



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial

Tesis doctoral para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular

Elena de Juan Franco

Autora

Catedrático Jordi Ordóñez Llanos
Tutor

Prof. Laura M. Lechuga Gómez
Directora

Junio de 2013

Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2)
Consejo Superior de Investigaciones Científica (CSIC)

A mis padres

Índice

Motivación y Objetivos.....	5
Estructura.....	7
1. Introducción.....	11
1.1. Inmunoensayos	11
1.1.1. Tipos de Inmunoensayo	14
1.2. Biosensores	17
1.2.1. Tipos de Biosensores: según bioreceptor y según transductor.....	20
1.3. Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial	26
1.3.1. Selección del Bioreceptor	33
1.4. Métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies de Au	36
1.5. Referencias	46
2. Material y métodos.....	52
2.1. Descripción del biosensor de Resonancia de Plasmón Superficial.....	52
2.2. Reactivos e instrumentación.....	56
2.3. Hormonas y Anticuerpos	58
2.4. Procedimientos de inmovilización en flujo y ex-situ	59
2.5. Formatos de inmunoensayo	61
2.6. Referencias.....	63
3. Inmunoensayo para la detección de isoformas de la hormona de crecimiento humana y su aplicación en test anti-doping.....	65
3.1. Introducción.....	65
3.1.1. Hormona del crecimiento humana (hGH) y su uso como agente dopante	65
3.1.2. Métodos para la detección de dopaje con hGH recombinante.....	71

3.2. Esquema básico del ensayo de detección de las isoformas hGH 22K y hGH 20K	74
3.3. Inmovilización del anticuerpo anti-hGH (mAc hGH-12) mediante el sistema biotina/estreptavidina.....	75
3.3.1. Purificación y biotinilación del mAc hGH-12.....	76
3.3.2. Formación de la monocapa de estreptavidina	78
3.3.3. Inmovilización del mAc hGH-12 biotinado	80
3.4. Condiciones óptimas de inmovilización	81
3.4.1. Formación de la SAM	81
3.4.2. Comparación de la eficiencia de la monocapa de estreptavidina formada, con la de un chip comercial de estreptavidina	86
3.4.3. Selección del grado de biotinilación del mAc hGH-12.....	88
3.5. Evaluación de la eficiencia de la monocapa de mAc hGH-12	89
3.6. Inmunoensayo sándwich para la determinación de isoformas hGH 22 y 20K en suero	91
3.7. Conclusión.....	97
3.8. Referencias.....	98
4. Inmunoensayo SPR para el diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito (HC).....	103
4.1. Introducción.....	103
4.1.1. Hormona estimulante del tiroides (hTSH).....	103
4.1.2. Diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito Neonatal.....	104
4.2. Estrategias utilizadas para el desarrollo del inmunoensayo de detección de la hTSH	107
4.3. Inmovilización del anticuerpo anti-hTSH (mAc hTSH-2) mediante el sistema biotina/estreptavidina.....	107
4.4. Inmovilización del mAc hTSH-2 mediante la proteína G	110
4.4.1. Optimización de buffers de inmovilización.....	111
4.4.2. Formación de la SAM	111

4.5. Inmunoensayo para la determinación de hTSH mediante la inmovilización del mAc hTSH-2 vía biotina/estreptavidina	112
4.5.1. Condiciones óptimas para la inmovilización del mAc hTSH-2	112
4.5.2. Determinación de hTSH en suero	117
4.6. Inmunoensayo para la determinación de hTSH mediante la inmovilización del mAc hTSH vía proteína G	119
4.6.1. Condiciones óptimas para la inmovilización del mAc hTSH-2	119
4.6.2. Reutilización de la superficie de mAc hTSH-2	125
4.6.3. Inmunoensayo directo para determinación de hTSH	129
4.7. Conclusiones.....	130
4.8. Referencias	132
5. Inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR mediante el uso de la proteína de fusión <i>proteína A-dominio de unión al oro (PAG)</i> y su aplicación en la detección de hGH.....	134
5.1. Introducción	134
5.1.1. Descripción de la proteína de fusión PAG	134
5.1.2. Diagnóstico de enfermedades relacionadas con la alteración de la secreción de hGH.....	138
5.2. Evaluación de la funcionalidad del PAG mediante ELISA	141
5.3. Desarrollo de un método de inmovilización basado en el uso del PAG	142
5.4. Eficiencia del PAG en un inmunoensayo ELISA.....	144
5.5. Optimización del método de inmovilización con el sistema modelo BSA/anti-BSA	145
5.6. Inmunoensayo SPR basado en el uso del PAG para la detección de hGH...	150
5.7. Comparación del uso del PAG con métodos convencionales de inmovilización de anticuerpos	155
5.8. Conclusiones.....	157
5.9. Referencias	160

Conclusiones generales 163

Líneas de futuro..... 169

Publicaciones..... 171

Motivación y Objetivos

El desarrollo de dispositivos biosensores ha supuesto un importante avance tecnológico en el área de la medicina. En la sociedad en la que vivimos cada vez se hace más necesario el desarrollo de dispositivos de análisis que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, de fácil manejo y que requieran de pocos microlitros de muestra para determinar un parámetro concreto. El gran interés en la descentralización del diagnóstico clínico hacia diferentes lugares de atención médica, que permitan una monitorización más personalizada o incluso un autocontrol de los propios parámetros clínicos, ha promovido que el desarrollo de biosensores se encuentre en continua expansión. Puesto que una de las técnicas más utilizadas en la práctica clínica es el inmunoanálisis, los inmunosensores representan una herramienta de gran utilidad en este sector.

Dentro de este grupo, los inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) destacan por su simplicidad, sensibilidad y selectividad. La gran ventaja que presentan estos inmunosensores es que permiten una lectura directa y en tiempo real de la interacción analito-anticuerpo, sin la intervención de ninguna otra molécula y por tanto de otra fuente de variabilidad, lo que simplifica las medidas a la vez que reduce el tiempo de análisis y aumenta la fiabilidad del mismo en comparación con la mayoría de técnicas inmunológicas que requieren del uso de moléculas marcadoras. A pesar del potencial que presentan estos dispositivos para su aplicación en el diagnóstico clínico, no existen muchas aplicaciones que midan analitos de interés clínico en muestras reales a niveles de concentración adecuados y de forma rápida, con los mínimos pasos de pretratamiento o sin amplificación de la señal.

La biofuncionalización de la superficie sensora es un paso clave en el desarrollo de un inmunosensor, ya que la calidad de la superficie de inmuno-reconocimiento es decisiva en la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad del mismo. Uno de los mayores retos en la fabricación de estos dispositivos consiste en conseguir llevar a cabo una inmovilización del anticuerpo eficiente, de manera que una vez unido a la superficie sensora, este conserve su configuración funcional, y permita obtener un

inmunosensor de alto rendimiento. La propia estructura del anticuerpo limita considerablemente la metodología de inmovilización a emplear, puesto que parámetros como orientación y densidad de la molécula son de vital importancia para conseguir una inmunosuperficie eficiente. Es en esta línea de trabajo en la que se ha centrado esta tesis, cuyo objetivo ha sido el desarrollo de métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies sensoras de SPR con la finalidad de conseguir inmunosensores de alto rendimiento. Para llevar a cabo este trabajo se han escogido la hormona del crecimiento (hGH) y la hormona estimulante del tiroides (hTSH) debido a la relevancia que la detección de ambas presenta en las primeras etapas del desarrollo del ser humano, y en particular la hGH, por su importancia en el análisis anti-dopaje.

Los niveles de hGH en sangre son controlados durante el periodo de la infancia, ya que los desórdenes de esta hormona causan trastornos del crecimiento muy importante, como puede ser el caso del enanismo. Además los niveles de esta hormona son controlados periódicamente en el sector deportivo profesional, donde es consumida como droga para aumentar el rendimiento físico. Por su parte, el control de los niveles de hTSH se realiza desde el momento del nacimiento, puesto que la detección de esta hormona forma parte de los programas de cribado neonatal (*screening*). El diagnóstico precoz de enfermedades relacionadas con la alteración de la secreción de la hTSH es fundamental para la prevención de trastornos tan graves como el retraso mental. Debido a la baja concentración a la que se encuentran estas hormonas en suero (con niveles basales inferiores a 1,4 ng/mL), la optimización de los métodos de inmovilización utilizados se han centrado en maximizar la sensibilidad de los inmunoensayos. Para ello, se ha dedicado especial interés al control de la orientación del anticuerpo durante su inmovilización, debido al gran impacto que este parámetro tiene sobre la sensibilidad del inmunosensor y a la complejidad que este proceso representa. Considerando que la reutilización de los inmunosensores no presenta gran interés en la práctica clínica, debido a la posible retención de parte de las muestras y contaminación, y a la baja probabilidad de conservar por un periodo de tiempo significativo la funcionalidad de los anticuerpos inmovilizados, tras la regeneración de la superficie sensora, no ha sido objeto de este trabajo el estudio de la reutilización de los inmunosensores desarrollados.

Estructura

La estructura de esta Tesis sigue el esquema siguiente:

- Capítulo 1. Introducción: Este apartado comienza con una descripción general de las técnicas de inmunoensayo y de la molécula de anticuerpo. Posteriormente se comentan los tipos principales de biosensores con una descripción más detallada del sensor de Resonancia de Plasmón Superficial. Finalmente se incluye una visión general de los métodos de inmovilización descritos en la literatura.
- Capítulo 2. Materiales y métodos: Se lleva a cabo una descripción detallada del dispositivo sensor empleado así como de los reactivos y materiales empleados en el trabajo. Posteriormente se describe el protocolo de inmovilización común a varios de los métodos que se han desarrollado en este trabajo, así como los formatos de inmunoensayo empleados.
- Capítulo 3. Inmunoensayo para la detección de isoformas de la hormona de crecimiento humana y su aplicación en test anti-doping: En primer lugar se realiza un introducción donde se describe la hGH y su uso como agente dopante, así como los métodos actualmente empleados en la detección del dopaje con la misma. Posteriormente se describe el desarrollo del método empleado para la funcionalización de la superficie sensora con el anticuerpo empleado en este inmunoensayo y el diseño del mismo. A continuación se muestran los resultados del proceso de optimización de la inmovilización del anticuerpo y del inmunoensayo para la determinación de las isoformas de la hGH en suero.
- Capítulo 4. Inmunoensayo SPR para el diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito (HC): Este apartado comienza con una introducción donde se describe la hormona hTSH y la enfermedad del Hipotiroidismo Congénito Neonatal. A continuación se describe el desarrollo de los dos métodos empleados para la inmovilización del anticuerpo de la hTSH y finalmente se muestran los resultados de la proceso de

optimización de ambos métodos, así como del inmunoensayo llevado a cabo con cada uno de ellos.

- Capítulo 5. Inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR mediante el uso de la proteína de fusión proteína A-dominio de unión al oro (PAG) y su aplicación en la detección de hGH: Se realiza una introducción para conocer el origen de la molécula de PAG y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la alteración de los niveles de la hGH. Posteriormente se describe el desarrollo del método de inmovilización de anticuerpos basado en el uso del PAG, y a continuación los resultados de la optimización del método y del inmunoensayo llevado a cabo para la determinación de la hGH. Finalmente se compara este inmunoensayo con el realizado mediante el uso de métodos convencionales de inmovilización de anticuerpos.

Los capítulos 3, 4 y 5 finalizan con una breve exposición de las principales conclusiones alcanzadas y, al igual que los capítulos 1 y 2, con las referencias bibliográficas. Finalmente el trabajo de Tesis concluye con la exposición de las conclusiones generales, así como de las líneas de futuro que se abren a partir del mismo.

1. Introducción

1.1. Inmunoensayos

Los inmunoensayos o técnicas inmunoquímicas son métodos analíticos basados en la alta especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo para la detección y cuantificación de sustancias de interés, a los que se denomina analitos. Esta metodología, ampliamente utilizada tanto en análisis de rutina como en investigación científica se originó en 1959 con el ensayo inmunológico realizado por Rosalyn Yalow y Salomon Berson [1], que permitió detectar insulina humana a nivel de picogramos. A partir de entonces los inmunoensayos han representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en muy diversos campos, encontrando aplicación en el diagnóstico clínico, la industria alimentaria y en el estudio y control del medio ambiente entre otros.

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son proteínas globulares plasmáticas de elevado peso molecular (150 a 900 kDa) pertenecientes al grupo de las gammaglobulinas. Son sintetizadas en los vertebrados por los linfocitos B durante la respuesta inmunitaria, la cual tiene lugar cuando un agente extraño (virus, bacteria o proteína) al que se denomina antígeno (Ag) invade el organismo. Los anticuerpos son generados con una alta especificidad y afinidad para un antígeno determinado, más

concretamente para una zona de su estructura llamada determinante antigénico o epítopo. La unión entre antígeno y anticuerpo es una reacción no covalente, que se caracteriza por su alta especificidad, rapidez, espontaneidad y reversibilidad, en la que intervienen un conjunto de fuerzas que incluye interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Son las características que definen esta unión las que han hecho que los anticuerpos sean considerados como herramientas biológicas de gran utilidad para la detección y caracterización de una amplia variedad de moléculas y que su especificidad sea explotada de formas diferentes en los inmunoensayos.

Como se muestra en la Figura 1.1 la estructura de la molécula de anticuerpo presenta forma de Y, y está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada molécula de anticuerpo contiene dos copias idénticas de una cadena pesada o cadena H (heavy), y dos copias idénticas de una cadena ligera o cadena L (light), llamadas así por sus pesos moleculares que son aproximadamente de 50-70 kDa la cadena pesada y 22 kDa la cadena ligera. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros intercatenarios. Cada una de ellas presenta en su estructura un dominio constante que corresponde al extremo carboxílico (C_H y C_L), y un dominio variable que corresponde al extremo amínico (V_H y V_L). En uno de los procedimientos empleados en el estudio de las inmunoglobulinas se produce una ruptura específica de la molécula, lo que genera tres fragmentos, dos de ellos forman el sitio de unión al antígeno y cada uno recibe el nombre de Fab (Fragmentos de unión al antígeno), y el tercero corresponde a la región del anticuerpo que no presenta actividad de unión al antígeno, y se denomina Fragmento cristizable o Fc. En las cadenas H, entre las regiones Fab y Fc, el anticuerpo presenta una zona de aproximadamente 15 aminoácidos denominada región bisagra, que debido a su estructura posee la característica de ser muy flexible permitiendo tener distintos ángulos entre ambas regiones, facilitando así el acoplamiento del anticuerpo al antígeno. En la región Fab se localiza la parte variable del anticuerpo que viene definida por el tipo de antígeno que determina la especificidad del primero. La región Fc se corresponde con la mayor parte del dominio constante de las dos cadenas pesadas de la molécula (C_H), y constituye el sitio de unión del anticuerpo a otras proteínas o receptores celulares durante la respuesta inmunitaria. Esta región determina la existencia de cinco tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, siendo idéntica dentro de un mismo tipo de

Ig. A su vez, cada tipo de inmunoglobulina se diferencia en distintos subtipos que difieren en el número de puentes disulfuro y la longitud de la región “bisagra”. Por otro lado la molécula de anticuerpo puede contener radicales glucídicos en su región Fc, cuya abundancia (hasta un 14 % de su peso) depende del proceso de glicosilación que tenga lugar durante la síntesis del mismo. El componente glucídico de los anticuerpos facilita la determinación del destino de estos en los tejidos y les confiere resistencia a la acción de proteasas.

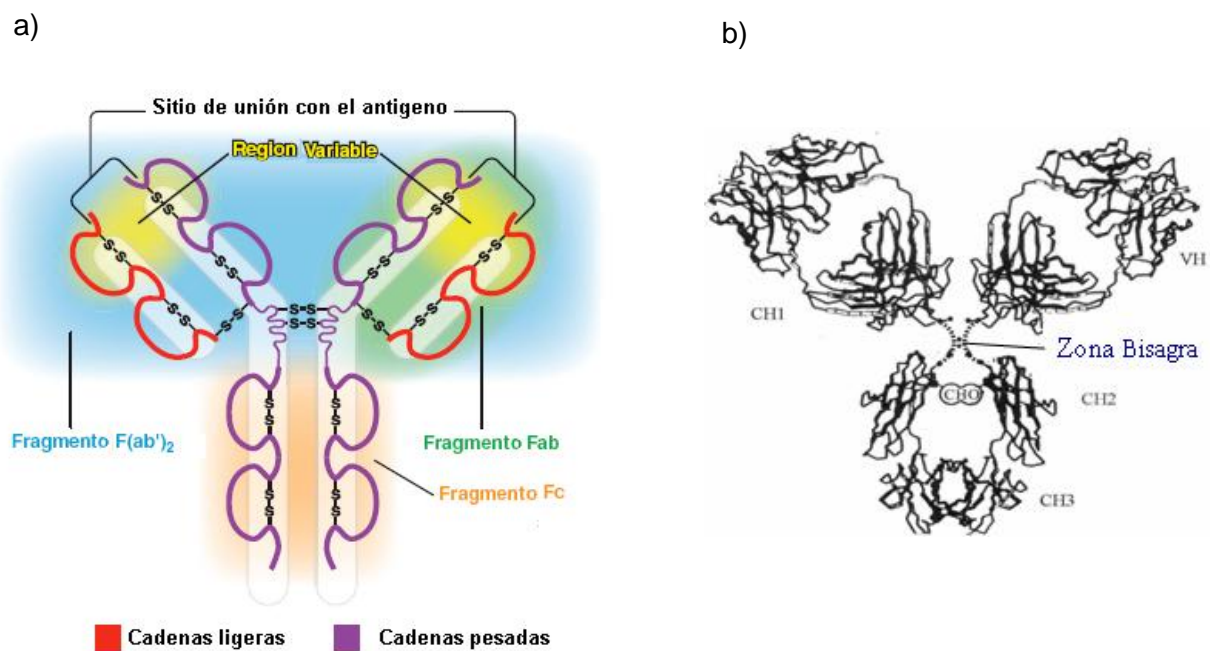


Figura 1.1. A) Estructura básica de un anticuerpo. B) Modelo de IgG mediante cristalografía por difracción de rayos X.

