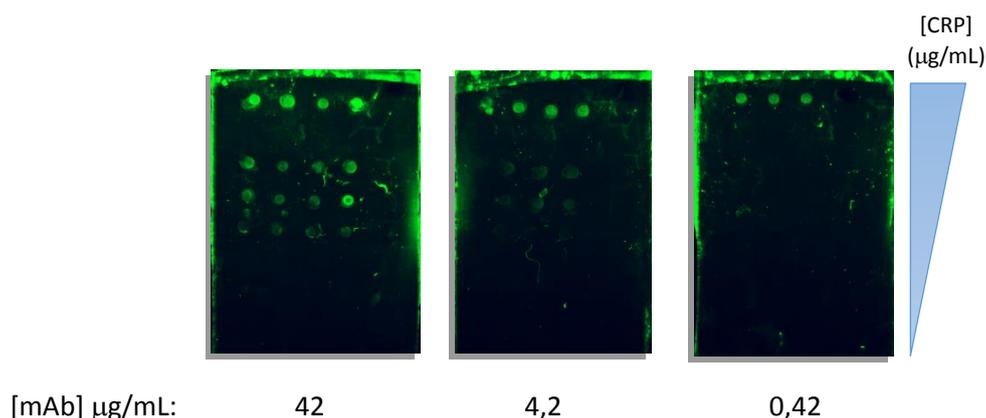
Figura 14 Chips de (A) CRP-Ax y (B) mAb-Ax inmovilizados en superficie de vinil antes y después del lavado.

## 4.2. ENSAYOS DE BIORECONOCIMIENTO MEDIANTE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN.

### 4.2.1. CON CRP INMOVILIZADA EN SUPERFICIES DE VINIL

En un primer intento por determinar las condiciones de trabajo, incluyendo el tipo de formato (directo competitivo o indirecto competitivo, concentración de CRP y de mAb a inmovilizar), se realizaron ensayos de bioreconocimiento tanto con CRP marcada e inmovilizando el anticuerpo sin marcar, como de reconocimiento de mAb-Ax, empleando CRP sin marcar para la inmovilización.

Para el primer caso, se imprimieron tres chips con distintas concentraciones de CRP (de 1000 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con una línea control de inmovilización de mAb-Ax. Posteriormente, cada chip se incubó con una concentración de mAb-Ax, abarcando tres órdenes de magnitud (0,42, 4,2 y 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y se midió la fluorescencia. El resultado se muestra en la figura 15.



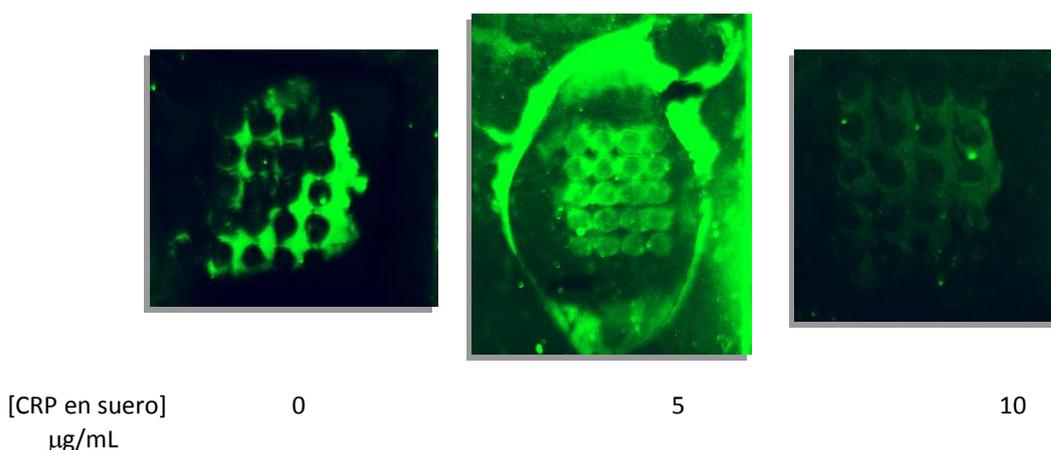
**Figura 15** *Microarrays de CRP inmovilizada a distintas concentraciones en chips de vinil e incubadas con tres concentraciones distintas de mAb-Ax.* La primera línea corresponde al control de mAb-Ax inmovilizado. La segunda no fue impresa. La concentración de CRP disminuye conforme se desciende en las filas de la matriz.

Haciendo una inspección visual de las micromatrices, es claramente apreciable que para concentraciones de mAb-Ax del orden  $10^{-1}$ , no hay reconocimiento o la señal generada es indetectable. En oposición, tanto para 4,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como para 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se detectó señal en algunas de las líneas correspondientes a las concentraciones más altas de CRP inmovilizada (500, 100 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; la línea de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no fue impresa debido a un error del microimpresor), siendo ésta última de mayor intensidad.

Sin embargo, se observó un elevado ruido de fondo con señales detectadas mucho menores si se compara con el control y con las líneas homólogas en los ensayos de inmovilización. Dicho ruido de fondo se atribuyó a que el anticuerpo podría adsorberse de manera inespecífica sobre la superficie.

Así pues, y en base a los resultados preliminares, se decidió utilizar una concentración de mAb-Ax de 4,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los siguientes experimentos en matrices de CRP inmovilizada partiendo de una concentración en disolución de la misma de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ya que la señal detectada es cuantificable en estas condiciones. La nueva matriz se diseñó siguiendo una distribución de 4x4 con el fin de reducir la variación entre cada una de las réplicas y hacer más confiable el resultado. Ésta modificación e intentar centrar la matriz dentro del chip lo mejor posible pretendía que el rayo de luz del detector de fluorescencia incidiera de la misma manera en cada una de las réplicas, disminuyendo la desviación típica del conjunto.