La inmunoglobulina G, con una masa molecular de 150.000 Da, es la Ig predominante en suero de mamíferos (80% del total), y la más utilizada en el análisis inmunoquímico. Es el único anticuerpo que atraviesa la placenta por lo que es responsable de la inmunidad fetal y la del recién nacido. Existen cuatro subclases de esta inmunoglobulina, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cuya proporción respecto del total de la IgG sérica es 70, 20, 8 y 2%, respectivamente. Debido a su relativa abundancia y excelente especificidad hacia su antígeno, la IgG es el principal anticuerpo

usado en investigación y diagnóstico. Dependiendo del proceso de producción y purificación de anticuerpos para su uso como reactivos en inmunoensayos, estos se obtienen en dos formas básicas, policlonal o monoclonal. Los anticuerpos policlonales (pAc) son obtenidos a partir del suero de animales inmunizados y comprenden una mezcla heterogénea de anticuerpos que reconocen diferentes regiones del antígeno, mientras que los monoclonales (mAc) son moléculas idénticas y poseen la misma especificidad al ser producidos mediante cultivos celulares a partir de una única célula (clon) de hibridoma, formada por la fusión de un linfocito B con una célula tumoral. Así pues, los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor especificidad que los monoclonales, los cuales reconocen un único epítipo. El ser menos específicos hace a los anticuerpo policlonales más tolerantes a pequeños cambios en la naturaleza del antígeno, por lo que son más adecuados para la detección de proteínas desnaturalizadas. También son la opción preferida cuando la naturaleza del antígeno en una especie no se conoce. Por el contrario, debido a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son excelentes como anticuerpos primarios en un ensayo, o para detectar antígenos en un tejido. Cuando se compara con los anticuerpos policlonales, la homogeneidad de los monoclonales es muy alta. Si las condiciones experimentales se mantienen constantes, los resultados provenientes de anticuerpos monoclonales son altamente reproducibles entre experimentos. La especificidad de estos anticuerpos los hace extremadamente eficientes para la unión al antígeno dentro de una mezcla de moléculas relacionadas. La elección de uno u otro tipo de anticuerpo depende de la aplicación que tenga el inmunoensayo en el que se va a utilizar.

1.1.1. Tipos de Inmunoensayo

Existen muchos tipos de inmunoensayos por lo que su clasificación resulta bastante compleja debido a la gran variedad de criterios que se pueden emplear. De forma general los inmunoensayos se clasifican en función de si hay necesidad de separar el analito libre del inmunocomplejo formado, previamente a la determinación de este para evitar interferencias. Si esta separación es necesaria el inmunonesayo se denomina *heterogéneo* mientras que si la determinación del inmunocomplejo se lleva a cabo en la

propia mezcla de la reacción se trata de un *inmunoensayo homogéneo*. Todos los inmunoensayos convencionales exceptuando las técnicas de aglutinación y precipitación, muy comunes entre los métodos automatizados utilizados en clínica, en las que la formación de complejos Ag-Ac dan lugar a agregados perceptibles visualmente, requieren el uso de una molécula marcadora para el revelado del resultado, sin la cual no sería posible la detección de la inmunoreacción. En función del tipo de marcador utilizado existen *inmunoensayos radiológicos, de fluorescencia, de quimioluminiscencia o enzimáticos*. Estos marcadores también se pueden combinar en un mismo inmunoensayo, como en el caso en el que se utilice un compuesto luminiscente como sustrato de la enzima marcadora. Según el formato o diseño del ensayo, este puede ser *competitivo o no competitivo*. En el formato *competitivo* se utiliza una concentración limitante de anticuerpo y una molécula de estructura análoga al analito a detectar de forma que ambos compiten por los sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Según el desarrollo del formato competitivo, los inmunoensayos pueden ser *directos* (Figura 1.2.a) cuando se utiliza la molécula análoga marcada, y esta y el analito compiten por unirse al anticuerpo que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido, o *indirectos* (Figura 1.2.b), cuando se utiliza el anticuerpo marcado y la molécula análoga al analito se encuentra inmovilizada, y se añade a la disolución el analito y el anticuerpo. La señal obtenida en ambos casos es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. Los *inmunoensayos no competitivos* son aquellos que utilizan concentraciones en exceso de los reactivos. En ellos el analito se une a un anticuerpo no marcado que se encuentra inmovilizado y posteriormente es detectado mediante la unión al mismo de otro anticuerpo que si está marcado (Figura 1.2.c), por lo que la señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de analito. En esta interacción tipo *sándwich* es esencial que el analito a detectar presente al menos dos epítomos distintos, y el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos para cada uno.

La terminología utilizada para definir el inmunoensayo en función del marcador utilizado varía según el tipo de formato. Los ensayos *competitivos* se denominan radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), fluoroinmunoensayo (FIA) o quimioluminoinmunoensayo (CLIA) en función de que se utilice un marcador

radioactivo, enzimático, fluorescente o luminiscente respectivamente, y los *no competitivos* reciben el nombre de ensayo inmunorradiométrico (IRMA), inmunoenzimométrico (EIMA), inmunofluorométrico (IFMA) o inmunoquimioluminométrico (ICMA), en cada caso.

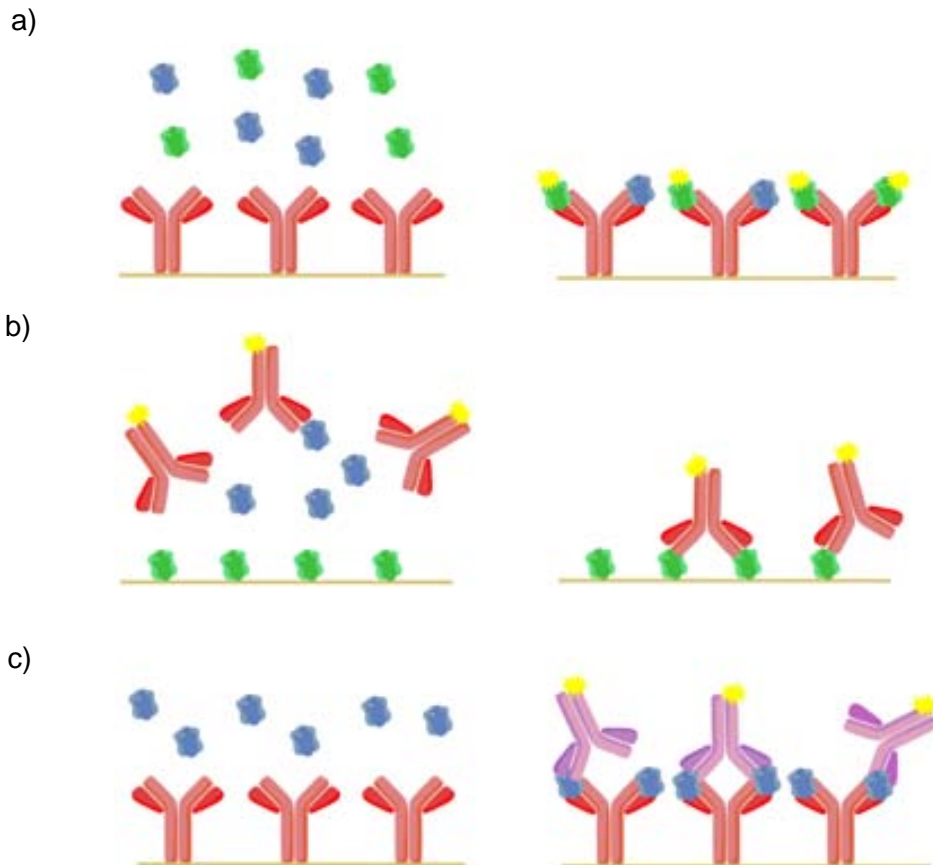


Figura 1.2. Principales formatos de inmunoensayo: A) Inmunoensayo competitivo directo. B) Inmunoensayo competitivo indirecto. C) Inmunoensayo no competitivo o tipo sándwich.

En su inmunoensayo pionero Yalow y Berson utilizaron radioisótopos como marcadores para la detección de insulina, por lo que la técnica RIA es la precursora de las técnicas de inmunoensayo actuales. Esta técnica analítica mostró mayor precisión, sensibilidad y simplicidad que cualquiera de las técnicas convencionales existentes en esos años. A pesar de la peligrosidad del uso de materiales radioactivos, que exigía un equipamiento adecuado, fue el éxito de la técnica del radioinmunoensayo lo que motivó

el planteamiento de que la reacción Ag-Ac pudiera ser utilizada como base para el desarrollo de nuevos métodos analíticos. La búsqueda de otras alternativas más simples y prácticas, seguras para el medio ambiente y que no perjudicaran la salud, culminó cuando se demostró que tanto los anticuerpos como los antígenos podían ser acoplados a enzimas [2] e inmovilizados sobre soportes sólidos [3], dando lugar al desarrollo de la técnica inmunoenzimática conocida como ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Desde entonces, esta técnica ha sido ampliamente desarrollada, por lo que hoy día existe una gran variedad de ensayos tipo ELISA, ocupando una posición dominante entre los inmunoensayos que se practican. Por otro lado en los inmunoanálisis automatizados realizados en los laboratorios clínicos se ha generalizado el uso de marcadores quimioluminiscentes, que proporcionan el método de lectura con mayor sensibilidad en la actualidad, permitiendo detectar concentraciones del orden de 1 pg/mL. Los autoanalizadores basados en enzimo-inmunoensayos quimioluminiscentes son uno de los más utilizados (uno de los más conocidos es el modelo Immulite comercializado por Siemens) [4].

La necesidad de llevar a cabo determinaciones analíticas de manera rápida con dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea bajo, ha dado lugar al desarrollo de biosensores como metodología alternativa a los sistemas de inmunoanálisis clásicos. Desde su aparición, la tecnología biosensora ha encontrado una de sus mayores aplicaciones en el inmunoanálisis, de manera que en la actualidad los inmunosensores representan una herramienta muy valiosa en diversos campos.

1.2. Biosensores

Un biosensor se define como un dispositivo analítico de pequeño tamaño formado por un sistema biológico de reconocimiento específico inmovilizado, conocido como bioreceptor (anticuerpos, enzimas, células, DNA, etc.), en contacto con un sistema transductor (óptico, electroquímico, mecánico, etc.) que convierte la interacción del elemento biológico en una señal cuantificable [5]. La íntima unión entre el elemento biológico de reconocimiento (bioreceptor), y el transductor, confiere al biosensor una

gran sensibilidad y selectividad, lo que junto con su capacidad de automatización, la rapidez de su respuesta, facilidad de uso y bajo coste, confieren a esta tecnología ventajas obvias frente a los sistemas analíticos convencionales [6]. En la Figura 1.3 se muestra un esquema general del funcionamiento de un biosensor. Como resultado de la interacción específica entre el analito y el bioreceptor se produce una variación de las propiedades físico-químicas en la interfase entre el bioreceptor y el transductor, cuya señal se cuantifica mediante un sistema electrónico de adquisición, amplificación y procesado de datos.

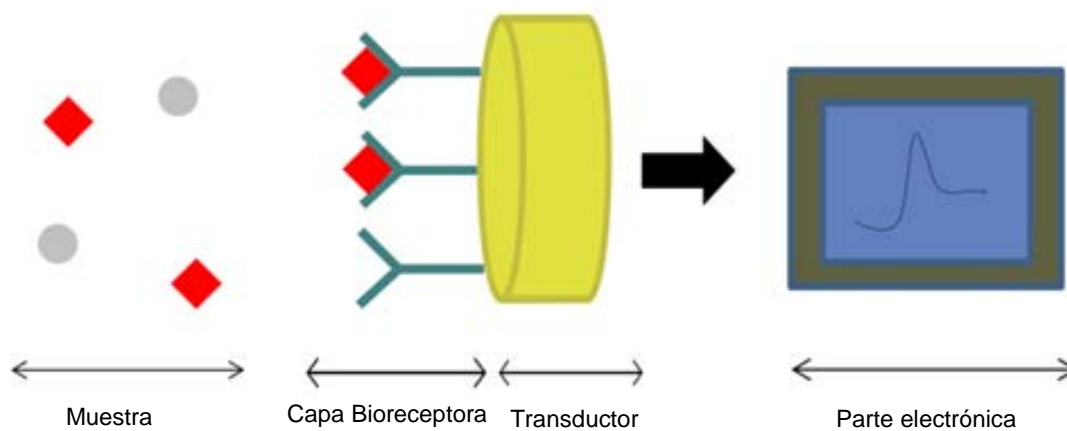


Figura 1.3. Esquema general de un sistema biosensor.

La historia de los biosensores se remonta al año 1962 con la invención de Clark y Lyon del primer sensor enzimático utilizado para la determinación de glucosa en sangre [7]. Este dispositivo consiste en una enzima glucosa oxidasa (encargada de catalizar la reacción de oxidación de la glucosa) acoplada a un electrodo de oxígeno, el cual detecta la disminución de la concentración de este gas en la muestra como resultado de la actividad de la enzima. La comercialización de este biosensor fue realizada por Yellow Springs Company a partir del año 1975, lo que supuso un gran impacto en el campo de la endocrinología permitiendo a los pacientes diabéticos controlar ellos mismos sus niveles de glucosa en sangre, tal y como se sigue haciendo hoy en día. A partir de entonces la innovación en este campo ha sido constante, avanzándose en la investigación hacia instrumentos más sofisticados, específicos y sensibles [8]. Uno de los grandes avances en el desarrollo de los biosensores y que los ha hecho tan atractivos, ha

sido el paso de la detección del analito mediante una medida puntual, como el caso del biosensor de glucosa, a dispositivos capaces de monitorizar un analito en tiempo real y de forma directa (sin necesidad de un marcador), lo que los diferencia de cualquier análisis biológico o clínico convencional que requiere siempre un marcador. Además de simplificar el método de análisis, la medida en tiempo real confiere a los biosensores la posibilidad de realizar, no sólo un análisis cualitativo y cuantitativo, sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción y por tanto elucidar los mecanismos fundamentales de la misma [9]. Por otro lado, el avance de la nanotecnología ha permitido la miniaturización de los biosensores lo que ha supuesto otro paso fundamental en su desarrollo, favoreciendo no solo la portabilidad de los dispositivos, sino también la posibilidad de utilizar cantidades de muestra cada vez menores, y de abrir una nueva línea de desarrollo cuya finalidad es la fabricación de sistemas “lab-on-a-chip”, donde todos los componentes del biosensor se integrarían en un mismo chip [10].

La biotecnología ha hecho posible obtener receptores biológicos de muchos tipos, lo que ha permitido que la utilización de los biosensores se extienda a un elevado número de sectores, como el medioambiental, agroalimentario, farmacéutico o incluso militar (en la detección de agentes bioterroristas), aunque sin duda, el más beneficiado es el sector de la medicina. La rapidez en el análisis, los reducidos volúmenes de muestra, el alto grado de automatización y su carácter portátil y desechable, ha hecho de muchos biosensores indispensables en distintos lugares de atención médica, permitiendo disponer de pruebas de atención al paciente en el mismo momento del diagnóstico (POCT: point-of-care testing) [11].

La monitorización del paciente fuera de las horas de las visitas médicas puede mejorar la eficacia del diagnóstico y seguimiento de numerosas enfermedades además de la diabetes. Existe una gran cantidad de biomarcadores que necesitan ser controlados en muchas situaciones, tales como la proteína C reactiva (PCR), el colesterol o los marcadores tumorales Antígeno Prostático Específico (PSA) y Antígeno de Cáncer (CA) 15-3.

En la fabricación de biosensores se han de considerar diferentes aspectos que incluyen no solo los referidos a la elección del transductor y el bioreceptor, sino también

al diseño de sistemas de fluídica, la química de inmovilización de biomoléculas en la superficie del sensor, el diseño de los ensayos y el análisis de los datos. Sin embargo, puesto que la selectividad del biosensor la determina el bioreceptor y la sensibilidad del mismo depende principalmente del transductor, la adecuada selección de ambos elementos es la tarea más importante para el éxito del desarrollo del dispositivo. La elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción con el analito, las cuales deben ser aprovechadas óptimamente por el transductor.

1.2.1. Tipos de Biosensores: según bioreceptor y según transductor

Son múltiples los elementos de reconocimiento biológico y sistemas de transducción utilizados en el desarrollo de biosensores, así como las posibles combinaciones de ambos elementos y aplicaciones en las que pueden emplearse los distintos biosensores. Esta gran diversidad hace difícil el establecimiento de un criterio único para la clasificación de los mismos. Sin embargo, es bastante común que esta se realice en función de la naturaleza del proceso biológico que tenga lugar entre el bioreceptor y el analito, y del mecanismo de transducción utilizado. Atendiendo al primer criterio de clasificación, pueden distinguirse dos grandes grupos:

- *Biosensores catalíticos*: Este tipo de biosensor es el más conocido y el más aplicado. Se caracteriza porque presenta como elemento de reconocimiento un biocatalizador que utiliza el analito como sustrato, de forma que tras la unión al mismo se produce una modificación química del analito que hace posible su detección mediante la medida de la desaparición de algún co-sustrato, de la aparición de algún producto o de los cambios físico-químicos que tengan lugar durante el proceso catalítico (Figura 1.4.a). En la reacción no se consume biocatalizador ni resulta modificado, por lo que puede ser utilizado de nuevo. Los bioreceptores que se emplean son células, secciones de tejidos o enzimas, aunque estos últimos son con diferencia los más utilizados, hasta el punto que se utiliza

genéricamente el término catalítico para denominar a los *biosensores enzimáticos* [12]. La estabilidad frente a las condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica, así como el requerimiento en cofactores para la reacción que cataliza, son determinantes a la hora de escoger el tipo enzima adecuado. La mayoría de los biosensores enzimáticos disponibles comercialmente utilizan como elemento de reconocimiento enzimas oxidorreductasas, que catalizan la transferencia de electrones entre moléculas, debido a su elevada estabilidad.

- *Biosensores de afinidad*: Este tipo de sensores se basan en la interacción altamente específica del analito con el elemento de reconocimiento sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-bioreceptor. La formación del mismo tiene lugar con un alto nivel de selectividad, mediante un ajuste conformacional perfecto entre ambas moléculas. Debido a que en estos biosensores no se consume ni se forman nuevas moléculas, los mecanismos de transducción utilizados se basan únicamente en los cambios físico-químicos generados por la unión analito-bioreceptor, como el aumento de masa, modificación de las propiedades ópticas del sustrato (interfase bioreceptor-transductor), o la producción de señales eléctricas asociadas a dicho acoplamiento. Los principales tipos de biosensores de afinidad son los *inmunosensores* (Figura 1.4.b), donde se utilizan los principios de los inmunoensayos para la detección del analito [13], y los biosensores de ADN (Figura 1.4.c), utilizados para detectar secuencias de ADN, donde el elemento bioreceptor son cadenas de oligonucleótidos sintéticas que hibridan por complementariedad con la secuencia a analizar [14].

Uno de los mayores retos que deben superar este tipo de biosensores es el de garantizar la especificidad en la detección del analito minimizando las uniones no específicas. La afinidad de la interacción también determina la reversibilidad de la reacción y debe asegurarse que para la disociación del complejo analito-bioreceptor se utilicen agentes de regeneración que no alteren la estructura de la molécula utilizada como elemento de reconocimiento.