Con las condiciones anteriormente descritas y tras la inmovilización de CRP, se crearon diluciones seriadas de la proteína entre 0 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que es el rango de interés clínico (Algarra *et al.*, 2012), en PBS y con 5% de albúmina, a las que se añadió el mAb-Ax para llegar a una concentración final de 4,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e inmediatamente después, la mezcla se depositó sobre la matriz de CRP y se incubó durante 10 minutos. Tras la incubación y el lavado, se obtuvieron resultados como los mostrados en la figura 16.



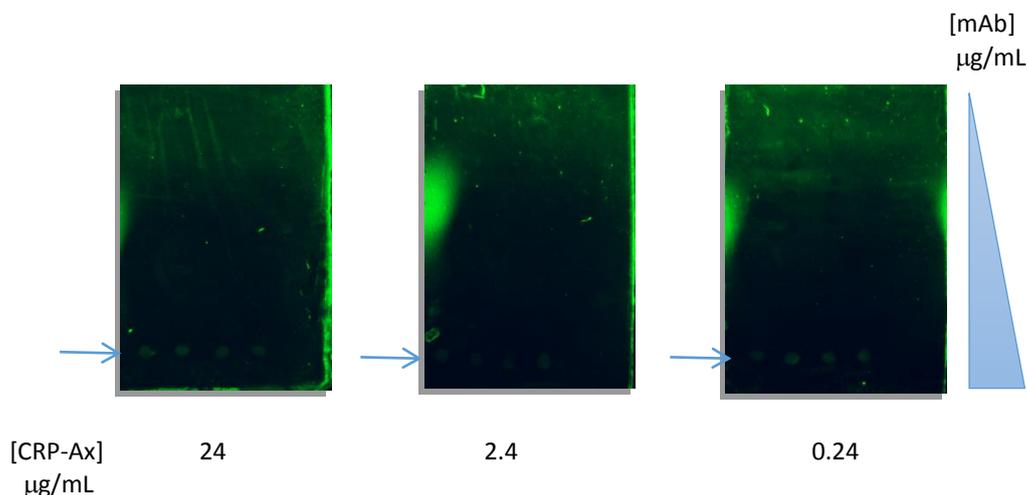
**Figura 16 Chips para el calibrado del inmunoensayo competitivo indirecto.** CRP (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue inmovilizada en un soporte de vidrio funcionalizado con vinil, sobre ella se depositó 20  $\mu\text{L}$  de una disolución de CRP (en la figura 0, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y mAb (4,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS con 5% de albúmina.

Como se observa en la figura 16 y en concordancia con los resultados anteriormente obtenidos, hay una gran señal de fondo y en la mayoría de los casos, la fluorescencia se halló fuera de los puntos, por lo que la señal detectada no pudo ser medida en todos los casos.

Frente a esto, es posible pensar que el anticuerpo tiene más afinidad por la CRP en disolución que inmovilizada y la superficie del vidrio favorece la adsorción del complejo Ab-Ax-CRP formado en disolución, lo que lleva a que aumente la señal de fondo. Bloquear en este caso no mejoraría los resultados ya que la disolución contiene en sí el agente bloqueante, la albúmina.

#### 4.2.2. CON mAb INMOVILIZADO EN SUPERFICIES DE VINIL

De manera similar al ensayo de reconocimiento en superficies de vinil de la CRP, se realizó el reconocimiento para el mAb inmovilizado (de 0,2 a 1275  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Estos ensayos, como los anteriores, se hicieron con el fin de detectar si la inmovilización del anticuerpo puede modificar su afinidad por la CRP para optar por el mejor formato de *microarray*. Esta vez las concentraciones de CRP-Ax fueron seleccionadas atendiendo a las recomendaciones de Melin *et al.* (2010) siendo 0,24; 2,4 y 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la figura 17 se muestran los tres chips.



**Figura 17** *Microarrays* de mAb inmovilizado a distintas concentraciones en chips de vinil e incubadas con tres concentraciones distintas de CRP-Ax. La línea señalada corresponde al control de mAb-Ax inmovilizado. La concentración de mAb aumenta conforme se desciende en las filas de la matriz.

Como se puede observar en la figura 17, en ninguno de los tres casos se obtuvo señal proveniente de los puntos de mAb inmovilizado tras la incubación con CRP-Ax. Así mismo, nos encontramos con una señal de fondo alta. El control de inmovilización sí que presentaba señal, lo que indica que el anticuerpo si ha sido inmovilizado y que por tanto, la falta de fluorescencia en las demás líneas de la matriz son resultado de la ausencia de interacción entre CRP-Ax y mAb inmovilizado.

Una primera hipótesis podría inducir a interpretar que el epítipo en la CRP es modificado por el marcaje. Sin embargo, los resultados del punto 4.2.1 no dejan lugar a dudas de que el reconocimiento existe.

Entonces, el segundo factor que puede afectar la formación del complejo bioreceptor-ligando es la inmovilización del anticuerpo que puede esconder de alguna forma los dominios de unión.

En conclusión y movidos por el hecho de que 1) el formato indirecto competitivo no dio unos resultados extraordinariamente buenos; 2) el formato directo en principio es preferible por su sencillez y porque serviría para ser empleado en dispositivos de detección sin marcaje de manera sencilla (acoplado por ejemplo, la peroxidasa al mAb); y 3) la funcionalización de la superficie con grupos vinil en cualquier caso proporcionó fondos muy elevados, es decir, con mucha adsorción inespecífica, además de inmovilizar el anticuerpo de manera no biodisponible, se decidió invertir nuestros esfuerzos en el ensayo de nuevas funcionalizaciones

que permitiesen el anclaje covalente de anticuerpo de manera disponible y a la vez disminuyesen el ruido de fondo.

### 4.3. ENSAYOS DE INMOVILIZACIÓN COVALENTE

#### 4.3.1. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES TIOLADAS Y MIXTAS

Con el objetivo de disponer de una superficie que permitiese el anclaje covalente de los anticuerpos, se pensó en funcionalizar la superficie del vidrio con un organosilano conteniendo grupos tiol, de manera que el anticuerpo pudiera ser inmovilizado covalentemente a través también de sus grupos tiol, procedentes de los residuos del aminoácido cisteína.

Por otro lado, para conseguir una superficie que minimizase la adsorción inespecífica se planteó el empleo de un organosilano fluorado, ya que es conocida su alta hidrofobicidad y tendencia a repelar la adsorción de materia orgánica (Woodward *et al.*, 2002).

Así, surgió la idea de combinar ambas funcionalizaciones con el objetivo de aunar las ventajas de una y otra. Con este fin, se realizaron tres ensayos: primero en una superficie únicamente tiolada para testar su capacidad de inmovilización; por otro lado, en superficies totalmente fluoradas para medir la capacidad de repulsión; y finalmente se probaron combinaciones de ambas hasta obtener los mejores resultados.

##### 4.3.1.1. SUPERFICIES TIOLADAS

Se siguió el protocolo estándar de funcionalización con organosilano, en este caso empleando 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTS) tal y como se detalla en la figura 18.

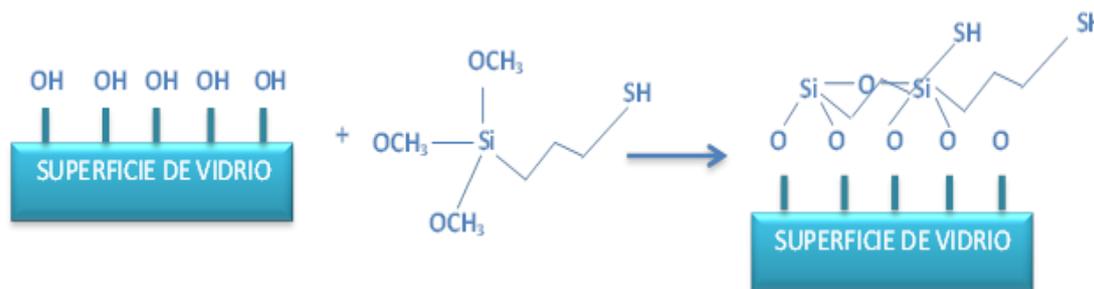


Figura 18 Esquema de la funcionalización con 3-Mercaptopropil trimetoxisilano. Los residuos SH quedan disponibles sobre la superficie para reaccionar con los residuos SH de las cisteínas del anticuerpo.

Tras comprobar mediante ángulo de contacto la correcta modificación de la superficie, se realizaron ensayos de inmovilización de anticuerpo marcado tal y como se ha detallado para la inmovilización por adsorción obteniéndose resultados muy similares. En este caso, y con el fin de acelerar la reacción de los tioles de la superficie con los tioles del anticuerpo, se incubó el mAb sobre la superficie irradiando con luz UV de 365 nm, pues está descrito que genera radicales tiol que son más reactivos y acelera los tiempos de reacción (Escorihuela *et al.*, 2012).

Una vez comprobada la inmovilización se pasó a evaluar la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos inmovilizados. En este caso, puesto que en el momento de abordar esto

ensayos se nos ofreció la posibilidad de ensayar también un anticuerpo policlonal (pAb), amablemente cedido por el grupo de amablemente cedidos por el grupo *Nanobiotechnology for Diagnostics*, Instituto de Química Avanzada de Cataluña - Nb4D-IQAC, dirigido por la Dra. Pilar Marco, se decidió incluir ambos anticuerpos en la matriz.

Basándonos en la bibliografía (Melin et al., 2010), se imprimieron chips con dos líneas de anti-CRP, una de mAb (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y otra de pAb (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en superficies tioladas y mixtas. Sobre estos se depositó 20  $\mu\text{L}$  de una disolución en PBS de CRP-Ax (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 10 min.

Para las superficies tioladas, las tres réplicas mostraron un gran ruido de fondo incluso después del lavado. No obstante, y a diferencia del inmunoensayo en superficie de vinil, se obtuvo señal específica proveniente de la interacción entre bioreceptor y analito.

Como se muestra en la figura 19, la intensidad de la señal generada por los anticuerpos policlonales es cualitativamente mayor que la producida por los anticuerpos monoclonales. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los pAb en conjunto consiguen unirse a distintas regiones de la CRP, aumentando, por ende, la probabilidad de que ésta quede inmovilizada de manera específica a la superficie.

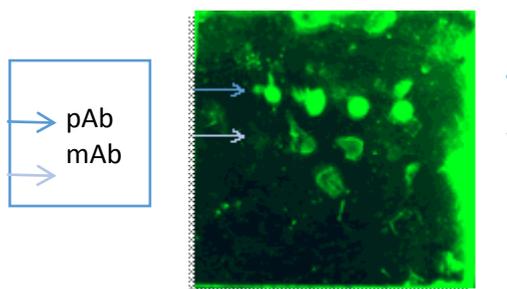


Figura 19 Ensayo de bioreconocimiento con anti-CRP inmovilizado (mAb y pAb, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y CRP-Ax en disolución (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

En cuanto a la superficie, aún requería una puesta a punto que disminuyera la inmovilización inespecífica responsable del alto ruido de fondo, con lo que se mejoraría la señal correspondiente a la CRP-Ax y la reproducibilidad. Una de las alternativas era el bloqueo de la superficie con proteínas como la albúmina o la caseína (Sobek *et al.*, 2007), pero esto supondría mayor tiempo en la producción de los chips y más gasto en reactivos, haciéndolos menos competitivos.