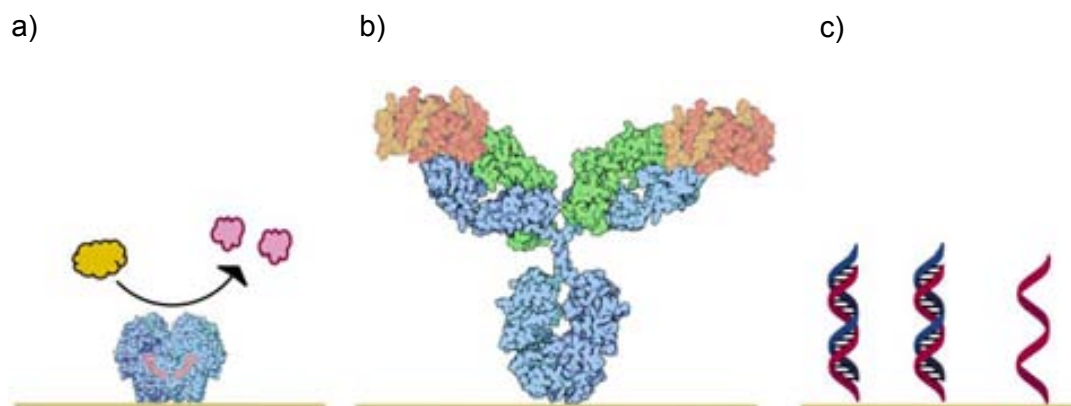


Figura 1.4. Principales tipos de biosensores en función del bioreceptor empleado: A) Biosensor enzimático. B) Inmunosensor. C) Biosensor de ADN.

En función del tipo de transductor utilizado, los biosensores se clasifican en:

- *Biosensores electroquímicos*: En estos biosensores el mecanismo de transducción ligado al evento de reconocimiento molecular se basa en el proceso de catálisis, principalmente enzimático, en el que las especies electroquímicas como electrones, iones o compuestos con estados de oxidación variable son consumidos o generados. El cambio electroquímico registrado es proporcional a la concentración del analito que se desea detectar. Son los sensores más desarrollados hasta el momento debido a que son simples de fabricar y usar, rápidos y fiables [15]. Los biosensores electroquímicos pueden ser conductimétricos, que determinan cambios en la conductancia asociados con cambios en el contenido iónico de la solución de medida [16], potenciométricos, que miden la diferencia de potencial generada por la reacción electroquímica entre el analito y el elemento de reconocimiento manteniendo la corriente constante y utilizando electrodos selectivos para ciertos iones, e impedimétricos y amperométricos, que determinan corrientes eléctricas asociadas a reacciones de óxido-reducción [17]. Los electrodos amperométricos van asociados generalmente a las enzimas oxidoreductasas y en ellos se determina el flujo de electrones redox que se producen en las reacciones catalizadas por dichas enzimas. Los biosensores amperométricos son los más desarrollados y comercializados, siendo el biosensor de glucosa (Figura 1.5) el máximo exponente de esta tecnología. Por último, las propiedades químicas y eléctricas de los

nanotubos de carbonos, caracterizados por su gran complejidad electrónica, los hacen excelentes candidatos como transductores electroquímicos y son utilizados en el desarrollo de biosensores con distintas aplicaciones.

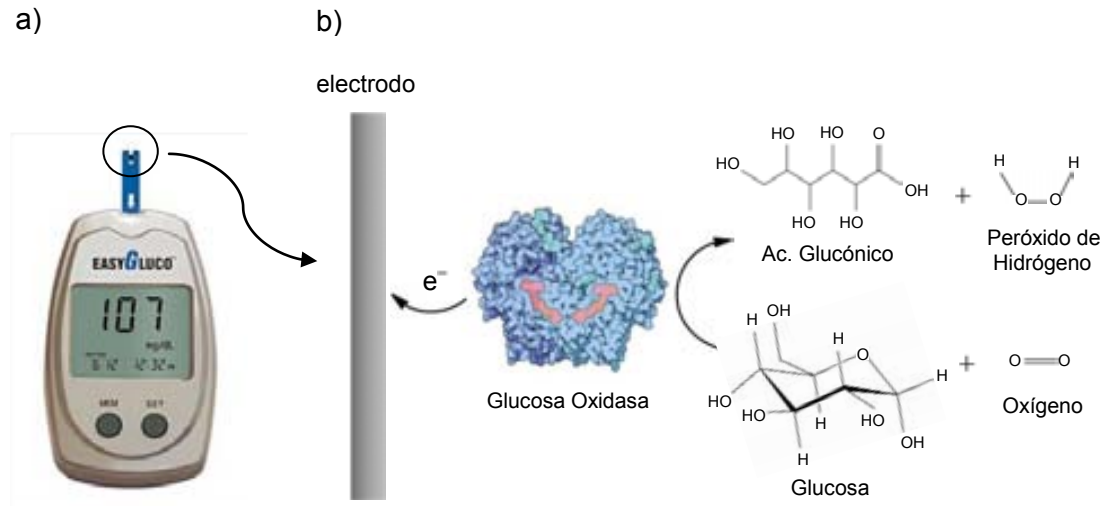


Figura 1.5. Sensor de Glucosa. A) Dispositivo comercializado por U.S. Diagnostics y (b) esquema del principio de detección del biosensor.

- Biosensores Micro/nanomecánicos:*** Emplean micropalanca semejantes a las del microscopio de fuerzas atómicas (AFM), sobre cuya superficie se inmoviliza el bioreceptor. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión y/o de la frecuencia de resonancia de la micropalanca [18]. La detección de la respuesta nanomecánica puede realizarse en modo estático o en modo dinámico. En el modo estático la magnitud que se mide es la deflexión de la micropalanca que tiene lugar como consecuencia del cambio de tensión superficial producido por la unión del analito con el elemento de reconocimiento inmovilizado sobre un lado de la micropalanca (Figura 1.6). En el modo dinámico lo que se mide es la frecuencia de resonancia, que depende tanto de la tensión superficial como del cambio de masa. Las características de la detección favorecen la determinación directa del analito ya que no es necesario el marcaje de las moléculas. Este hecho también determina que en estos biosensores la detección del analito se lleve a cabo mediante un tipo de

interacción biológica de afinidad, utilizándose generalmente como bioreceptores anticuerpos o ADN.

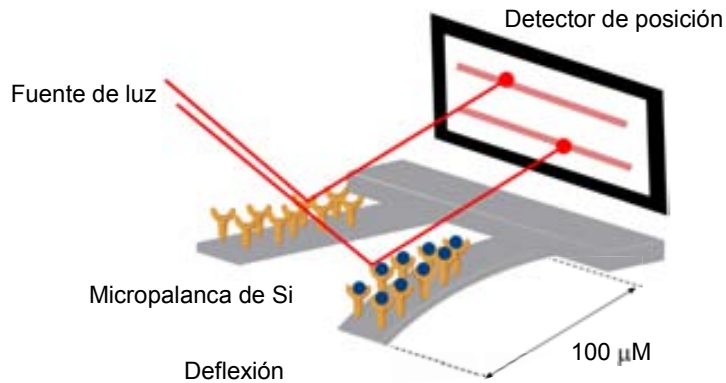


Figura 1.6. Representación esquemática del principio de detección de los biosensores mecánicos basados en la deflexión de una micropalanca de Si.

- *Biosensores Ópticos:* Se utilizan transductores ópticos donde se mide las variaciones que se producen en las propiedades de la luz cuando tienen lugar una reacción de reconocimiento molecular sobre la superficie del transductor [19]. El sistema básico de medida consiste en una fuente de luz, un transductor y el detector, y pueden utilizarse tanto bioreceptores catalíticos como de bioafinidad. Este tipo de biosensores presenta indudables ventajas con respecto a los electroquímicos como por ejemplo un mayor nivel de sensibilidad, el no ser necesarios electrodos de referencia, la inmunidad ante interferencias eléctricas, su menor tamaño y mayor versatilidad. Por estas razones, su uso se ha extendido en los últimos años, siendo en la actualidad los dispositivos biosensores más utilizados en la determinación de interacciones inmunológicas o de hibridación de secuencias de oligonucleótidos. Los biosensores ópticos pueden dividirse en dos grandes grupos:
 - *Bio-optropos.* En este grupo de biosensores se utiliza una guía de ondas (generalmente una fibra óptica) para conducir la luz al área sensora y esta es posteriormente recogida a su salida, tras interactuar con el complejo analito-bioreceptor [20]. Este último se localiza en la salida de la fibra, con lo que su unión al analito produce un cambio cuantificable en las propiedades ópticas del transductor (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o

dispersión). En este tipo de dispositivos, es necesaria la utilización de marcadores ópticamente activos como colorantes sensibles al pH o a la concentración de oxígeno, moléculas fluorescentes, moléculas bio- o quimio-luminiscentes.

- *Basados en campo evanescente*: Estos biosensores hacen uso de la forma particular en que las ondas electromagnéticas se pueden confinar en determinados medios, dieléctricos o metálicos. En este tipo de biosensores la propiedad óptica más utilizada para detectar interacciones moleculares es el índice de refracción. En este grupo se incluyen los biosensores ópticos más numerosos, los cuales comparten dos características: la utilización de algún tipo de modo electromagnético guiado y el principio de detección de campo evanescente. Existen dos modos de guiar y confinar las ondas electromagnéticas: i) mediante guías de onda convencionales, como es el caso de los interferómetros Mach-Zehnder (MZI) [21] ó ii) en la intercara de un dieléctrico y un metal, como es el caso de los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) [22]. En ambos casos la luz se transmite por múltiples reflexiones internas a lo largo de la guía, que consiste en una capa de alto índice de refracción situada entre dos capas de materiales de menor índice de refracción. Aunque esta transmisión tiene lugar en condiciones de reflexión interna total (TIR), parte del campo electromagnético confinado en la guía se propaga en el medio que envuelve a la misma dando lugar a lo que se denomina onda evanescente. La longitud de penetración de la onda evanescente está comprendida entre 50-500 nm y ofrece una oportunidad única e ideal para medir cualquier reacción bioquímica que tenga lugar en su interior. Si se inmoviliza un receptor biológico sobre la guía de ondas y se expone esta superficie a una solución con el analito, la interacción biológica que tenga lugar modificará las propiedades ópticas de la luz (absorción, dispersión, índice de refracción, etc.), que serán detectadas por la onda evanescente (Figura 1.7). La intensidad de la onda evanescente es máxima en la intercara entre el núcleo de la guía y el medio adyacente, y decae exponencialmente con la distancia a la misma, por lo que la sensibilidad del sensor es máxima donde se inmoviliza el bioreceptor. Esta propiedad hace posible que sólo se puedan detectar cambios que se

produzcan en la superficie de la guía, por lo que la interferencia de otras sustancias de la disolución es mínima. Esto hace que este tipo de dispositivos sean ideales para la detección de analitos mediante métodos de afinidad, ya que en ellos se minimiza la interferencia de otras sustancias presentes en la muestra, sin que además sea necesaria la utilización de ningún tipo de marcador molecular [22]. Por ello, en las últimas dos décadas, los biosensores ópticos de campo evanescente se han convertido en herramientas indispensables para el análisis e identificación (en tiempo real y con un alto grado de sensibilidad y selectividad) de especies químicas o biológicas. El SPR es el biosensor óptico más conocido y utilizado debido fundamentalmente a su mejor combinación entre simplicidad y sensibilidad. El trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral se ha basado en la biofuncionalización de este último tipo de biosensor con anticuerpos, para su uso como inmunosensor en distintas aplicaciones, por lo que en el siguiente apartado se describirá en detalle el funcionamiento del dispositivo.

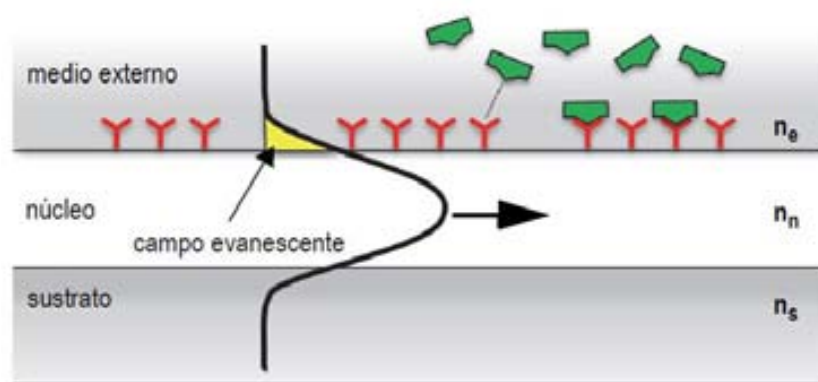


Figura 1.7. Representación del mecanismo de detección del biosensor óptico de onda evanescente.

1.3. Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial

Los biosensores SPR, basados en el principio de resonancia de plasmón superficial, están especialmente diseñados para la monitorización de interacciones biomoleculares y para la detección selectiva y cuantitativa de sustancias químicas y biológicas de forma directa, sin necesidad de marcadores. Así pues, estos sistemas de

análisis proporcionan información tanto de la especificidad, cinética y afinidad de la interacción molecular, como de la concentración del analito de interés. La posibilidad de detección en tiempo real y sin marcaje junto con la gran versatilidad de los biosensores SPR, que pueden ser aplicados para el estudio de infinidad de tipo de uniones (incluyendo las conocidas Ag-Ac y DNA-DNA) ofrecen grandes ventajas sobre los métodos de análisis convencionales.

El fenómeno de la resonancia de plasmón superficial (SPR) fue descrito por primera vez por Otto [23] y Kretschmann en 1968 [24], sin embargo, su aplicación en el campo de los biosensores no se demostró hasta 1983, por Liedberg [25]. Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción de un metal que pueden excitarse cuando el metal se encuentra en contacto con un medio dieléctrico y se hace incidir sobre la superficie del metal un rayo de luz polarizada [26]. Esta excitación óptica de los plasmones superficiales conocida como resonancia de plasmón superficial, solo se produce en un ángulo de incidencia de luz determinado, denominado ángulo de resonancia, en el que la intensidad de la luz reflejada disminuye hasta un mínimo, que se representa mediante una curva, denominada curva de resonancia, que relaciona el ángulo de resonancia con respecto a la reflectancia. Cuando se alcanza la condición de resonancia se produce el acoplamiento entre el vector de onda de luz incidente (k_p) y el vector de onda de plasmón superficial (k_{sp}). En esta situación la componente paralela a la superficie del vector de ondas de luz incidente (k_{px}) es igual al vector de onda de plasmón superficial y su fórmula será:

$$k_p = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin\theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

donde ω es la frecuencia angular, c es la velocidad de la luz en el vacío, θ es el ángulo de incidencia, λ es la longitud de onda, ϵ_m es la permitividad (constante dieléctrica) del metal y ϵ_d es la permitividad del dieléctrico. De esta ecuación puede deducirse que para que se produzca la propagación de la resonancia de plasmón superficial las permitividades ϵ_m y ϵ_d han de tener signos opuestos y $\epsilon_m < -\epsilon_d$. Esta condición sólo se cumple al utilizar metales como el oro, la plata y el aluminio y frecuencias de la

radiación incidente en la zona entre el visible y el infrarrojo. El grosor de la capa de metal es crítico para el valor del mínimo de reflectancia y depende de las constantes ópticas del medio y de la longitud de onda de la luz incidente [26]. Para el oro, el grosor óptimo es 45 nm a una longitud de onda de 790 nm.

Existen varias formas de excitación del plasmón superficial para conseguir la condición de resonancia, entre las que se incluye el uso de prismas de acoplamiento, guías de ondas o redes de difracción. La utilización de prismas de acoplamiento, conocida como configuración de Kretschmann [24], constituye el método más estandarizado para la excitación óptica debido a su simplicidad. En esta configuración la superficie transductora está formada por una fina capa de oro de alrededor de 45 nm de espesor depositada mediante evaporación del metal sobre la cara plana de un prisma de cristal, o bien sobre un portaobjetos de vidrio ópticamente acoplado al prisma a través de un aceite con el mismo índice de refracción que el del primero. Este aceite se utiliza para igualar el índice de refracción en la interfase que se forma entre el prisma y la lámina de vidrio con el oro depositado. Al incidir sobre la capa metálica, a través del prisma, un haz de luz de una longitud de onda apropiada, parte de la luz se refleja y parte se propaga por el metal produciendo una onda o campo evanescente que excita los plasmones de la superficie de oro (Figura 1.8). El ángulo de resonancia es fuertemente dependiente del índice de refracción del medio dieléctrico localizado en la región del campo evanescente. El uso del fenómeno SPR con fines analíticos se debe a la posibilidad de inmovilizar un elemento de reconocimiento adecuado sobre la superficie de oro, ya que la interacción del bioreceptor inmovilizado y un determinado analito da lugar a un cambio en el índice de refracción del medio que produce un desplazamiento de la posición angular a la que tiene lugar el fenómeno de resonancia (cambio del ángulo de resonancia), o lo que es lo mismo, un desplazamiento de la curva de resonancia.

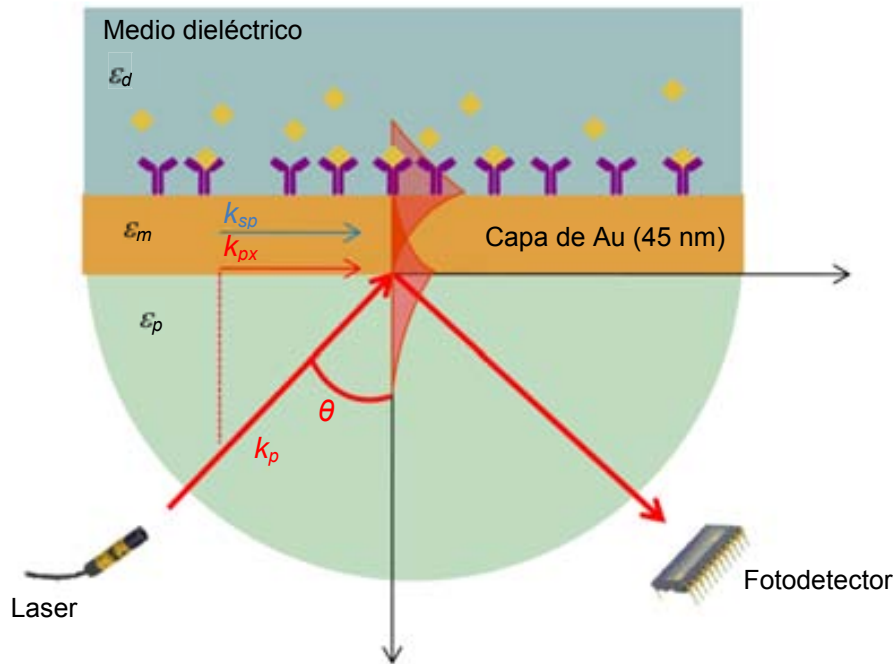


Figura 1.8. Modo de operación de un inmunosensor SPR basado en la configuración de Kretschmann.

La configuración de Kretschmann permite utilizar dos modos de medida, siguiendo la variación del ángulo de acoplamiento al que tiene lugar la resonancia, o la variación de la intensidad de luz reflejada a un ángulo fijo (Figura 1.9). Para medir en el primer modo es necesario que la muestra y el detector se encuentren fijos en una plataforma rotatoria y la condición de resonancia se observa como un mínimo agudo en la reflectancia de la luz cuando el ángulo de incidencia varía. Durante una interacción biomolecular se produce un cambio en la curva de resonancia que se puede relacionar cuantitativamente con el analito que se ha detectado. En este método es necesario registrar las curvas de resonancia completas por lo que la información sobre el evento bioquímico se obtiene una vez que este ya ha tenido lugar. A diferencia de este método de medida, el segundo modo de medida permite detectar las interacciones moleculares en el mismo instante en que se están produciendo. Esto es posible porque se registra de forma continua la luz reflejada a ángulo fijo. El ángulo de trabajo se selecciona a media distancia del mínimo de reflectancia, que es la zona de mayor pendiente de la curva de resonancia, y por tanto la que proporciona una mayor sensibilidad. Cuando la molécula

de analito se une al elemento de reconocimiento inmovilizado en la superficie sensora se produce un cambio en el índice de refracción, que se detecta en tiempo real por medio de la variación de la reflectancia.

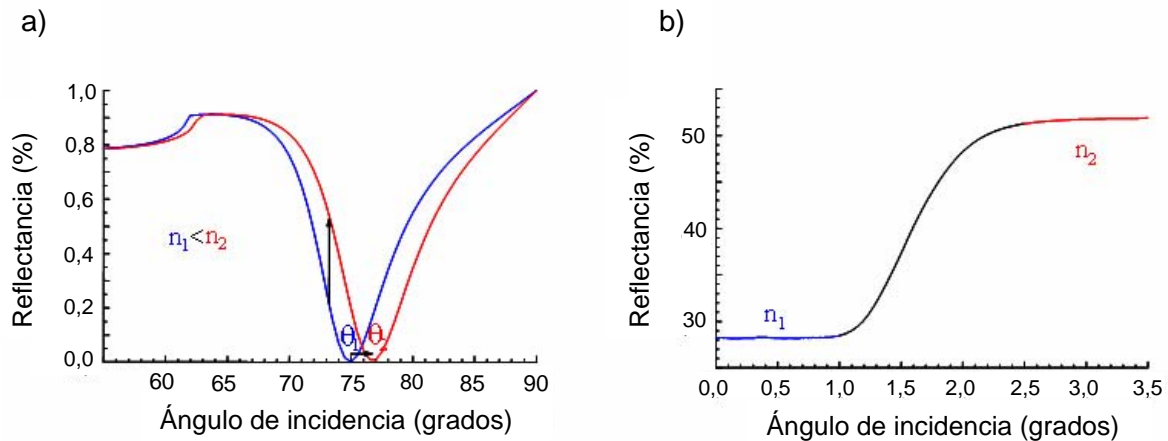


Figura 1.9. Respuesta del sensor de SPR al cambio de índice de refracción midiendo la intensidad de luz reflejada (a) en función del ángulo de incidencia y b) en función del tiempo a un ángulo de incidencia fijo.

La resolución en índice de refracción de los sensores de SPR con acoplamiento por prisma está entre 10^{-5} y 10^{-6} RIU (unidades de índice de refracción, de inglés refractive index units) [27]. Esto significa que el límite de detección actual de los dispositivos de SPR está en 1 pg/mm² de material analizado.

Las técnicas de análisis clínicos convencionales son relativamente lentas debido a los procedimientos indirectos que utilizan, que pueden llegar a ser muy laboriosos. El potencial que presentan los biosensores SPR para detectar interacciones biomoleculares en tiempo real y con una alta sensibilidad, unido a su versatilidad, que permite que puedan ser aplicados al estudio de numerosos tipos de uniones, utilizando escasos volúmenes de muestra y sin la necesidad de ningún tipo de marcaje, hace que actualmente el SPR juegue un papel central en el estudio de la cinética, afinidad y especificidad de interacciones biológicas entre distintas especies moleculares.

Sin embargo, no todos los experimentos son posibles, el uso de un biosensor SPR lleva intrínsecamente una serie de ventajas e inconvenientes que deben evaluarse a fin de justificar la viabilidad del mismo. A continuación se resumen estas características:

Ventajas:

- Versatilidad: Pueden detectar cualquier tipo de analito siempre y cuando exista inmovilizado su correspondiente elemento de reconocimiento. Esto permite analizar un amplio rango de especies, que abarca desde pequeños péptidos hasta anticuerpos, virus y bacterias. Se han aplicado tanto al estudio de interacciones antígeno-anticuerpo como ligando-receptor o hibridaciones de ADN.
- No se utilizan marcadores: No hace falta ningún tipo de marcador para detectar la unión analito-receptor. La muestra queda libre de estos reactivos abaratando los costes del experimento y evitando cualquier posible interferencia en la interacción biológica.
- Análisis más rápidos: Debido al hecho de que se pueden detectar las interacciones a tiempo real, se pueden determinar rápidamente los mecanismos responsables de dicha reacción.
- Amplio rango dinámico: Se pueden medir concentraciones que se encuentren por debajo de 10^{-9} M, llegando incluso a detectarse niveles del orden de 10^{-11} M.
- Reducido volumen de muestra para el análisis, con pocos microlitros pueden realizarse medidas.
- Reversibilidad: Siempre que la molécula receptora permanezca estable tras el uso de soluciones de regeneración es posible reutilizar la superficie sensora.
- Flexibilidad, como herramienta de análisis cuantitativo, determinación de afinidad de ligandos y estudios cinéticos, tanto como plataforma de investigación como para su uso en análisis rutinarios.

Desventajas:

- Inespecificidad de la detección. Dependiendo de la calidad del receptor y de la preparación de la capa receptora formada en la superficie, puede presentarse el fenómeno de reactividad cruzada, por el que el elemento de reconocimiento puede unirse a diferentes moléculas presentes en la muestra.

- Limitación en el tamaño molecular del analito. Debido a las características inherentes del mecanismo físico del SPR existen dificultades para detectar analitos de peso molecular inferior a 5 kDa, aunque esta limitación se puede solventar utilizando el formato de ensayo de inhibición (ver apartado 1.3.1).

El éxito de los biosensores SPR se ve reflejado en el aumento de estos sistemas disponibles comercialmente (Tabla 1.1). Actualmente son comercializados por más de doce compañías a nivel mundial [28]. Especial mención merece el biosensor SPR comercializado por Biacore bajo diferentes modelos, que domina este mercado desde que introdujo el primero de estos dispositivos en 1990. Además, diversos grupos de investigación distribuidos por todo el mundo han diseñado biosensores SPR portables de acuerdo con sus necesidades experimentales, que a diferencia de los dispositivos comerciales no requieren una instrumentación muy sofisticada.

Desde que la técnica de SPR se aplicó por primera vez en el biosensado de la interacción antígeno-anticuerpo, la investigación y el desarrollo tecnológico de los inmunosensores ha experimentado un crecimiento exponencial. Los métodos de diálisis de equilibrio utilizados convencionalmente para medir la afinidad de los anticuerpos por sus antígenos han sido superados desde la aparición de esta técnica, mucho más sensible, rápida y práctica. Además de permitir la medida de constantes de afinidad, los inmunosensores SPR pueden utilizarse para determinar la velocidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, así como para determinar la presencia de un determinado compuesto en muestras de matriz compleja a niveles de concentración del orden nanomolar. Los inmunosensores SPR representan actualmente uno de los métodos de detección de la unión antígeno-anticuerpo más prometedores, y su uso en el diagnóstico de diferentes enfermedades y en la investigación biomédica continúa en aumento [29]. El interés en el desarrollo y aplicación de los inmunosensores SPR se debe a diferentes motivos entre los que se incluye la gran sensibilidad, selectividad, rapidez y fiabilidad de sus análisis, y en especial a su potencial para la realización de análisis tanto in-situ como in-vivo gracias a la posibilidad de la miniaturización y portabilidad de los dispositivos [30]. Son muchas las áreas de aplicabilidad de estos inmunosensores hoy día, incluyendo la ingeniería molecular, análisis de alimentos, diagnóstico clínico,

proteómica, monitorización medioambiental, bacteriología, virología y detección de armas biológicas [31].

Tabla 1.1. Biosensores SPR presentes en el mercado en el año 2008

Compañía	Instrumento	País
Biacore	Biacore A100	Suecia
	Biacore T100	
	Biacore X100	
	Biacore Flexchip	
	Biacore C	
	Biacore Q	
	Biacore J	
	Biacore 3000	
Sensata Technologies	Spreeta	Estados Unidos
ICx Nomadics	SensiQ	Estados Unidos
	SensiQ Pioneer	
	SensiQ Discovery	
Optrel	Multiskop	Alemania
Reichert Analytical Instruments	SR-7000 DC	Estados Unidos
	SR-7000	
Plasmonic Biosensor AG	Plasmonic	Alemania
Eco Chemie	Autolab Springle	Holanda
	Autolab Esprit	
DKK-TOA Corp	SPR-20	Japón
Analytical m-Systems	Biosuplar 6	Alemania
Sensia	β -SPR	España
GWC Technologies	SPRimager II	Estados Unidos
IBIS Technologies	IBIS-iSPR	Holanda
GenOptics	SPRi-Plex	Francia
	SPRi-Lab+	
Bio-Rad	ProteOn XPR36	Israel
FujiFilm	AP-3000	Estados Unidos
BiOptix	BiOptix 207B1	Estados Unidos

1.3.1. Selección del Bioreceptor

Los inmunosensores SPR están basados en el principio de los ensayos de fase sólida (como los ensayos tipo ELISA), donde los inmunoreactivos se inmovilizan en un

soporte sólido, de forma que la interacción tiene lugar en la interfase sólido-líquida. Uno de los mayores desafíos en la fabricación de un inmunosensor es la inmovilización del anticuerpo o el antígeno sobre la superficie sensora, puesto que la eficiencia con la que se lleve a cabo este proceso es crucial para conseguir un inmunosensor fiable y sensible. El diseño del inmunoensayo determina cual de las dos moléculas, antígeno o anticuerpo, ha de inmovilizarse, lo que condiciona la elección del método de inmovilización adecuado. Los tipos de formatos de ensayo que suelen utilizarse en los inmunosensores SPR son los formatos no competitivos directo e indirecto (tipo sándwich), y el formato competitivo [32]. El primero se basa en la inmovilización de un anticuerpo con el que se lleva cabo la detección directa del analito cuando se produce la unión entre ambos. Esta modalidad no existe en las técnicas de inmunoensayo convencionales, puesto que se requiere de un segundo anticuerpo que revele la presencia del inmunocomplejo formado mediante un ensayo sándwich. Este último es también utilizado en los inmunosensores para la amplificación de la respuesta obtenida en la detección del analito mediante el ensayo directo. El tercer formato, utilizado con frecuencia en el diseño de los inmunosensores SPR, es el competitivo. En este tipo de ensayo se inmoviliza el analito o un análogo del mismo, y la muestra a analizar se incuba con una concentración de anticuerpo previamente determinada. La presencia del analito en la muestra inhibe la unión del anticuerpo al analito inmovilizado en la superficie del sensor, por lo que la respuesta del SPR es inversamente proporcional a la concentración de analito. De todos los tipos, el inmunoensayo directo representa el método más rápido y sencillo, puesto que la detección del analito se lleva a cabo en un único paso y la respuesta del SPR es directamente proporcional a la concentración del mismo. Además el consumo de reactivos, en especial de anticuerpos, es mucho menor, lo que reduce considerablemente los costes. Sin embargo, hay que considerar dos limitaciones en este tipo de inmunoensayo. Una de ellas está relacionada con el tamaño del analito, puesto que la unión al anticuerpo de moléculas con un tamaño menor de 10000 Da genera un cambio de índice de refracción muy pequeño, difícil de detectar mediante la técnica SPR (apartado 1.3). En el formato sándwich se reduce el tamaño mínimo detectable a 5000 Da, puesto que el uso de un segundo anticuerpo para la detección del analito amplifica la señal obtenida, mientras que en el formato competitivo en el que el analito se detecta de

forma indirecta mediante el uso de un derivado del mismo de alto peso molecular, no hay restricciones en el tamaño del analito [22]. La segunda limitación está relacionada con la estabilidad conformacional de los anticuerpos que debido a su compleja estructura, formada por la asociación de distintas subunidades, resulta muy vulnerable a cambios físico-químicos del medio. Esta condición limita el uso de soluciones de pH extremos para la regeneración de la superficie sensora y con ello la reutilización de inmunosensores basados en el uso de anticuerpos como bioreceptores [33, 34]. Así pues, la elección de uno u otro formato de ensayo, depende de la aplicación del inmunosensor. Según el tipo de determinación analítica, especialmente en el campo de la medicina, no interesa la reutilización del chip sensor, o impera la rapidez y sencillez de la prueba sobre la reutilización del mismo, por lo que resulta más interesante el uso de inmunosensores en el que se utilizan anticuerpos como bioreceptores. Por otro lado, el tamaño del analito a detectar también impondrá el tipo de inmunosensor que se pueda emplear, de manera que en la determinación de pesticidas, toxinas u otras sustancias contaminantes de pequeño peso molecular requerirán el uso de inmunosensores que empleen formatos de ensayo competitivo.

El éxito del proceso de inmovilización del bioreceptor depende fundamentalmente de la estabilidad funcional de la molécula, del grado de impedimento estérico que se produzca durante su inmovilización y de la orientación que ésta presente sobre la superficie sensora. Además, la prevención de la adsorción inespecífica de otras moléculas sobre la superficie sensora es fundamental, y cobra especial importancia cuando se trabaja con muestras reales de origen biomédico o medioambiental, donde un analito en bajas concentraciones ha de ser detectado dentro de una mezcla de distintos compuestos de mucha mayor concentración. Estos cuatro factores limitan la funcionalidad de la superficie sensora y con ello la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del inmunosensor. Exceptuando la prevención de uniones inespecíficas, igualmente crítica en el proceso de inmovilización del anticuerpo y del antígeno, el resto de factores que condicionan el éxito del inmunoensayo son especialmente importantes cuando se inmoviliza el anticuerpo en lugar del antígeno. Este hecho se explica por varios motivos. De igual manera que la estructura conformacional del anticuerpo es

menos estable que la del antígeno ante cambios extremos de pH, también lo es frente a las modificaciones químicas propias del proceso de inmovilización. La posible alteración estructural de la molécula es mucho más crítica en el caso del anticuerpo, puesto que la pérdida de actividad biológica del mismo repercute directamente en su capacidad de unión al analito, por lo que tiene un impacto directo sobre la sensibilidad del inmunosensor. Por otro lado, el gran tamaño del anticuerpo es responsable de que el fenómeno de impedimento estérico entre moléculas durante su inmovilización se manifieste en mayor medida en este caso. Por último, el control de la orientación de la molécula receptora durante su inmovilización es mucho más importante en el caso del anticuerpo debido a su estructura asimétrica [35]. La presencia de distintos grupos funcionales altamente repetidos a lo largo de su estructura, que representan posibles puntos de anclaje del anticuerpo a la superficie sensora, puede impedir la adecuada inmovilización del mismo a través únicamente de su región Fc, dejando libre la región Fab responsable del proceso de reconocimiento del analito [36]. Muchos estudios demuestran que la inmovilización con una orientación al azar de los anticuerpos reduce notablemente la capacidad de unión al antígeno de la superficie sensora con respecto a cuando los anticuerpos están orientados adecuadamente (Figura 1.6), y consecuentemente disminuye la sensibilidad del inmunosensor [37, 38]. En la inmovilización orientada la actividad del anticuerpo solo resulta afectada por el impedimento estérico al que esté sometido [39].

Debido a la notable influencia de los factores descritos sobre la eficiencia de la inmovilización de anticuerpos, la elección de un método de inmovilización adecuado con el que se consiga una alta densidad de anticuerpos correctamente orientados, que preserve lo más posible la funcionalidad de los mismos, y que minimice el efecto del impedimento estérico entre moléculas, es un reto en el desarrollo de inmunosensores basados en anticuerpos como bioreceptores.

1.4. Métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies de Au

Convencionalmente, la inmovilización de los anticuerpos sobre una superficie sensora se ha llevado a cabo mediante la adsorción física de la molécula o mediante la

unión covalente de la misma a la superficie previamente modificada químicamente. En el caso de la unión covalente, el anticuerpo se ha inmovilizado, bien mediante la formación de una matriz de dos dimensiones, por medio de monocapas autoensambladas, o bien mediante una matriz tridimensional, generalmente usando hidrogeles de dextrano carboximetilado.

La superficie de oro limpia muestra una gran tendencia a la adsorción y desnaturalización de las proteínas, por lo que el uso generalizado de la fisisorción del anticuerpo como método de inmovilización a pesar del impacto que la desnaturalización del mismo pueda tener sobre la sensibilidad del inmunosensor, se debe a su rapidez y simplicidad, ya que no requiere que la superficie sea modificada previamente y la unión sucede de forma directa a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Pero debido a la inespecificidad de la unión esta resulta débil, y por tanto, poco estable ante variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica o ante la naturaleza química del microambiente, por lo que la pérdida de anticuerpo inmovilizado se produce con facilidad, disminuyendo considerablemente la reproducibilidad del inmunosensor. Por otro lado, el escaso control sobre el proceso de inmovilización que caracteriza a esta estrategia conduce a una orientación al azar del anticuerpo y a una probable formación de multicapas, lo que reduce no solo la reproducibilidad, sino también la sensibilidad final.