La alternativa a dicho problema que aquí se planteó, y que se ha comentado anteriormente, es funcionalizar con una mezcla de organosilano fluorado (PTFS) y MPTS para incorporar las características de las dos superficies: en el primer caso, la gran hidrofobicidad que genera el PTFS y que reduce la adsorción inespecífica y en segundo lugar, la inmovilización covalente con MPTS que mejora los resultados con respecto a la inmovilización pasiva.

Por ello el siguiente paso, antes de pasar a la funcionalización de las superficies mixtas, fue comprobar la capacidad de minimizar la adsorción inespecífica de la superficie exclusivamente fluorada.

#### 4.3.1.2. SUPERFICIES FLUORADAS

Como se acaba de discutir, se planteó una alternativa a la funcionalización que disminuyera el ruido de fondo sin tener que bloquear la superficie. Con este fin, se emplearon chips de PFTS sobre los cuales se imprimió un *microarray* con mAb, que se incubó toda la noche para favorecer la adsorción del anticuerpo sobre la superficie, además se incluyó una línea de control de inmovilización de anticuerpo marcado.

Después de incubar los chips con dos concentraciones distintas de CRP-Ax (2,4 µg/mL y 0,24 µg/mL) y medir la fluorescencia, sólo se obtuvo señal en algunos chips incubados con 2,4 µg/mL, es decir, no hubo reproducibilidad y consistencia en las réplicas. Pese a que a simple vista se pueden llegar a distinguir los puntos, el programa Genepix no pudo cuantificar la señal generada. La señal de fluorescencia del mAb-Ax inmovilizado como control tampoco resultó cuantificable con el programa.

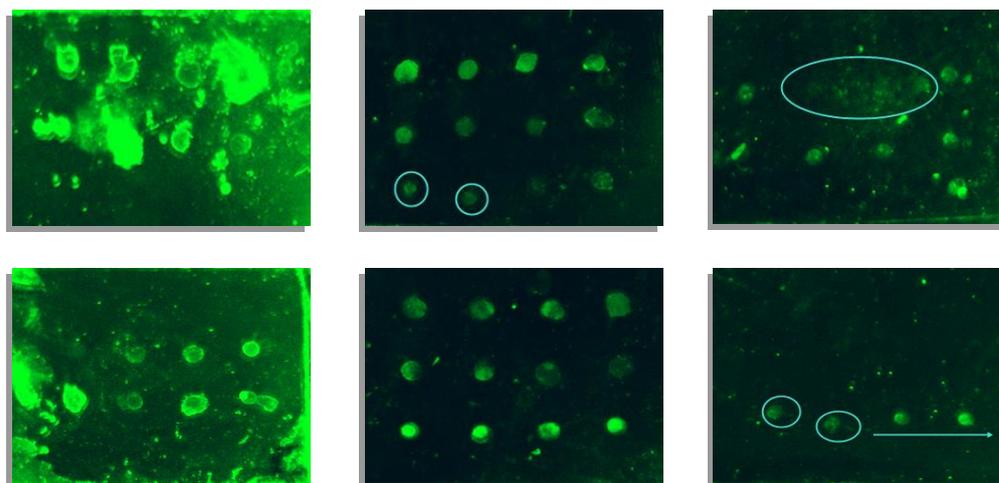
Así mismo, el ruido de fondo es considerablemente bajo comparado con resultados anteriores en superficies de vinil y tiol, esto gracias a la gran hidrofobicidad de la superficie. Quizás es ésta la misma razón que de forma indirecta lleva a que la señal de fluorescencia sea baja: la superficie es tan hidrofóbica que no sólo evita la adsorción inespecífica de la CRP-Ax, sino que también repele el anticuerpo de forma que muy pocos son efectivamente adsorbidos y por ende, pocos mAb pueden formar efectivamente el complejo con la CRP. En concordancia, el diámetro de punto obtenido es más pequeño que el mismo en las superficies funcionalizadas con vinil o MPTS, un indicio más de la elevada hidrofobicidad de la superficie.

En conclusión, una vez demostrada la efectividad de la superficie tiolada para inmovilizar anticuerpo y demostrada la capacidad de la superficie fluorada para repeler la adsorción inespecífica se procedió a la optimización de las superficies mixtas combinando ambos reactivos de funcionalización. Por otro lado, puesto que los resultados con el anticuerpo policlonal eran mejores que los del anticuerpo monoclonal, se decidió trabajar, a partir de entonces, únicamente con el anticuerpo policlonal (pAb).

#### 4.3.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES MIXTAS

Tres distintas superficies mixtas fueron testadas para ver su influencia en la inmovilización del pAb y posterior reconocimiento de la CRP. Para ello, se utilizaron tres combinaciones de PFTS y MPTS en metanol, todas con un porcentaje final del 2% en volumen de organosilano total, y variando la relación MPTS: PFTS (2:1; 1:1; y 1:2).

Tras la funcionalización y el lavado de los chips para favorecer la homogeneidad de las superficies, se imprimió una matriz 2x4 de pAb (en el caso de la superficie 1:1, se agregó una línea control de CRP-Ax) partiendo de una disolución del anticuerpo en PBS de 500 µg/mL (línea 1) y 100 µg/mL (línea 2). Posteriormente, tras la correspondiente incubación del anticuerpo en la superficie y lavado, se incubaron los chips con 2,4 µg/mL de CRP-Ax para comprobar la efectividad del reconocimiento molecular entre pAb y CRP. En la figura 20, se presentan los chips resultado de este experimento.