Los problemas de la inmovilización del anticuerpo mediante fisisorción se han visto superados con el desarrollo de la técnica basada en el autoensamblaje de moléculas alquílicas con un grupo tiol en un extremo sobre la superficie de oro, la cual ha permitido inmovilizar los anticuerpos de forma covalente. La formación espontánea de monocapas de moléculas tioladas, conocidas como SAMs (*self assembled monolayers*), está dirigida principalmente por la coordinación entre los tioles o disulfuros y el oro, acompañada de interacciones de Van der Waals entre las cadenas alquílicas [40]. Las moléculas se disponen de forma extremadamente ordenada, y orientadas sobre la superficie sensora con un ángulo de inclinación aproximado de 30° (Figura 1.10), dando lugar a monocapas uniformes y compactas. Desde que la formación de las SAMs fue descrita por primera vez por Nuzzo y Allara en 1983 [41], las monocapas de tioles sobre oro, especialmente alcanotioles, son el sistema autoorganizado más extensamente estudiado. La

funcionalización de los alcanotioles con un grupo reactivo en un extremo ha permitido la inmovilización del anticuerpo mediante su unión covalente a la SAM de la superficie, la cual reduce además las uniones inespecíficas y protege a las biomoléculas del contacto con la superficie, que podría desnaturalizarlas [42]. La variedad de grupos funcionales y de longitudes de cadena hidrocarbonada que puede presentar un alcanotiol permite una gran versatilidad en el diseño del inmunosensor [43-45]. El uso de SAMs mixtas formadas por un alcanotiol con un grupo reactivo, diluido con uno que presenta un grupo funcional inerte, permite controlar la densidad de puntos de unión del anticuerpo a la superficie [46-48]. El alcanotiol no reactivo, que se utiliza en una fracción molar considerablemente mayor que el reactivo, ejerce una función de molécula espaciadora por lo que variando la relación entre ambos tioles pueden conseguirse distintas densidades y distribuciones del anticuerpo sobre la superficie. De esta forma la introducción del segundo tiol en la monocapa permite minimizar el impedimento estérico entre las moléculas de anticuerpo, especialmente cuando presenta una cadena alquílica de menor longitud que el tiol utilizado para la unión de este último [49]. Además, el uso de SAMs mixtas, especialmente aquellas formadas por alcanotioles de cadena larga para el anclaje del anticuerpo, e hidroxialcanotioles de cadena corta como molécula espaciadora, ha demostrado que aumenta la prevención de la desnaturalización de proteínas y de las interacciones inespecíficas, en comparación con las SAMs compuestas por un único tiol [49, 50].

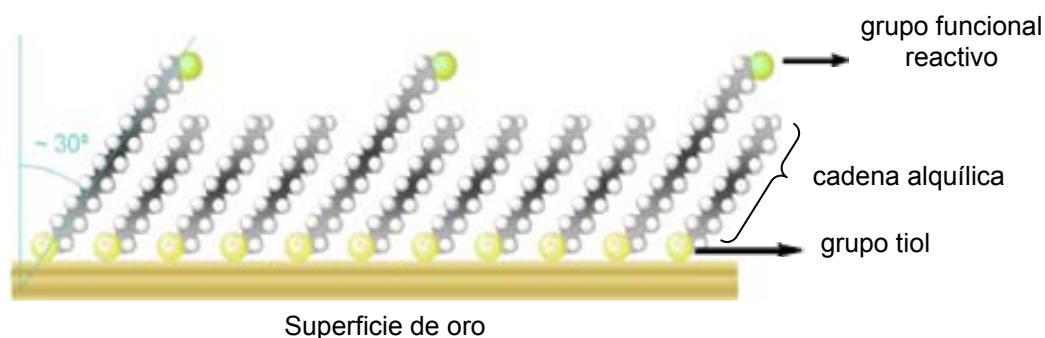


Figura 1.10. Representación gráfica de una SAM mixta sobre una superficie de oro.

Basándose en el concepto de monocapas autoensambladas formadas a partir de la adsorción de alcanotioles funcionalizados para el anclaje del anticuerpo, e

hidroxialcanotioles, se han creado hidrogeles de dextrano carboximetilado sobre la superficie sensora. El polímero de dextrano forma una malla o entramado que confiere la estructura tridimensional hidrofílica que caracteriza al hidrogel. Estos geles se inmovilizan sobre la superficie de oro utilizando la química de las SAMs. Posteriormente, la unión del anticuerpo puede llevarse a cabo utilizando diferentes estrategias, siendo la más común la inmovilización covalente a través de los grupos amino del anticuerpo [51]. Las principales diferencias con las SAMs de alcanotioles es que la naturaleza 3D y la flexibilidad del hidrogel permiten que se inmovilice una mayor cantidad de moléculas de anticuerpo, y que el mayor carácter hidrofílico del mismo aporta a la superficie sensora mayor resistencia a la fisisorción inespecífica de otras proteínas [52]. En la práctica, aunque la estructura tridimensional de los hidrogeles de carboxidextrano permite que se obtenga una mayor densidad de inmovilización (debido a una mayor cantidad de puntos de unión disponibles, estas superficies presentan algunas desventajas asociadas a efectos estéricos relacionados con la falta de control sobre la distribución del anticuerpo en la superficie [53].

La construcción de capas estables, con una densidad controlada, evitando la formación de multicapas y consiguiendo así estructuras más reproducibles, son las principales ventajas que presenta la inmovilización covalente del anticuerpo. El proceso de unión covalente generalmente se lleva a cabo por medio de la formación de un enlace entre los grupos electrofílicos como carboxilos y aldehídos en la superficie, y los grupos nucleofílicos, como aminos o tioles, presentes en los aminoácidos de la molécula de anticuerpo. La vía de inmovilización más común utiliza el enlace carboxilo-amino, y recibe el nombre de acoplamiento amino. La reacción consiste en la activación del ácido carboxílico terminal del alcanotiol de la SAM mediante carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), lo que da lugar a la formación de un compuesto intermediario que reacciona con un grupo amino del anticuerpo estableciéndose la unión covalente del mismo al alcanotiol (Figura 1.11). El gran inconveniente de este método es que no permite controlar la orientación de los anticuerpos puesto que los grupos funcionales utilizados para establecer el enlace se repiten a lo largo de su estructura, como es el caso del grupo amino de los residuos de lisina presentes por toda la superficie del anticuerpo, por lo que

este puede unirse a la superficie por múltiples sitios y por tanto orientado de distintas maneras [54].

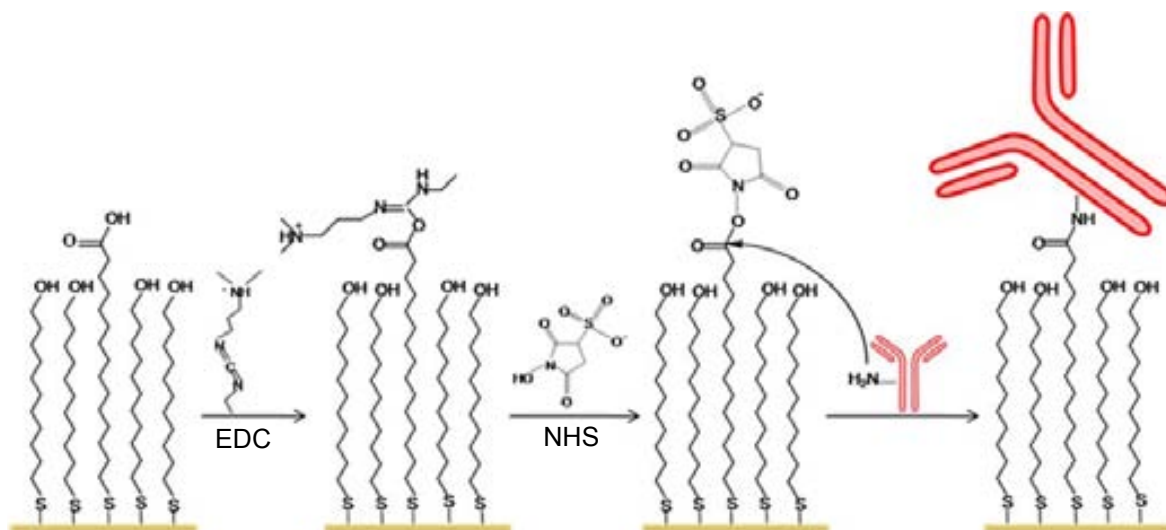


Figura 1.11. Representación esquemática del proceso de inmovilización covalente (acoplamiento amino) del anticuerpo.

Debido a la importancia de controlar la orientación del anticuerpo para preservar su capacidad de reconocimiento molecular, se han desarrollado numerosas estrategias de inmovilización alternativas al método covalente convencional. El uso de estrategias covalentes para conseguir que la zona de reconocimiento del analito sea accesible al mismo se reduce a los casos en que no se inmoviliza el anticuerpo en su forma nativa, sino una forma oxidada del mismo, o bien, fragmentos en lugar del anticuerpo completo. En el primer caso, se lleva a cabo un proceso de oxidación del anticuerpo para obtener a partir de los radicales glucídicos de la molécula, grupos aldehídos a través de los cuales el anticuerpo es inmovilizado covalentemente sobre la SAM de la superficie [55]. Puesto que los carbohidratos del anticuerpo se localizan todos en la región Fc del mismo, mediante este método se consigue una inmovilización sitio-específica, que deja libre la región Fab para la posterior unión del analito (Figura 1.12). Los principales inconvenientes que presenta esta estrategia es que su uso está limitado a los anticuerpos que contengan radicales glucídicos en su molécula [56], y que la oxidación de esta es un proceso químico agresivo que puede conducir a una pérdida de funcionalidad del anticuerpo [57]. Por su parte la inmovilización de fragmentos del anticuerpo se basa en

que su región Fab, que contiene la función de unión al antígeno, puede obtenerse mediante una digestión enzimática seguida de una reducción química de la molécula. Este fragmento conserva un grupo sulfidrilo estructuralmente opuesto al sitio de unión al antígeno. Mediante el uso de un agente entrecruzador específico para la unión del grupo tiol a la SAM de la superficie, o bien, mediante la unión directa del tiol al oro, se inmoviliza exclusivamente la región Fab del anticuerpo, ya sea el fragmento completo o bien los fragmentos univalentes F(ab') [58] (Figura 1.13). Sin embargo, al igual que la unión del anticuerpo a través de sus grupos glucídicos, esta estrategia de inmovilización requiere tratamientos químicos agresivos que pueden dar lugar a una alteración funcional de la molécula.

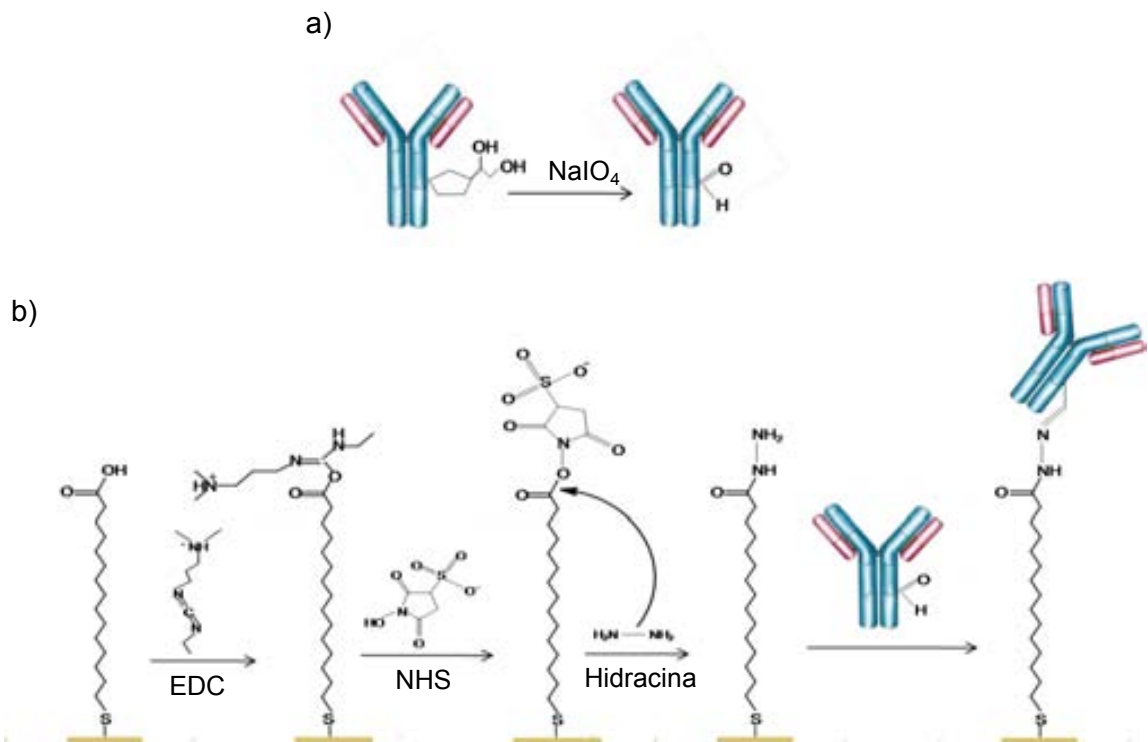


Figura 1.12. Inmovilización covalente del anticuerpo previamente oxidado. A) Oxidación de los grupos carbohidratos e (b) inmovilización del anticuerpo a través de los grupos aldehídos generados en su estructura.

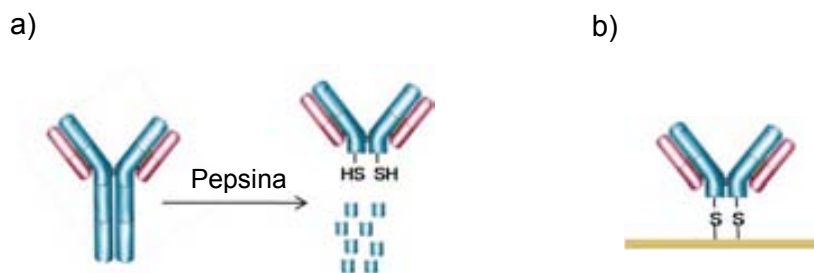


Figura 1.13. Inmovilización del anticuerpo a través de su región Fab. A) Digestión enzimática e (b) inmovilización directa de la región Fab mediante la unión de sus grupos SH al oro.

El resto de métodos empleados para la inmovilización orientada de anticuerpos se basan generalmente en una interacción de afinidad. Son muchas las técnicas empleadas en este tipo de inmovilización y la gran mayoría requiere la modificación química o genética del anticuerpo en su forma nativa, de manera que la inmovilización tiene lugar gracias a la alta afinidad entre una molécula unida al anticuerpo y su pareja anclada a la superficie sensora [59]. Uno de los sistemas de afinidad más utilizados es el par biotina/estreptavidina. La afinidad de unión entre ambas moléculas es la más alta conocida en la naturaleza ($K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$), por lo que esta pareja resulta una herramienta de gran utilidad en numerosas aplicaciones biológicas, y representa la técnica de marcaje, secuestro y separación más utilizada en el laboratorio. La funcionalización de la superficie sensora con la molécula de estreptavidina permite el anclaje del anticuerpo, conjugado previamente con biotina, con una fuerza comparable a la de un enlace covalente [60, 61].

La unión de la estreptavidina a la SAM de la superficie puede llevarse a cabo vía acoplamiento amino, o si se utiliza una monocapa biotilada, a través de la interacción con biotina. La estructura simétrica de la estreptavidina, con dos sitios de unión a biotina a cada lado del eje de simetría de la molécula, permite su unión a la superficie a través de una o dos biotinas, quedando accesibles los otros dos dominios para la unión del anticuerpo biotilado (Figura 1.14.a). Otra técnica muy parecida utiliza anticuerpos modificados con polihistidina que presentan una gran afinidad por la superficie modificada con níquel (Ni^{2+}) unido al agente quelante ácido nitrilotriacético (NTA) [62]. Por otro lado anticuerpos con una cola de policisteína en la región Fc, fusionada

genéticamente o unida a la molécula mediante un procedimiento químico, pueden inmovilizarse directamente sobre la superficie de oro a través de la interacción tiol-oro [63] (Figura 1.14.b). Más recientemente se han utilizado estrategias que utilizan ADN como *linker* molecular para la unión del anticuerpo a la superficie sensora. En estas se inmoviliza ADN de cadena simple con un grupo tiol en un extremo, por el que se une directamente al oro. Por otro lado el anticuerpo es conjugado con una cadena simple de ADN complementaria a la primera, y posteriormente inmovilizado mediante la hibridación entre ambas cadenas de ADN [64] (Figura 1.14.c).

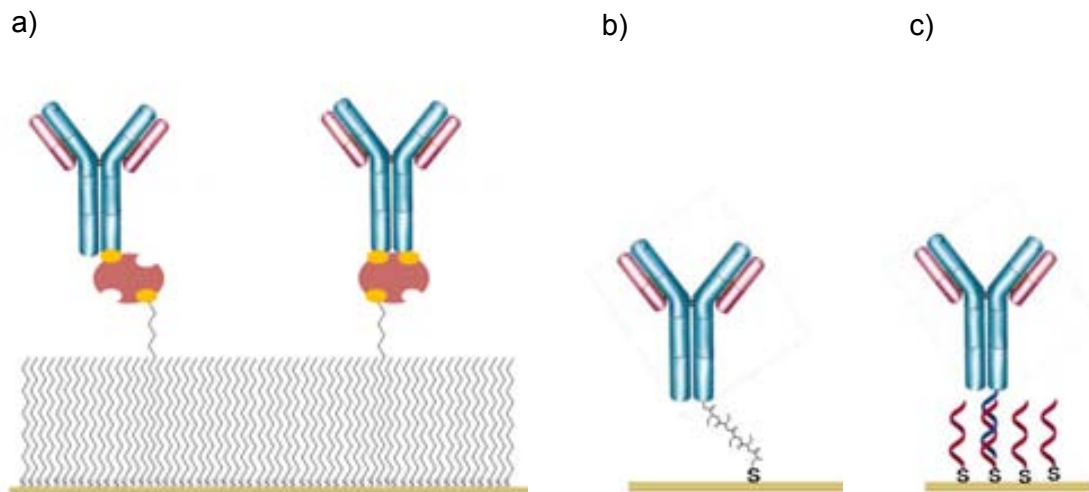


Figura 1.14. Inmovilización no covalente del anticuerpo mediante previa modificación de su estructura (a) con biotina, (b) cadena de policisteína o (c) hebra de ADN.

Son muchas las formas de modificar el anticuerpo para su anclaje a la superficie debido a la gran variedad de parejas moleculares de alta afinidad, sin embargo, la variedad de estrategias disponibles para la inmovilización orientada, no covalente, del anticuerpo en su forma nativa, es muy reducida. La mayoría de métodos utilizados con este fin se basan en el uso proteínas de unión a anticuerpos. Este grupo de proteínas está formado originalmente por la proteína A y G, ambas de procedencia microbiana, la primera aislada de la bacteria *Staphylococcus aureus*, y la segunda de distintas especies de *Streptococcus*. Ambas presentan gran afinidad por la región Fc de los anticuerpos por lo que son una herramienta muy útil para controlar la orientación durante la

inmovilización [65]. Aunque en el proceso de aislamiento se detectan formas de distinto peso molecular de cada una de estas proteínas, las formas que se comercializan para su uso en el laboratorio tienen un peso molecular de 42 y 21 kDa en el caso de la proteína A y proteína G, respectivamente. La proteína A presenta mayor número de sitios de unión a anticuerpos, con cuatro dominios de unión frente a los dos que presenta la proteína G, aunque este potencial de unión no está estéricamente favorecido puesto que la relación de tamaños entre las proteínas y la IgG hace poco probable la ocupación de varios dominios de unión al mismo tiempo. El gran inconveniente de este método es que aunque permita inmovilizar los anticuerpos con la orientación adecuada, la propia orientación de la proteína A o G limita la eficiencia del mismo, puesto que estas deben disponerse sobre la superficie dejando accesible sus dominios de unión al anticuerpo. Por lo tanto la inmovilización de estas proteínas sin controlar su orientación previamente, comparte los mismos problemas descritos para los anticuerpos. A pesar de seguir existiendo un problema relativo a la orientación de las moléculas inmovilizadas, la respuesta del inmunosensor generada por la unión del anticuerpo a la proteína A o G estará relacionada exclusivamente con el anticuerpo correctamente orientado, por lo que será indicativa de la eficiencia de la inmunosuperficie en la detección del analito (Figura 1.15.a). En los últimos años, se ha empleado una nueva herramienta molecular de origen sintético para la inmovilización orientada de anticuerpos basada en interacciones de afinidad. Se trata de compuestos derivados de la molécula de calixareno, una macromolécula con un núcleo formado por la unión de grupos fenólicos dispuestos en forma de anillo, cuyo borde inferior y superior puede modificarse para conseguir estructuras más sofisticadas que presentan cavidades que permiten la inclusión de otras moléculas [66]. Derivados del calixareno con grupos SH en uno de los bordes del anillo y modificados con un compuesto químico cíclico (éter de corona) en el borde opuesto, han sido propuestos como *linkers* moleculares para la inmovilización orientada de anticuerpos, en su forma nativa, sobre superficies sensoras de dispositivos SPR (Figura 1.15.b). Aunque el mecanismo de captura de estos compuestos denominados *prolinkers* no ha sido estudiado en profundidad, la interacción con el anticuerpo tiene lugar a través de sus grupos amino, sin la intervención de ningún proceso químico [67].

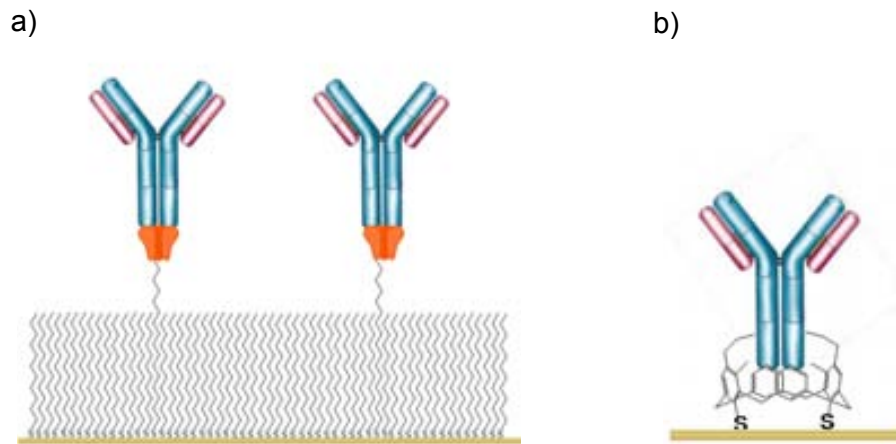


Figura 1.15. Inmovilización no covalente del anticuerpo en su forma nativa, mediante su unión a la (a) proteína G o (b) Prolinker.

Son escasas las estrategias de modificación química del anticuerpo o de la proteína de unión al mismo en las que se dirija la reacción a una zona concreta de la molécula [68]. Generalmente en el proceso de modificación química la molécula a conjugar puede unirse a multitud de sitios distintos en la estructura de la proteína, debido a que suelen emplearse reacciones poco específicas dirigidas a un grupo químico “diana” que no se localiza exclusivamente en la región deseada. Por este motivo es necesario optimizar este proceso, controlando condiciones como el tiempo o cantidad de reactantes, para lograr afectar lo menos posible la zona de reconocimiento de la proteína. De lo contrario, la estrategia de inmovilización presentará las mismas limitaciones descritas para el método covalente utilizado convencionalmente. La forma más eficaz de superar los problemas derivados de una conjugación “al azar” del anticuerpo o proteína de unión al mismo, es el uso de formas recombinantes que presentan la secuencia de DNA deseada conservando su funcionalidad intacta [69].

Los métodos de inmovilización descritos pueden combinarse de muchas maneras, más o menos complejas, para conseguir unir el anticuerpo a la superficie con la orientación adecuada. Por ejemplo, para controlar la orientación de la proteína de unión a anticuerpos A o G, esta puede inmovilizarse a través de una cola de polisteirena [70], o una secuencia nucleotídica con un grupo tiol terminal [71].

Recientemente se han descrito nuevas estrategias de inmovilización de anticuerpos basadas en la utilización de proteínas de fusión que contienen dominios de unión a anticuerpos, originales de las proteínas A o G, y un dominio de unión al oro. Estas proteínas se unen a la superficie de oro por un mecanismo de autoensamblamiento a través de su dominio de unión al metal, dejando accesible sus dominios de unión a anticuerpos [72]. Esta estrategia permite llevar a cabo la inmovilización orientada de anticuerpos en su forma nativa sin necesidad de llevar a cabo ningún proceso químico, por lo que ofrecen un método sencillo y elegante para la fabricación de inmunosensores SPR.

Aunque el biosensor SPR ha experimentado un gran avance tecnológico en los últimos años, la funcionalización de la superficie sensora con anticuerpos sigue suponiendo un reto en el desarrollo de inmunosensores debido a que la sensibilidad y especificidad del sensor depende enormemente de la disposición del anticuerpo sobre la superficie. Actualmente numerosos grupos de investigación trabajan en el desarrollo de estrategias de inmovilización de anticuerpos para conseguir maximizar la capacidad de unión al analito que presenta la superficie sensora. Este trabajo de Tesis se ha centrado en esta línea de investigación, con el fin de aplicar el inmunosensor en la detección de la hormona de crecimiento humana (hGH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH) humana, conocida como Tirotropina.

1.5. Referencias

- 1 Yalow R.S. and Berson S.A., *Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods*. Nature, 1959. **184**(4699):1648-1649.
- 2 Nakane P. K., and Pierce G. B., *Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1966. **14**:929-931.
- 3 Engvall E. and Perlmann P., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9):871-4.
- 4 Wu A.H.B., *A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2006. **369**(2):119-124.
- 5 Turner A.P., *Biosensors--sense and sensitivity*. Science, 2000. **290**:1315-1317.
- 6 Vo-Dinh T and Cullum B., *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. Fresenius J. Anal. Chem., 2000. **366**:540-551.

- 7 Clark L.C. and Lyons C., *Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(1):29-45.
- 8 Wang J., *Electrochemical Glucose Biosensors*. Chem. Rev., 2008. **108**:814-825.
- 9 Dey D and Goswami T., *Optical Biosensors: A Revolution Towards Quantum Nanoscale Electronics Device Fabrication*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.
- 10 Estevez M.C., Alvarez M. and Lechuga L.M., *Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications*. Laser & Photonics Reviews, 2012. **6**(4):463-487.
- 11 D'Orazio P., *Biosensors in clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2003. **334**(1-2):41-69.
- 12 Schubert F., Wollenberger U., Scheller F.W. and Müller H.G., *Artificially Coupled Reactions with Immobilized Enzymes: Biological Analogs and Technical Consequences*. In: Bioinstrumentation and Biosensors. Wise D.L., Ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991. **19**.
- 13 Gizeli E. and Lowe C.R., *Immunosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 1996. **11**(9):vii-vii.
- 14 Jiang T., Minunni M., Wilson P., Zhang J., Turner A.P.F. and Mascini M., *Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **20**(10):1939.
- 15 Ronkainen N.J., Halsall H.B. and Heineman W.R., *Electrochemical biosensors*. Chem. Soc. Rev., 2010. **39**:1747-1763.
- 16 Janata J., Josowicz M., Vanysek P. and DeVaney D.M., *Chemical sensors*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(12):179R-208R.
- 17 Cass, A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O., Aston W.G. Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L. and Turner A.P.F., *Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose*. Anal. Chem., 1984. **56**:667.
- 18 Álvarez M., Carrascosa L.G., Plaza J.A., Zinoviev K. and Lechuga L.M., *Biosensors based on cantilevers*. Biosensors and Biodetection. Methods and Protocols, 2009. **504**.
- 19 Ligler F.S., *Optical biosensors: today and tomorrow*. Elsevier, 2008.
- 20 Wolfbeis O.S., *Fibre Optic Chemical Sensors and Biosensors*. CRC Press, Boca Ratón, FL, 1991.
- I y II.**
- 21 Lechuga L.M., Prieto F. and Sepúlveda B., *Interferometric Biosensors for environmental pollution detection*. In: Optical Sensors for Industrial, Ed. Springer (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors), 2003.
- 22 Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species*. Chem. Rev., 2008. **108**(2):462-493.
- 23 Otto A., *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. Zeitschrift für Physik A., 1968. **216**(4):398-410.
- 24 Kretschmann E. and Raether H., *Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light*. Zeitschrift für Naturforschung A., 1968. **23**:2135-2136.

- 25 Liedberg B, Nylander C. and Lundström I., *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*. Sens. Actuators, 1983. **4**:299-304.
- 26 Raether H., *Surface plasma oscillations and their applications*. Physics of Thin Films, 1977. Academic Press: New York:145-261.
- 27 Homola J., Koudela I. and Yee S.S., *Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **54**:16-24.
- 28 O'Malley S., *Recent advances in label-free biosensors applications in protein biosynthesis and HTS Screening*. Protein Biosynthesis, Ed: Toma E. Esterhouse and Lado B. Petrinis, 2008.
- 29 Kausaite A., van Dijk M., Castrop J., Ramanaviciene A., Baltrus J.P. Acaite J. and Ramanavicius A., *Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time*. Mol. Biol. Educ., 2007. **35**:57-63.
- 30 Green R.J., Frazier R.A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J. and Tendler S.J.B., *Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials*. Biomaterial, 2000. **21**:1823-1835.
- 31 Karlsson R., *SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas*, J. Mol. Recog., 2004. **17**:151-161.
- 32 Shankaran D.R and Miura N., *Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays*. J. Phys. D: Appl. Phys., 2007. **40**:7187-7200.
- 33 Jayasena S.D., *Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics*. Clinical Chemistry, 1999. **45**(9):1628-1650.
- 34 Zhang B., Zhang X., Yan H.H., Xu S.J., Tang D.H. and Fu W.L., *A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insertplug model of piezoelectric immunosensor*. Biosens. Bioelectron., 2007. **23**:19.
- 35 Kawaguchi T., Shankaran D. R., Kim S. J., Matsumoto K., Toko K. and Miura N. *Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle for detection of TNT*. Sensors and actuators B Chemical, 2008. **133**(2): 467-472.
- 36 Franco E. J., Hofstetter H. and Hofstetter O., *A Comparative Evaluation of Random and Site-specific Immobilization Techniques for the Preparation of Antibody-based Chiral Stationary Phases*. J. Sep. Sci., 2006. **29**:1458-1469.
- 37 Cho I.H., Paek E.H., Lee H., Kang J.Y., Kim T.S. and Paek S.H., *Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces*. Anal. Biochem., 2007. **365**:14-23.
- 38 Kang J.H., Choi H.J., Hwang S.Y., Han S.H., Jeon J.Y. and Lee E.K., *Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody*. Chromatogr., A, 2007. 1161:9-14.
- 39 Wimalasena R.L. and Wilson G.S., *Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments*. J. Chromatogr. 1991. **572**:85-102.

- 40 Ferretti S., Paynter S., Russell D.A., Sapsford K.E. and Richardson D.J., *Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces trends in analytical chemistry*. Trends in analytical chemistry, 2000. **19**(9):530-540
- 41 Nuzzo R.G. and Allara D.L., *Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces*. Am. Chem. Soc., 1983. **105**(13):4481-4483.
- 42 Wink T., van Zuilen S.J., Bult A. and van Bennekom W.P., *Self-assembled Monolayers for Biosensors*. Analyst, 1997. **122**:43R-50R.
- 43 Sigal G. B., Bamdad C., Barberis A., Strominger J. and Whitesides G. M., *A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance*. Anal. Chem., 1996. **68**:490-497.
- 44 Folkers J. P., Laibinis P. E. and Whitesides G. M., *Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold: Comparisons of Monolayers Containing Mixtures of Short- and Long-Chain Constituents with CH₃ and CH₂OH Terminal Groups*. Langmuir, 1992. **8**:1330-1341.
- 45 Pale-Grosdemange C., Simon E. S., Prime K. L. and Whitesides G. M., *Formation of self-assembled monolayers by chemisorption of derivatives of oligo (ethylene glycol) of structure HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)_mOH on gold*. J. Am. Chem. Soc., 1991. **113**:12-20.
- 46 Dubois L. H. and Nuzzo R. G., *Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces*. Annu. Rev. Phys. Chem., 1992. **43**:437-463.
- 47 Ulman A., *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*. Chem. Rev., 1996. **96**:1533-1554.
- 48 Whitesides G. M. and Laibinis P. E., *Wet Chemical Approaches to the Characterization of Organic Surfaces: Self-Assembled Monolayers, Wetting and the Physical-Organic Chemistry of the Solid-Liquid Interface*. Langmuir, 1990. **6**:87-96.
- 49 Briand E., Salmain M., Herry J.M., Perrot H., Compère C. and Pradier C.M. *Building of an immunosensor: how can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency?*. Biosens. Bioelectron., 2006. **22**(3):440-8.
- 50 Chen S., Li L., Boozer C.L. and Jiang S., *Controlled Chemical and Structural Properties of Mixed Self-Assembled Monolayers by Coadsorption of Symmetric and Asymmetric Disulfides on Au (111)*. J. Phys. Chem. B, 2001. **105**:2975-2980.
- 51 Lofas S., *Dextran Modified Self-Assembled Monolayer Surfaces for Use in Biointeraction Analysis with Surface-Plasmon Resonance*. Pure and Applied Chemistry, 1995. **67**(5):829-834.
- 52 Österberg E., Bergstrom K., Holmberg K, Riggs J.A., Van Alstine J.M., Schuman T.P., Burns N.L. and Harris J.M. *Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces*. Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects, 1993. **77**:159-169.

- 53 Lahiri J., Isaacs L., Tien J. and Whitesides G.M., *A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(4):777-790.
- 54 Domen P.L., Nevens J.R., Mallia A.K., Hermanson G.T. and Klenk D.C., *Site-directed immobilization of proteins*. J. Chromatogr., 1990. **510**:293-302.
- 55 Kang J.H., Choi H.J., Hwang S.Y., Han S.H., Jeon J.Y., and Lee E.K. *Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody*. Journal of Chromatography A, 2007. **1161**:9-14.
- 56 Serrato J.A., Hernández V., Estrada-Mondaca S., Palomares L.A. and Ramirez O.T., *Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media*. Biotechnol. Appl. Biochem., 2007. **47**(2):113-24.
- 57 Franco E.J., Hofstetter H. and Hofstetter O., *A comparative evaluation of random and site-specific immobilization techniques for the preparation of antibody-based chiral stationary phases*. J. Sep. Sci., 2006. **29**(10):1458-1469.
- 58 Vikholm-Lundin I. and Albers W.M., *Site-directed immobilization of antibody fragments for detection of C-reactive protein..* Biosens. Bioelectron., 2006. **21**:1141-1148.
- 59 You C., Bhagawati M., Brecht A. and Piehler J. *Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures*. Anal. Bioanal. Chem., 2009. **393**:1563-1570.
- 60 Dutra R.F. and Kubota L.T., *SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip*. Clinica Chimica Acta, 2007. **376**:114-120.
- 61 Choi S.H., Lee J.W. and Sim S.J., *Enhancement of the sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunosensor for the detection of anti-GAD antibody by changing the pH for streptavidin immobilization*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **35**:683-687.
- 62 Kröger D., Liley M, Schiweck W., Skerra A. and Vogel H., *Immobilization of histidine-tagged protein on gold surfaces using chelator thioalkanes*. Biosens. Bioelectron., 1999. **14**:155-161.
- 63 Torrance L., Ziegler A., Pittman H., Paterson M., Toth R. and Eggleston I., *Oriented immobilization of engineered single chain antibodies to develop biosensors for virus detection*. J. Virol.Methods, 2006. **134**:164-170.
- 64 Bailey R.C., Kwong G., Radu C.G., Witte O.N. and Heath J.R., *DNA-Encoded Antibody Libraries: A Unified Platform for Multiplexed Cell Sorting and Detection of Genes and Proteins.*, J. Am. Chem. Soc., 2007. **129**:1959-1967.
- 65 Briand E., Salmain M., Compère C. and Pradier C.M., *Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006. **53**:215-224.

- 66 Oh S.W., Moon J.D., Lim H.J., Park S.Y., Kim T., Park J., Han M.H., Snyder M. and Choi E.Y., *Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction*. FASEB J., 2005. **19**(10):1335-7.
- 67 Lee Y., Lee E.K., Cho Y.W., Matsui T., Kang I., Kim T. and Han M.H., *ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies*. Proteomics, 2003. **3**:2289-2304.
- 68 Cho I., Paek E., Lee H., Kang J.Y., Kim T.S. and Paek S., *Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces*. Analytical Biochemistry, 2007. **365**:14-23.
- 69 Terpe K., *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003. **60**:523-533.
- 70 Kanno S., Yanagida Y., Haruyama T., Kobatake E. and Aizawa M. *Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization*. Journal of Biotechnology, 2000. **76**:207-214.
- 71 Turkova J. *Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function*. Journal of Chromatography B, 1999. **722**:11-31.
- 72 Ko S., Park T.J., Kim H., Kim J.H and Cho Y.J., *Directed self-assembly of gold binding polypeptide-protein A fusion proteins for development of gold nanoparticle-based SPR immunosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **24**(8):2592-2597.

2. Material y métodos

2.1. Descripción del biosensor de Resonancia de Plasmón Superficial

En este trabajo se ha empleado un biosensor SPR comercializado por la empresa Sensia (www.sensia.es), spin-off que se generó en nuestro grupo de investigación en el año 2004 y que hoy en día pertenece a la cooperativa Mondragón (www.mondragon-corporation.com), y cuyo pequeño tamaño y bajo peso permite que se utilice como un equipo portátil [1]. Éste dispositivo utiliza la configuración de Kretchman que, como se explicó en el apartado 1.3, permite utilizar dos modos de medida siguiendo la variación del ángulo de resonancia o registrando la intensidad de la luz reflejada mientras se mantiene un ángulo de incidencia fijo. Este último modo de medida permite monitorizar en tiempo real tanto procesos de adsorción de biomoléculas en la superficie como la interacción de las biomoléculas ancladas en la superficie con su respectivo analito diana, por lo que ha sido el modo de trabajo escogido.