MPTS: PTFS

2:1

1:1

1:2

**Figura 20** Ensayos de reconocimiento en distintas superficies mixtas (funcionalizadas con MPTS y PTFS a tres ratios distintos). pAb inmobilizado a dos concentraciones distintas: 500 (línea superior) y 100 (línea inferior)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el caso de la superficie 1:1, una tercera línea de CRP-Ax se inmobilizó en la parte inferior. Los chips se incubaron con CRP-Ax (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los círculos azules indican el movimiento de puntos de la matriz tras el lavado. La línea azul el plano de la fila de puntos.

En primer lugar, se observa para la superficie con MPTS/PFTS en relación 2:1 un gran ruido de fondo aunque se pueden identificar visualmente los puntos de la matriz. En comparación con los resultados obtenidos anteriormente no vimos una mejora cualitativa en el bloqueo de la superficie, o en otras palabras, la adsorción inespecífica sigue siendo alta.

Por el contrario, cuando la relación MPTS:PFTS 1:2 la superficie presenta muy poco ruido de fondo. No obstante, la reproducibilidad es baja y en algunas de las réplicas se halló una falta de puntos, es decir, la concentración de MPTS no es lo suficientemente alta para provocar una buena inmovilización covalente. Así, en algunos casos el chip no da señal alguna y en otros, sólo algunos puntos están presentes.

Finalmente, para una relación 1:1 se alcanza el equilibrio perfecto y las características positivas de ambas superficies convergen en una sola. Sobre los mismos chips, se puede apreciar claramente la diferencia entre las líneas correspondientes a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya que las primeras generan una señal mayor.

En la figura 20, se puede apreciar la matriz de puntos con un bajo ruido de fondo. En ningún caso se empleó el bloqueo mediante algún reactivo o paso adicional, lo que nos lleva a concluir que este diseño es un buen candidato para el desarrollo posterior de un biosensor.

#### 4.4. PUESTA A PUNTO DEL INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE CRP EN FORMATO COMPETITIVO DIRECTO

Resumiendo los resultados anteriores y con el objetivo de demostrar la viabilidad del soporte diseñado para la detección de CRP en suero, se funcionalizaron soportes de vidrio con la mezcla optimizada de PFTS y MPTS 1:1, sobre los cuales se inmobilizó una matriz de pAb empleando una concentración de impresión 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS. De este lote de chips, unos cuantos se emplearon para construir la curva dosis-respuesta.

Para realizar la curva dosis-respuesta, inicialmente se utilizó disoluciones de CRP a concentraciones conocidas en PBS y CRP-Ax (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sin embargo, se observó que existía efecto matriz para las muestras de suero real (que fueron empleadas, una vez hecha la curva, para comprobar la sensibilidad y eficacia del sistema), por lo que finalmente se optó por emplear un suero sanguíneo que no contenía CRP como medio para realizar las diluciones en los patrones de la curva de calibrado. Así mismo, se ensayó un intervalo muy amplio de concentraciones hasta encontrar las adecuadas en las cuales existía una relación entre cantidad de CRP y señal obtenida.

En principio, puesto que se trata de un ensayo directo competitivo, cuanto más concentración de CRP tenga la muestra menos señal se obtendrá del *microarray*. Así para construir la curva de calibrado, distintas muestras dopadas con una concentración de CRP conocida (comprendida entre 0 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inicialmente y posteriormente reducida a 0 y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y una concentración fija de CRP-Ax (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se incubaron sobre distintos chips, leyendo la fluorescencia tras los lavados.

La curva resultante se muestra en la figura 21.

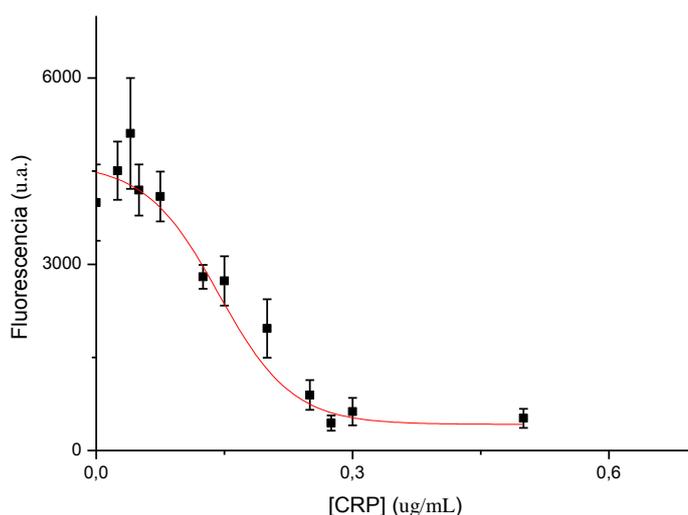


Figura 21 Recta de calibrado para el inmunoensayo competitivo directo en superficie de vidrio funcionalizada con PFTS: MPTS 1:1.

De los resultados obtenidos se deduce que conforme aumenta la concentración de CRP, disminuye la señal detectada, es decir, los resultados se ajustan al principio del inmunoensayo competitivo directo en el que el analito compite con su homólogo marcado. Si la CRP se une a uno de los anticuerpos inmovilizados, éste ya no estará disponible para unirse a la CRP-Ax, por tanto menos señal será detectada.