En el biosensor de SENSIA el conjunto formado por la superficie sensora, el prisma, las celdas de flujo y el dispositivo fotodetector, se encuentran acoplados sobre una superficie giratoria con una resolución angular de 0.01° . Para seleccionar el ángulo de incidencia de la luz con el que se va a trabajar es preciso medir previamente la curva de resonancia que representa la variación en la intensidad de luz reflejada con respecto al

ángulo de incidencia mientras el índice de refracción de la disolución permanece constante. Para obtener la curva de resonancia el banco rotatorio se mueve de forma manual $0,17^\circ$ cada 5 segundos hasta completar el recorrido de la curva de resonancia. Cuando se fija el ángulo de trabajo a uno u otro lado del mínimo de reflectancia los cambios en el índice de refracción del medio adyacente a la superficie provocan una variación en el ángulo de la luz reflejada que se traducen en el desplazamiento de la curva de reflectividad. Habitualmente se selecciona un ángulo de medida situado a la izquierda del mínimo de la curva (ángulos menores) ya que en esa zona las pendientes de las curvas de reflectividad antes y después de la interacción son prácticamente paralelas y, en consecuencia, el aumento en la reflectividad es directamente proporcional al desplazamiento del mínimo.

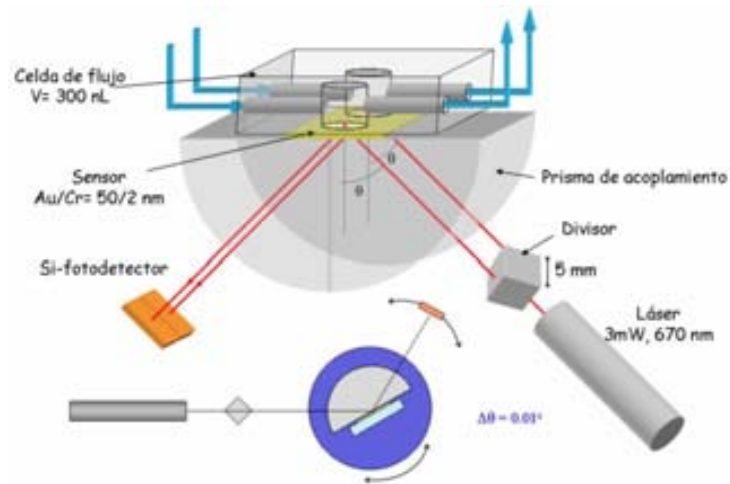
Para la monitorización de la muestra a determinar este dispositivo registra cada segundo los cambios en el índice de refracción de la disolución en contacto con la superficie sensora. Como fuente de excitación del plasmón superficial se utiliza (Figura. 2.1.a) un diodo láser, modelo RS 194-032 (Amidata, España), que emite luz a una longitud de onda de 670 nm con una potencia de 3 mW. Para habilitar el uso de dos canales de medida, el haz láser se divide en dos haces de la misma intensidad mediante un divisor de haz, específicamente fabricado para este fin, y que consiste en un cubo de vidrio de 5 mm de lado mediante el que se obtiene una separación de 3.1 mm entre ambos haces. Esta configuración permite realizar dos medidas independientes por cada canal o bien utilizar uno de ellos como canal de referencia. Los dos haces de luz se hacen pasar por un prisma de acoplamiento óptico con un índice de refracción $n = 1.52$ a través del cual la luz incide en la parte posterior de una placa de cristal de 10 mm x 10 mm x 0,3 mm, que se encuentra en contacto con el prisma por medio de un aceite de acoplamiento del mismo índice de refracción. La parte anterior de esta placa está cubierta por una capa de titanio de 2 nm y sobre esta, una capa de 45 nm de oro (Ssens, Holanda) en contacto con dos cubetas de flujo por las que se hace fluir las disoluciones que se pretenden analizar. La capa de Titanio se utiliza para aumentar la adhesión entre la lámina de oro y el vidrio.

Antes de cada medida la superficie de oro se limpia con tricloroetileno, acetona, etanol y agua, en cuatro pasos sucesivos realizados en este orden, por inmersión en cada una de estas soluciones durante 1 min en el que la placa sensora se somete a ultrasonido. Seguidamente se seca bajo flujo de nitrógeno y se sumerge en una solución piraña (30% de H_2O_2 y 70% de H_2SO_4) durante unos segundos para eliminar cualquier resto orgánico. A continuación la placa se introduce en agua y se seca nuevamente bajo flujo de nitrógeno.

El sistema de microfluídica del biosensor está formado por las celdas de flujo y por el conjunto de bombas y conexiones que impulsan las muestras líquidas a la superficie del sensor. Las celdas de flujo (o de medida) están fabricadas en metacrilato mediante mecanizado y dispuestas en dirección vertical tal como indica la Figura. 2.1.c Las dimensiones de las cubetas son 2 mm de diámetro y 0,1 mm de profundidad y se encuentran separadas por una distancia de 1 mm. El sellado de la celda se lleva a cabo mediante una junta tórica de Viton. El prisma se sitúa detrás de la placa sensora, utilizando el aceite del mismo índice de refracción y se asegura el sellado mediante la presión producida por el mecanismo de ajuste. De esta manera quedan definidas las dos celdas de flujo con un volumen aproximado de 300 nL cada una, contando ambas con su propio circuito de entrada y salida que se conecta al sistema de flujo y a las bombas que impulsan la muestra. Son dos bombas peristálticas las que se encargan del movimiento de los fluidos de modo que las disoluciones se hacen llegar a la superficie sensora por bombeo de los mismos a través de un circuito de tubos de teflón y dos válvulas de inyección. Una de las bombas trabaja a velocidad variable (entre 3 y 3000 $\mu\text{L}/\text{min}$) y se emplea para mantener un flujo constante sobre la superficie sensora, que llega a cada celda de medida a través de su circuito correspondiente. En éste trabajo se ha utilizado una velocidad de flujo constante de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, que solo se ha modificado en contadas ocasiones, durante los procesos de regeneración de la superficie sensora, en los que como se indicará se ha utilizado un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La función de la segunda bomba es introducir las muestras en las cubetas mediante un sistema de pulsos. Las válvulas de inyección se encuentran conectadas a través de los tubos del circuito por un lado a los canales de la bomba de velocidad fija, y por el otro, a cada cubeta. Su función consiste en introducir un volumen fijo de muestra en la corriente de buffer. La válvula de inyección

presenta dos posiciones, de carga y de inyección. En la posición de carga, la bomba de inyección llena un bucle con un volumen de 300 nL de muestra, y en la posición de inyección el volumen cargado se dirige hacia la celda de medida impulsado por la bomba de flujo continuo.

a)



b)



c)

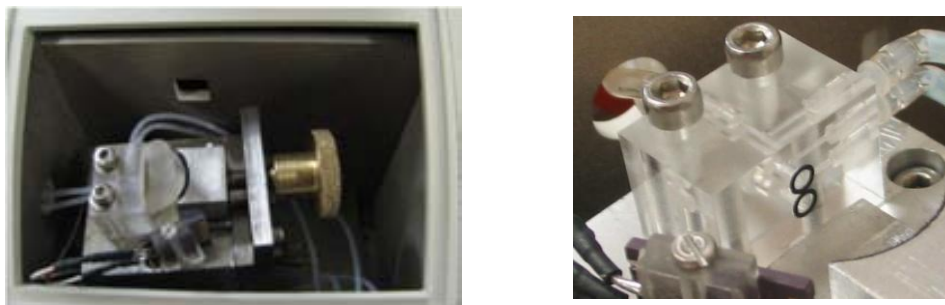


Figura 2.1. A) Esquema de la configuración y los principales componentes del biosensor SPR de Sensia. B) (izda.) Fotografías del biosensor y (dcha.) detalle de sus componentes (el módulo sensor, el diodo láser, el sistema de flujo y la electrónica). C) (izda.) Fotografía de la ventana que da acceso al usuario al modulo sensor (cubeta de flujo, prisma y fotodetector montados sobre el goniómetro) y (dcha.) detalle de la celda de flujo.

La adquisición de la señal se lleva a cabo por medio de un fotodiodo de dos cuadrantes S5870 (Hamamatsu, Japón) y la electrónica necesaria para la captura, amplificación y filtrado de la señal. El software del instrumento (Fig 2.2), implementado en Labview 7.1 (National Instruments, EEUU), facilita el manejo del instrumento, permitiendo controlar los sistemas de microfluídica, adquisición de datos y representación de la señal durante el transcurso de la operación. La adquisición de datos se adapta a los dos modos posibles de medida que permite el sistema: barrido de ángulo o a ángulo de incidencia fijo. El tratamiento de los datos se realiza utilizando el programa Origin 8 (OriginLabs, EEUU) mediante la importación de ficheros de texto ASCII. Dado que en las medidas con sensores de SPR en tiempo real no interesa conocer el valor absoluto de la señal sino el cambio producido por la interacción biomolecular los cambios de señal registrados se van a expresar como variación de señal en unidades arbitrarias.

2.2. Reactivos e instrumentación

La proteína de fusión PAG fue diseñada y preparada por la Unidad de Inmunogenética de la Universidad de Jaén (Jaén, España). La proteína A y G, el BSA, la

estreptavidina, la avidina-peroxidasa y el suero humano se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Todos los derivados de la biotina, biotina-LC-hidrazida, sulfon-NHS-LC-biotina, NHS-PEG₄-biotina y el amino-PEG₂-biotina se adquirieron en Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois, EEUU).

Respecto a los reactivos no biológicos, los alcanotioles ácido 16-mercaptohexadecanóico (MHDA) y 11-mercaptoundecanol, junto con los reactivos de activación 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), la etanolamina, el periodato sódico (NaIO₄) y el dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) utilizado para el revelado del ELISA también se adquirió en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los derivados del polietilenglicol (PEG) utilizados fueron suministrados por Jenkem Technology (Beijing, R. P. China). El PBS utilizado contiene fosfato 10 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2,7 mM, y su diferencia con el PBST es únicamente el contenido en Tween 20. El buffer acetato utilizado en la inmovilización se preparó con ácido acético y acetato sódico a una concentración de 10 mM. Todos los componentes del PBS o PBST, acetato, MES (ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico) y demás buffers y soluciones de elución o regeneración utilizados en los inmunoensayos, ELISA y purificación de anticuerpos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), excepto los ácidos acético y clorhídrico, que al igual que los solventes orgánicos (tricloroetileno, acetona, etanol), el ácido sulfúrico y el peróxido de hidrógeno utilizados en la limpieza de las placas sensoras, fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El agua utilizada tanto para la preparación de reactivos como para el lavado de placas sensoras o mantenimiento de un flujo continuo en el biosensor, fue agua ultrapura MilliQ.

En cuanto a la instrumentación (independiente del biosensor), la determinación de la concentración de anticuerpos y demás proteínas, previamente a su inyección en el SPR, se realizó en un espectrofotómetro UV-2400 de Shimadzu. Para la realización del ELISA se utilizaron placas de Nunc Maxisorp (Roskilde, Dinamarca) y un lector de placas Spectramax M2e de Molecular Devices Inc (Reino Unido). Para la purificación por afinidad de los anticuerpos se utilizaron las columnas de 1 mL HiTrap Protein G y

HiTrap NHS-activated, y para su diálisis las columnas desaladoras PD-10, todas ellas suministradas por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). El chip sensor de estreptavidina fabricado comercialmente fue suministrado por Xantec bioanalytics GmbH (Münster, Alemania).

2.3. Hormonas y Anticuerpos

Las hormonas utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Parlow del National Hormone & Peptide Program (NHPP) del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) de Torrance, California (USA). La hGH 22K es de origen recombinante, mientras que la hGH 20K y la hTSH, provienen de muestras biológicas con un alto grado de purificación. La hTSH presenta una actividad de 7.54 IU/mg.

Todos los anticuerpos utilizados en este trabajo son monoclonales y del tipo IgG1. El único anticuerpo adquirido comercialmente es el anti-BSA, que fue obtenido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los anticuerpos empleados para la determinación de la hGH, el mAc hGH-12, mAc hGH-25 y mAc hGH-33, y los empleados para la determinación de la hTSH, el mAc hTSH-2 y mAc hCG-21, fueron suministrados por el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid, España) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), donde han sido producidos y caracterizados. Estos anticuerpos fueron obtenidos a partir de ratones inmunizados con las distintas hormonas. Aquellos ratones, cuyo suero presentaba un mayor título frente al antígeno, fueron seleccionados para experimentos de fusión celular, con el objeto de inmortalizar las células productoras de los anticuerpos de interés [2]. En dichos experimentos se emplearon las células provenientes de los bazos o ganglios linfáticos de los animales inmunizados en cuyo suero se encontró una respuesta específica frente a las hormonas. Dichas células fueron fusionadas con el mieloma P3X63-Ag8.653 utilizando polietilenglicol (PEG) mediante los protocolos previamente descritos [2]. Se analizó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos frente a los antígenos empleados en los sobrenadantes de cultivo de los híbridos que crecieron, mediante técnicas de enzoinmunoensayo (EIA) y los híbridos positivos se clonaron

por dilución límite. La subclase de los anticuerpos se determinó por EIA usando anticuerpos específicos marcados con peroxidasa (Southern Biotechnology, EEUU). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados por precipitación con sulfato de amonio [2] a partir de los correspondientes líquidos ascíticos. La afinidad y especificidad de los anticuerpos se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) y EIA. En la Tabla 2.1 se presentan las características de especificidad y afinidad de los anticuerpos.

Tabla 2.1. Anticuerpos seleccionados para el ensayo SPR.

mAc	Especificidad	Afinidad (nM)	Isotipo
hGH-12	hGH (22K, 20K)	3	IgG ₁
hGH-25	hGH 22K	7,5	IgG ₁
hGH-33	hGH 20K	2,2	IgG ₁
hTSH-2	hTSH	15	IgG ₁
hCG-21	subunidad α de hTSH, hLH, hFSH y hCG	20	IgG ₁
anti-BSA	BSA	N/C	IgG ₁

2.4. Procedimientos de inmovilización en flujo y ex-situ

En la primera etapa de la inmovilización de anticuerpos se han empleado tanto, procedimientos de inmovilización en flujo, realizados en el sensor, como ex-situ, llevados a cabo fuera del sensor. En los distintos métodos utilizados en este trabajo la molécula receptora en cada caso (el propio anticuerpo o la molécula utilizada para el anclaje del mismo) se ha inmovilizado a través de su unión a una SAM previamente formada sobre la superficie sensora, o mediante su unión directa a la superficie sin modificar. Este segundo caso solo se ha dado en el método de inmovilización de anticuerpos mediante el uso de la proteína de fusión PAG, en el que esta molécula se ha unido a la superficie sensora por un proceso de autoensamblaje. Mientras que el trabajo en flujo agiliza el proceso de inmovilización, la estrategia ex-situ garantiza un tiempo

suficiente para el autoensamblaje de moléculas y reduce la probabilidad de variaciones en la distribución de las mismas entre diferentes experimentos debido a variaciones en el flujo del biosensor.

El autoensamblaje del PAG se ha realizado explorando tanto la estrategia en flujo como ex-situ, ambas descritas detalladamente en el capítulo correspondiente. Sin embargo, debido a que la modificación de la superficie sensora con una SAM es la primera etapa de un proceso de inmovilización covalente que conlleva un tiempo más largo de trabajo que el que precisa el método de inmovilización basado en el uso del PAG, el autoensamblaje de la SAM solo se ha realizado mediante la estrategia ex-situ.

El procedimiento de inmovilización covalente ha seguido en todos los casos el mismo protocolo, que ha consistido en dos etapas. En la primera de ellas se ha llevado a cabo la formación de una SAM sobre la superficie sensora. Como se comentó en el apartado 1.4, además de prevenir el impedimento estérico entre moléculas de anticuerpo, las SAM mixtas en las que el alcanotiol reactivo se diluye con un hidroxialcanotiol de cadena más corta han demostrado su eficiencia en la prevención de la desnaturalización de proteínas y la fisisorción de las mismas durante el proceso de inmovilización. Por esto motivo en este trabajo se han escogido el ácido mercaptohexadecanóico (MHDA), como molécula funcional, y el mercaptoundecanol (MUOH) como molécula espaciadora para la formación de la SAM. Ambos alcanotioles se prepararon en etanol a una concentración de 5 mM y a partir de estas soluciones se prepararon distintas mezclas de MHDA y MUOH variando la proporción de los mismos según la fracción molar de MHDA deseada. Para la formación de la SAM sobre la superficie sensora se depositó sobre la misma una gota (150 μ L) de la solución con la mezcla de los alcanotioles y se dejó incubar toda la noche (14-16 h) para que tuviera lugar el ensamblaje ex-situ de la monocapa. Posteriormente se limpió la placa sensora, primero con etanol y seguidamente con agua para retirar el exceso de alcanotiol sobre la superficie, y se secó suavemente bajo flujo de nitrógeno para su colocación en el sensor. La segunda etapa del proceso de inmovilización comienza con la activación de la SAM mediante la inyección de una mezcla de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M preparada en buffer MES pH 5,4, que se realizó tras establecer un flujo continuo de agua. Seguidamente se inyectó una solución de la molécula receptora correspondiente en cada caso según el método de inmovilización de

anticuerpo empleado, para la unión de la misma a la SAM mediante el acoplamiento entre sus grupos amino (o hidrazida en el caso de la biotina) y los grupos carboxilo activados del MHDA. En tercer lugar se inyectó una solución de HCl 0,1 M con el objeto de retirar de la superficie todas aquellas moléculas no unidas covalentemente. Finalmente se hizo fluir una solución de etanolamina 1 M a pH 8.5 para bloquear los grupos activados que permanecieran sin reaccionar. En la Figura 2.2 se muestra un sensorgrama representativo del proceso de inmovilización de un anticuerpo.

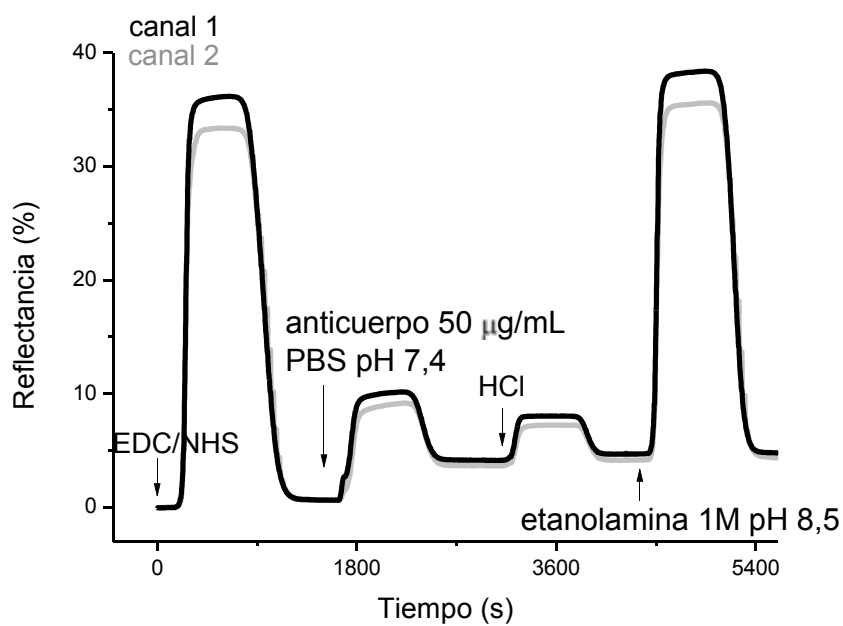


Figura 2.2. Sensorgrama representativo del proceso de inmovilización covalente de un anticuerpo.