Así mismo, se observó que para valores de la CRP por encima de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la relación con la fluorescencia medida no es directamente proporcional. Este hecho es de crucial importancia ya que sólo a partir de la zona lineal de la curva de calibrado se puede obtener una correlación entre estos dos parámetros. Al ajustar los datos a una curva sigmoideal de tipo dosis-respuesta, se obtuvo un valor de IC50 de 0,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como se puede observar, el intervalo lineal pertenece a una zona comprendida entre 0 y 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de CRP. Clínicamente estos valores están muy por debajo de las zonas de interés (riesgo medio de sufrir una enfermedad cardiovascular relacionado con concentraciones de CRP en suero entre 1 y 3  $\mu\text{g/mL}$ - Algarra et al., 2012). Sin embargo, si el suero en sangre se diluye a razón de 1/10, nuestro *microarray* sería capaz de trabajar en la zona de riesgo bajo y medio (riesgo bajo: 0-0,1  $\mu\text{g/mL}$ , riesgo medio: 0,1-0,3  $\mu\text{g/mL}$  si el suero se encuentra diluido), en otras, palabras, el sistema es capaz de detectar la CRP con muy poca cantidad de muestra.

Una vez obtenida la curva dosis-respuesta, Finalmente se tomaron muestras de suero sanguíneo con niveles basales de CRP (concentraciones inferiores a 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ) y se doparon con CRP a 0,3, 1, 1,75 y 4  $\mu\text{g/mL}$ . Estas muestras se diluyeron 1:10 con PBS-T, se añadió CRP-Ax a 2,4  $\mu\text{g/mL}$  y se incubaron sobre chips mixtos con la micromatriz de anticuerpo, en las mismas condiciones empleadas para realizar la curva de calibrado.

Tras los lavados, y lectura de la fluorescencia, se interpoló el resultado en la curva de calibrado y se calculó el porcentaje de recuperación de cada una de las muestras, estando comprendido en todos los casos entre el 70 y el 136 %. Los datos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4 Coeficientes de recuperación en muestras de suero dopadas.

Muestras dopadas	Dilución 1:10	Lectura del Ensayo		Interpolacion en la curva	Coeficiente de Recuperación (%)	
		[CRP] $\mu\text{g/mL}$	[CRP] $\mu\text{g/mL}$			Fluorescencia (ua)
0,3	0,03		4350	360	0,028	93
1	0,1		2702	391	0,136	136
1,75	0,175		1658	231	0,180	103
4	0,4		590	330	0,280	70

Para mejorar los resultados, y dado que la cantidad de muestra necesaria para realizar este ensayo es muy pequeña, se propone imprimir una matriz con mayor número de puntos siendo cada uno una réplica de manera que pueda disminuirse la desviación estándar y aumentar la reproducibilidad y sensibilidad. Por cuestiones de tiempo, no pudo llevarse a cabo.

#### 4.5. ALTERNATIVAS AL INMUNOENSAYO: FOSFORILCOLINA (FC) COMO BIORECEPTOR

Puesto que el inmunoensayo es una de las principales estrategias a la hora de desarrollar biosensores y en el caso particular de la CRP, donde su detección tiene gran importancia clínica, el desarrollo de matrices con este formato es un campo muy competitivo que promueve la mejora de éstas técnicas pero que a la vez reduce las probabilidades de innovar.

Es por ésta razón, que, como parte final de este trabajo de grado y siendo conscientes de la importancia de la innovación en ciencia, planteamos una alternativa al inmunoensayo para la detección de la CRP.

En un principio, se trataría de un formato directo competitivo como el que se ha puesto a punto durante el desarrollo del TFG. La diferencia, por su parte, radicaría en que el bioreceptor sería un ligando natural de la proteína, la fosforilcolina, como se explica en la introducción. En este caso el ligando está modificado con un grupo alqueno que permite su polimerización al irradiar con luz UV y da como resultado un hidrogel en el cual la densidad de receptores de CRP es mucho mayor que en un *microarray* de anticuerpos como los anteriormente descritos.

Una vez realizados los experimentos en superficies mixtas similares a las anteriormente mencionadas, comprobamos que a diferencia de los anticuerpos, el ligando modificado para la inmovilización formaba el hidrogel pero tras los lavados era eliminado de la superficie, no quedando fijada sobre esta.

Ante la imposibilidad de inmovilizar sobre las superficies mixtas, se optó por un cambio de soporte y se escogió la resina SU-8 que presenta una gran capacidad de inmovilizar por adsorción. De esta manera, fuimos capaces de fijar el hidrogel, que permaneció tras los lavados. Sobre estos *arrays* de FC polimerizada se realizaron ensayos de reconocimiento con CRP-Ax. Los resultados, como se muestran en la figura 22, no dejan lugar a dudas de la alta capacidad de reconocimiento de estos *microarrays*. Se observó que la FC era capaz de reconocer la CRP incluso a concentraciones de ng/mL, con lo cual, la puesta a punto de un sistema como éste, daría lugar a un biosensor con gran sensibilidad.

Además, se probó a realizar ensayos de detección en suero dopados con CRP-Ax a distintos niveles, con los resultados que se muestran en la figura 22. Se detectó fluorescencia hasta con concentraciones de CRP-Ax de 50 ng/mL en suero sin diluir. Estos resultados indican que la nueva propuesta es altamente interesante para poner a punto un sistema de detección en formato directo competitivo siguiendo los mismos pasos de optimización que se han descrito para el caso del inmunosensor; pero que por falta de tiempo no pudieron realizarse dentro de este trabajo de final de grado. Es necesario comentar, no obstante, que este hallazgo abrió una nueva vía de investigación en el grupo que ha continuado explorando las posibilidades de esta aproximación.

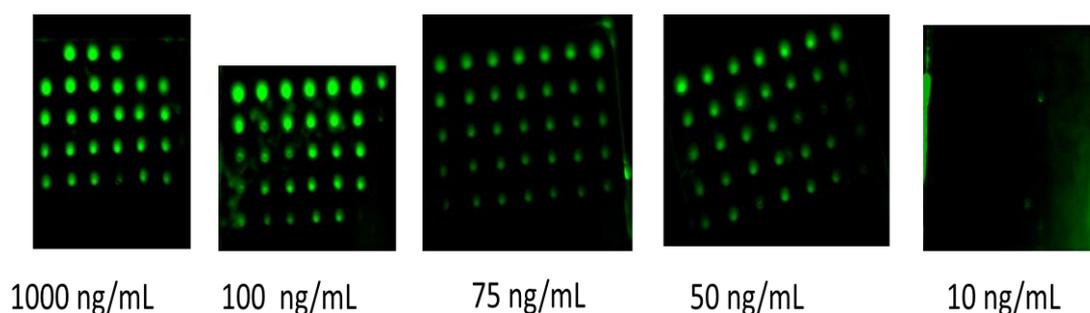


Figura 22 *Arrays* de hidrogel de FC, tratado con suero real, sin diluir dopado con CRP-AX a las concentraciones que se indican bajo cada chip.

# V. CONCLUSIONES

---

Después de estudiar de los distintos parámetros que componen un *microarray*, se consiguió desarrollar un sistema de detección de la proteína C-reactiva en sangre que se ajusta al rango de concentraciones de interés clínico de la misma (1-3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), requiriendo un paso previo de dilución 1:10 del suero sanguíneo, con lo que la cantidad de muestra necesaria es del orden de microlitros.

Tras un efectivo marcaje de la CRP y mAb, el sistema de detección se definió en una superficie de vidrio funcionalizada con una mezcla de dos organosilanos PFTS y MPTS (1:1 en volumen) de forma que las características de ambos compuestos permitieron que por un lado, no se necesitara un agente de bloqueo de la superficie, reduciendo costos y tiempo en la producción de las matrices gracias a la gran hidrofobicidad del PFTS; y por otro lado, la formación de enlace covalente entre los grupos tiol del organosilano y de los anticuerpos, mejorando la inmovilización del bioreceptor.

En cuanto al tipo de inmunoensayo, se optó por un formato competitivo directo tras la imposibilidad de obtener una relación entre la señal detectada y la concentración de CRP presente en la muestra en el ensayo competitivo indirecto.

Finalmente, la comparativa entre anti-CRP monoclonal y policlonal dejó en evidencia que los anticuerpos policlonales favorecen la formación del complejo anticuerpo-antígeno y por tanto, la señal obtenida es mayor, aumentando la reproducibilidad y sensibilidad del *microarray*.

No obstante, el sistema de detección aquí presentado no mejora los *microarrays* reportados por otros grupos de investigación, por lo que es necesario buscar alternativas que mejoren la sensibilidad y reproducibilidad. Así, se plantea la puesta a punto de un biosensor donde el bioreceptor sea el ligando natural de la CRP, la fosforilcolina (derivatizada para favorecer su inmovilización) que en los experimentos realizados en resina SU-8 deja ya entrever la gran sensibilidad y afinidad por la CRP.

# VI. BIBLIOGRAFÍA

---

- ALGARRA, M.; GOMES, D.; ESTEVES DA SILVA, J. (2012). *Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. Clinica Chimica Acta*, 415: 1–9.
- ANDRADE, A. (2006). *El inmunoensayo*, en *Metodologías en el laboratorio clínico*. Ed. Universidad Santiago de Compostela: capítulo 53.
- ANGENENDT, P.; GLOKLER, J.; SOBEK, J.; LEHRACH, H.; CAHILL, D.J. (2003). *Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications. Journal of Chromatography A*, 1009: 97–104
- BALDINI, F.; CARLONI, A.; GIANNETTI, A.; PORRO, G.; TRONO, C. (2009). *An optical PMMA biochip based on fluorescence anisotropy: Application to C-reactive protein assay. Sensors and Actuators, B* 139: 64–68.
- BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. (2004). *C-reactive Protein. The Journal of Biological Chemistry*, 279: 48487-48490.
- BORISOV, S.M.; WOLFBEIS, O.S. (2008). *Optical Biosensors. Chem. Rev.*, 108:423-461.
- BUCHEGGER, P.; SAUER, U.; TOTH-SZÉKÉLY, H.; PREININGER, C. (2012). *Miniaturized Protein Microarray with Internal Calibration as Point-of-Care Device for Diagnosis of Neonatal Sepsis. Sensors*, 12: 1494-1508.
- COX, K.L.; DEVANARAYAN, V.; KRIAUCIUNAS, A.; MANETTA, J.; MONTROSE, C.; SITTAMPALAM, S. (2012). *Immunoassay Methods en Assay Guidance Manual*.
- CSÖREGI, E.; GÁSPAR, S.; NICULESCU, M.; MATIASSEN, B.; SCHUHMANN, W. (2001) *Amperometric enzyme-based biosensors for application in food and beverage industry in Physics and Chemistry. Basis of biotechnology*. Ed. Kluwer academic publishers: 105-129.
- CULLEY, F.; BODMAN-SMITH, K.; FERGUSON, M.; NIKOLAEV, A.; SHANTILAL, N.; RAYNES, J. (1999). *C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. Glycobiology*, vol 10, no. 1: 59-65.
- DU, Q.; LARSSON, O.; SWERDLOW, H.; LIANG, Z. (2005). *DNA Immobilization: Silanized Nucleic Acids and Nanoprinting. Topics in Curr Chemistry*, 261: 45.
- ESCORIHUELA, J.; BAÑULS, M.J.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. (2012). *Development of Oligonucleotide Microarrays onto Si-Based Surfaces via Thioether Linkage Mediated by UV Irradiation. Bioconjugate Chem.*, 23 (10): 2121–2128
- GABORIAUD, C.; JUANHUIX, J.; GRUEZ, A.; LACROIX, M.; DARNAULT, C.; PIGNOL, D.; VERGER, D.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.; ARLAUD, G. J. (2003). *The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. Biol. Chem.*, 278: 46974 – 46982.
- HALL, D.A.; PTACEK, J.; SNYDER, M. (2007). *Protein microarray technology. Mech Ageing Dev.* 128(1): 161–167.
- HERRÁEZ, Á. (2010). *Análisis de biomarcadores empleando biochips y matrices de biomoléculas. Biomarcadores: analítica, diagnóstico y terapéutica*. Ed. F. Ortega: 223-257
- HOOPES, L. (2008). *Genetic diagnosis: DNA microarrays and cancer. Nature Education* 1(1): 3c

- JOOST, T.; BACHMANN, J. (2003). *Protein microarray technology. Business Briefing: Future Drug Discovery.*
- KREAMER, P.M.; KEß, M.; KREMMERB, E.; SCHULTE-HOSTEDEA, S. (2010) *Multi-parameter determination of TNFa, PCT and CRP for point-of-care testing. Analyst*, 136: 692
- LÓPEZ, M.; MALLORQUÍN, P.; VEGA, M. (2002). *Microarrays y biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica.* Genoma España-CIBT-FGUAM.
- LÓPEZ, M.; MALLORQUÍN, P.; VEGA, M. (2005). *Aplicaciones de los microarrays y biochips en salud humana.* Genoma España-CIBT-FGUAM.
- MARTINS, S.A.M.; PRAZERES, D.M.F.; FONSECA, L.P.; MONTEIRO, G.A. (2009). *Application of central composite design for DNA hybridization onto magnetic microparticles. Analytical Biochemistry*, Vol. 391, issue 1: 17-23.
- MELIN, J.; RUDSTRÖM, J.; PETERSON, C.; BAKKER, J.; MACCRAITH, B.; READ M.; ÖHMAN, O.; JÖNSSON, C.(2010). *A multiplexed point-of-care assay for C-reactive protein and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. Analytical Biochemistry*, 409: 7–13.
- MIRA, D.; LLORENTE, R.; MORAIS, S.; PUCHADES, R.; MAQUEIRA, A.; MARTÍ, J. (2004). *Proc. SPIE Int Soc. Opt. Eng.*, 5617: 364.
- MOHANTY, S.P.; KOUKIANOS, E. (2006). *Biosensors: A Tutorial Review. Potentials*, IEEE 25 (2): 35-40
- RAMACHANDRAN, S. (2006). Biomarkers of Cardiovascular Disease. Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation*, 113: 2335-2362.
- RONG, G.; NAJMAIE, A.; SIPE, J.E.; WEISS, S.M. (2008). *Nanoscale porous silicon waveguide for label-free DNA sensing. Biosensors and Bioelectronics* 23: 1572–1576
- SALDANA, A (2003). *Biosensors: Kinetics of Binding and Dissociation Using Fractals.* Ed. Elsevier Science: 4-11.
- SHRIVE, A. K.; CHEETHAM, G. M.; HOLDEN, D.; MYLES, D. A.; TURNELL, W. G.; VOLANAKIS, J. E.; PEPYS, M. B.; BLOOMER, A. C.; GREENHOUGH, T. J. (1996). *Three dimensional structure of human C-reactive protein. Nat. Struct. Biol.* 3: 346–354.
- THEÂVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G. (1999). *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Pure Appl. Chem.*, Vol. 71, No. 12: 2333-2348.
- THOMPSON, D.; PEPYS, M.B.; WOOD, S.P. (1999). *The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. Structure*, 7: 169-177.
- TOMIZAKI, K.Y.; USUI, K.; MIHARA, H. (2005). Protein-detecting *microarrays*: current accomplishments and requirements. *Chembiochem*, 6(5):782-99.
- VO-DINH, T.; CULLUM, B. (2000). *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. Fresenius J Anal Chem.* 366:540–551.
- WANG, T.; ZHANG, R.; XING, K.; GUO, Z.; NIE, L.; JIA, Y. (2010). *Effect of Surface Modification for Protein Microarray on Immobilizing Probe. Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 4th International Conference on: 1-4.*
- WOODWARD, I.; SCHOFIELD, W. C. E.; ROUCOULES, V. AND BADYAL, J. P. S. (2002). *Super-hydrophobic Surfaces Produced by PlasmaFluorination of Polybutadiene Films. Langmuir* 19: 3432-3438

- WU, J.; ZHIFENG, F.; YAN, F.; HUANGXIAN, J. (2007) *Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 7: 680 –688
- INNOVA BIOSCIENCES (2014). *Direct immunofluorescence*.  
<http://www.innovabiosciences.com/innova/direct-immunofluorescence.html>
- LIFE TECHNOLOGIES (2014). *ELISA Protocol (General guidelines)*.  
<http://www.lifetechnologies.com/be/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html>
- MEDICAL ELECTRONICS LABORATORY (2013). *Biosensor*.  
<http://melab.snu.ac.kr/melab/doku.php?id=research:research.in.melab:biosensor>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2013). *Enfermedades cardiovasculares, Nota descriptiva*.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- THERMO SCIENTIFIC. PIERCE PROTEIN BIOLOGY. (2014) *Avidin –Biotin Interaction*.  
<http://www.piercenet.com/method/avidin-biotin-interaction>