2.5. Formatos de inmunoensayo

Los inmunoensayos realizados en este trabajo se han basado en los formatos directo y de tipo sándwich. En estos, la determinación del analito se ha llevado a cabo en PBST o en suero diluido con PBST-S en proporción 1:1. Este buffer se diferencia del PBST por su mayor concentración salina (NaCl 500 mM) y contenido en Tween 20 (0,1%), condiciones que como se ha demostrado en trabajos previos del grupo, ejercen una fuerte inhibición de la adsorción inespecífica que tiene lugar cuando se analizan

muestras de suero [3]. El rango de concentración de analito utilizado ha variado entre los distintos ensayos entre 0,5 ng/mL y 5 mg/mL, realizándose todas las medidas por triplicado. El promedio de las señales de SPR obtenidas en cada caso se ha representado frente a la concentración de analito correspondiente, y las curvas de calibrado obtenidas se han ajustado a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (1) o a la ecuación de una recta (2), dependiendo del rango de concentración ensayado.

$$(1) y = A + (B-A) x^n / k^n + x^n$$

$$(2) y = A + Bx$$

A partir de la curva de calibrado se han calculado el límite de detección (LOD) y el rango lineal del inmunoensayo. El límite de detección es la concentración más pequeña de analito que produce una señal que difiere significativamente de cero a un determinado grado de confianza. En este trabajo el cálculo del límite de detección se basó en el criterio más estandarizado en los laboratorios por el cual se selecciona la concentración de analito que produce una señal SPR cuyo valor es tres veces la desviación estándar de la muestra blanco. En cuanto al rango lineal, es el intervalo de concentración en el que la determinación analítica es de gran precisión y exactitud. Dicho intervalo se extiende desde un mínimo de concentración denominado límite de cuantificación (LOQ) hasta la concentración, denominada límite de linealidad (LOL), en que la curva de calibrado se desvía de la linealidad. En este trabajo se ha utilizado el cálculo más standard para obtener el valor de LOQ, de la forma que este se corresponde con la concentración de analito que produce una señal 10 veces superior a la del blanco. Para determinar el límite de linealidad se ha seleccionado la zona de la curva de calibrado que se ajusta a la función de una recta con un valor de R^2 igual o superior a 0,98.

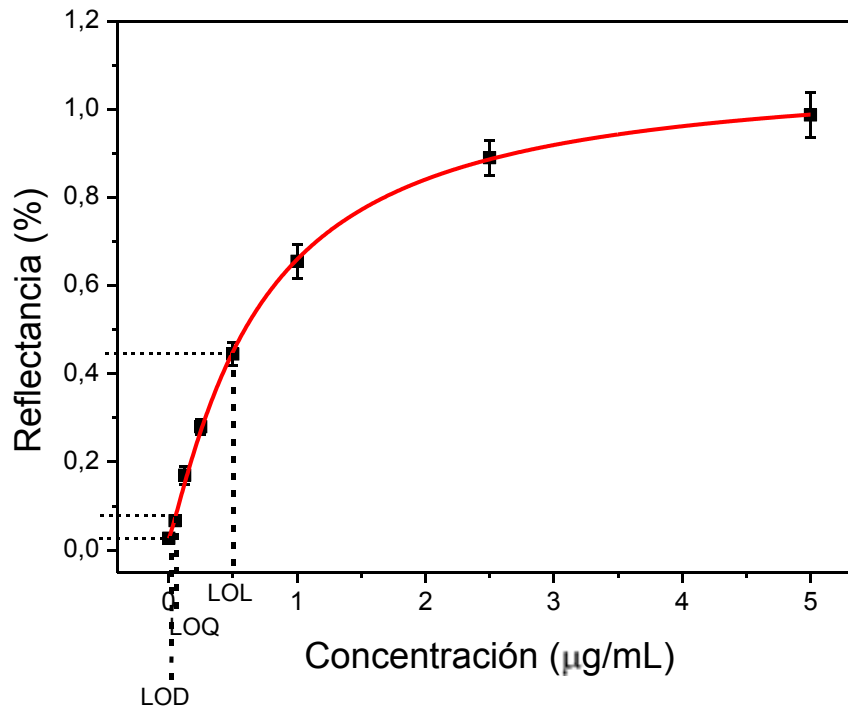


Figura 2.3. Curva sigmoideal dosis-respuesta obtenida al medir la señal de respuesta a diferentes concentraciones de analito. Los parámetros de sensibilidad aparecen definidos como: LOD y LOQ.

2.6. Referencias.

- 1 Treviño J., Calle A., Rodríguez-Frade J.M., Mellado M. and Lechuga L.M., *Single- and multi-analyte determination of gonadotropic hormones in urine by Surface Plasmon Resonance immunoassay*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **647**:202-209.
- 2 Harlow E. and Lane D., *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. **XIII**:726.
- 3 Treviño J., Calle A., Rodríguez-Frade J.M., Mellado M. and Lechuga L.M., *Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay*. *Talanta*, 2009. **78**:1011-1016.

- www.mondragon-corporation.com
- www.sensia.es

3. Inmunoensayo para la detección de isoformas de la hormona de crecimiento humana y su aplicación en test anti-doping

3.1. Introducción

3.1.1. Hormona del crecimiento humana (hGH) y su uso como agente dopante

La hormona de crecimiento humana (hGH), también denominada Somatotropina, es una proteína no glicosilada de cadena única compuesta por 191 aminoácidos y con un peso molecular de 22 kDa, involucrada en multitud de procesos biológicos relacionados con la estimulación del crecimiento y el desarrollo de órganos y tejidos en humanos [1]. Además de ser vital en el periodo postnatal y hasta que concluye la etapa de crecimiento del individuo, la actividad de la hGH sigue siendo importante durante toda la vida debido a su participación en el metabolismo lipídico, proteico y glucídico, destacando su papel

en la estimulación de la lipólisis y la síntesis de proteínas, así como su acción hiperglucemiante [2]. En realidad, la hGH circulante es una mezcla compleja de formas moleculares diferentes originadas genéticamente o por modificaciones post-traduccionales, donde la de 22 kDa (hGH 22K) representa la isoforma más importante, tanto por su abundancia como por su actividad biológica [3]. Existen dos genes que codifican la hGH, el gen GH-N que se expresa en la adenohipófisis (parte anterior de la glándula pituitaria), y el gen GH-V, expresado en la placenta [4]. El gen GH-N es responsable de la síntesis de las principales variantes de la hormona. Las formas más representativas se distinguen según su peso molecular, y pueden existir en forma de dímeros y oligómeros. Estas son la hGH 22K, 20K, 17K y 5K, de las que la 22K representa el 65-80% del total de la hormona [5]. La segunda isoforma más abundante es la hGH de 20 kDa, que constituye el 5-10% de la hormona y es originada por splicing alternativo del mismo transcrito primario que da lugar a la hGH 22K. Aunque en algunos estudios se han asociado a la isoforma 20K propiedades lipolíticas y anabólicas, similares a las de la 22K, la efectividad de las mismas es mucho menor que en el caso de esta última, y no se conoce su función biológica al igual que se desconoce la importancia de las demás isoformas [6]. El gen GH-V expresa variantes de 22 y 20 kDa con estructuras levemente distintas a las de origen pituitario [7].

La síntesis y secreción de la hGH, llevada a cabo por las células somatotropas de la adenohipofisis, está regulada por una compleja red de mecanismos neurales, metabólicos y hormonales, en la que el control principal lo ejerce el hipotálamo por medio de dos hormonas, también de naturaleza peptídica, la hormona liberadora y hormona inhibidora de la hGH, GHRH y Somatostatina (SRIF), respectivamente [8]. La regulación llevada a cabo por ambas, da lugar a una secreción pulsátil por parte de las células que sigue un ritmo circadiano, en el que los picos plasmáticos más elevados se registran durante las horas de sueño. Además de la GHRH, la Ghrelina, un péptido de 28 aminoácidos sintetizado principalmente en el estómago, juega un papel clave en la liberación de la hGH, ejerciendo una fuerte estimulación de la misma [9]. Por otro lado existen otros factores que influyen de forma importante sobre los niveles de la hormona. Mientras que en los periodos de crecimiento y pubertad de las personas la secreción de hGH es máxima; después, tanto la periodicidad como la amplitud de los pulsos de

secreción, caen. Además de la edad, el género también es determinante en los niveles de hGH, siendo más altos en mujeres que en hombres [10]. El ejercicio físico es un potente estimulador de la liberación de hGH, cuya concentración también se ve aumentada con el sueño o en situaciones de estrés [11]. También la dieta influye en la fluctuación de los niveles circulantes de la hormona. Todos estos factores afectan de la misma forma a las distintas variantes de la hGH, por lo que la proporción entre ellas la proporción de estas se mantiene constante en un mismo individuo, donde los niveles plasmáticos de la hGH total pueden oscilar entre mínimos difíciles de detectar (por debajo de 0.03 ng/mL) y picos de 50-100 ng/mL [12]. Aproximadamente un 50% de la hormona en plasma se encuentra unida a la proteína transportadora GHBP y gran parte de su actividad está mediada por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), principalmente sus efectos anabólicos y la estimulación del crecimiento [13]. La síntesis y liberación de la IGF-I, de origen principalmente hepático, depende directamente de la secreción de hGH, que también estimula la síntesis de otros factores como las proteínas de unión al IGF (IGFBP). Los efectos de la hGH superan largamente su presencia en la circulación debido a la mayor vida media que presentan los factores dependientes de la hormona en plasma. Existe un circuito de tipo feed-back entre hGH e IGF-I de forma que el aumento de IGF-I circulante inhibe la secreción de la hormona, por estimulación de la secreción de la Somastostatina e inhibición de la de GHRH o incluso por su acción directa sobre las células de la adenohipófisis productoras de la hGH. En la Figura 3.1 se muestra de forma esquemática el sistema principal de control de la síntesis y secreción de la hormona hGH.

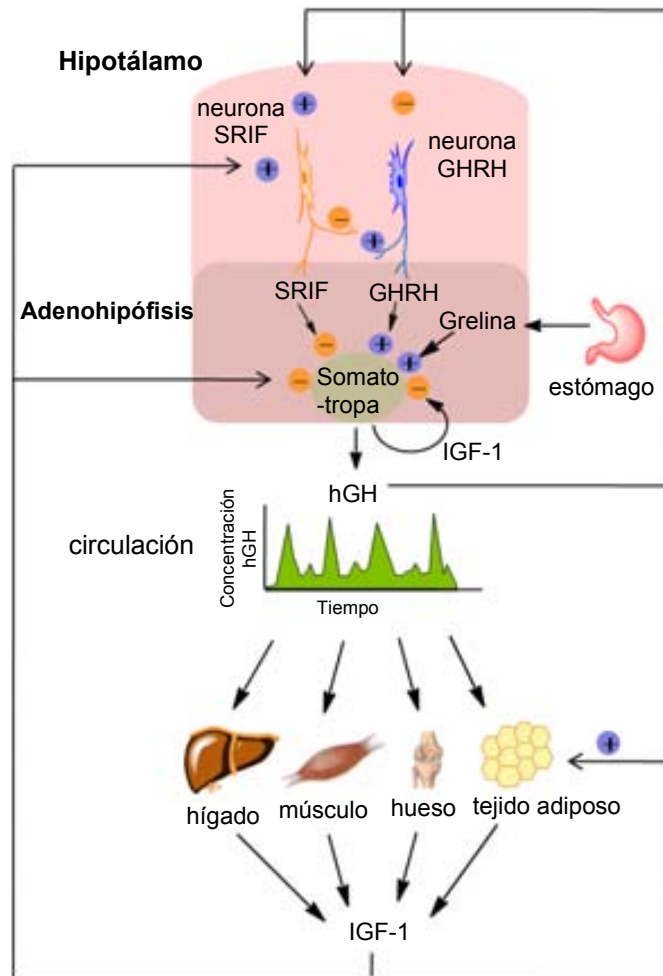


Figura 3.1. Representación gráfica del sistema principal de control de la síntesis y secreción de la hGH.

Además de ser utilizada como agente terapéutico para tratar problemas relacionados con su deficiencia, desde hace más de 40 años la hormona de crecimiento (GH), es considerada en el mundo del deporte como una herramienta útil para mejorar el rendimiento físico y es ampliamente consumida por deportistas durante entrenamientos y competiciones [14]. Parece ser que el origen del dopaje en el deporte se remonta a la antigüedad. Los atletas que participaban entre los siglos IV a VIII a. C. en las Olimpiadas de la antigua Grecia, utilizaban dietas especiales y sustancias estimulantes como extractos de plantas, hongos o animales antes de las competiciones. El “doping” en los deportes modernos fue divulgado fiablemente desde la segunda mitad del siglo XIX [14]. El primer caso documentado tuvo lugar en 1865, en natación, durante el acontecimiento de la carrera del canal de Ámsterdam, cuando varios nadadores que competían en la

travesía fueron acusados de tomar una droga desconocida [15]. La primera muerte causada por dopaje conocida en 1896, cuando el ciclista inglés Linton murió debido a la toma de efedrina durante la carrera París-Burdeos [16]. En 1952 se encontraron drogas en taquillas de atletas durante los juegos de patinaje sobre hielo en Oslo, y ocho años más tarde moría el ciclista danés K. Jensen por abuso de anfetaminas durante los Juegos Olímpicos de Roma [15]. Pese al dramático incremento del uso de sustancias dopantes a comienzos de los años 60, el Comité Olímpico Internacional (COI), creado en 1894, no decidió establecer controles antidoping hasta los Juegos Olímpicos de México en 1968, un año después de la muerte del ciclista británico Tom Simpson durante el Tour de Francia, tras haber ingerido diversos estimulantes [17]. Aparentemente la GH hizo su debut en los círculos deportivos alrededor del año 1970 cuando el culturista Peter Grymkowski comenzó a experimentar con ella. Como en aquellos años resultaba muy difícil obtener hGH, empleó GH de mono con la esperanza de que pudiera funcionar también en humanos [18]. Hasta el año 1980, la hGH utilizada se obtenía de cadáveres humanos, razón por la que su disponibilidad en el mercado era muy limitada. Sin embargo, el hallazgo de personas que habían sido tratadas con esta hormona en las décadas de los 60-70, y habían desarrollado una enfermedad neurológica degenerativa conocida como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob [19], aceleró la aprobación por parte de la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos) de los EEUU de la producción de hGH sintética (hGHr) igual a la isoforma 22K, mediante la tecnología del ADN recombinante [20]. Fue entonces, a partir de mediados de los años 80, cuando se incrementó considerablemente la disponibilidad de la hormona del crecimiento humana y, paralelamente, su consumo en el mundo del deporte, tanto en el gremio de los culturistas como entre deportistas de alto nivel [21]. En 1985 el COI incluyó la hGHr en su lista de sustancias prohibidas a pesar de la ausencia de un test legítimo para la detección del dopaje con la misma [22]. Aún así, lejos de impedir su uso por los deportistas, la hGHr se convirtió en la nueva droga de elección para muchos atletas. Aunque conocer la incidencia real del uso no terapéutico de la hormona en el mundo del deporte es complicado, dada la falta de estudios estadísticos, el propio COI publicó un documento en 1995, donde se hacía referencia a la hGHr como una de las sustancias más utilizadas

en el deporte de alto nivel, por considerarse el agente anabolizante más eficaz de los disponibles hasta entonces y por no existir ningún medio de detección del dopaje con esta hormona, y por lo tanto, ningún riesgo de descalificación durante las competiciones [23]. Sin embargo, no existen evidencias científicas que demuestren que la administración de hGHr a personas que no presentan déficit de esta hormona, sean sedentarias o deportistas experimentados, se acompañe de efectos positivos a nivel del rendimiento físico o de la composición corporal. La mayor parte de los estudios que sugieren que la hGHr tiene un efecto anabólico en los adultos se han realizado con pacientes que presentaban déficit de esta hormona [24].

Uno de los casos más famosos de dopaje con hormona del crecimiento salió a la luz en 1988, después de que Ben Johnson ganara la final de los 100 metros en los Juegos Olímpicos de Seúl. La investigación oficial del caso, reveló que este atleta había utilizado hGHr y esteroides anabolizantes en su preparación para esos Juegos Olímpicos, lo que le costó la pérdida de la medalla de oro [14]. En esta misma comisión de investigación una de las mejores especialistas de los 100 m, la atleta Angela Taylor Issajenko, reconoció haber tomado hGHr aconsejada por el doctor Robert Kerr, uno de los pocos médicos que reconocen haber recetado sustancias dopantes a miles de deportistas para mejorar su condición física [18]. Otro caso de deportista de élite sancionado por consumir hGHr entre otras sustancias no autorizadas es el de Marion Jones, quién tras confesar ante un tribunal de Estados Unidos en 2007 haber consumido agentes dopantes durante los Juegos Olímpicos de Sydney (año 2000), le fueron retiradas las cinco medallas olímpicas que obtuvo en los mismos [14]. Además de numerosas estrellas del atletismo, profesionales de otros deportes como la natación, el fútbol o el ciclismo, han sido también relacionados con el consumo de hGHr en combinación con esteroides anabolizantes. Por otro lado estudios estadísticos demuestran que existe un elevado consumo de la hormona entre adolescentes aficionados a deportes como el culturismo o el fútbol [25].

3.1.2. Métodos para la detección de dopaje con hGH recombinante

Aunque su uso continua estando prohibido por la máxima autoridad anti-doping, actualmente, la Agencia Mundial Antidopaje (AMA), así como por la mayor parte de organismos deportivos internacionales, la hGHr sigue considerándose hoy día una de las sustancias más utilizadas para mejorar el rendimiento deportivo. Sin embargo, el desarrollo de un método fiable y sensible para la detección del dopaje con hGHr, ha sido y continúa siendo el objetivo de muchos estudios, de manera que las pruebas rutinarias de los controles anti-doping actuales no incluyen un test para ello y los métodos desarrollados hasta el momento son principalmente utilizados para investigación [4]. Puesto que los niveles de concentración de hGH en orina son el 0,1-1% de los encontrados en sangre, este tipo de muestra se utiliza con más frecuencia en la detección de hGHr [26]. Son varias las razones que hacen tan complicada la detección de la hGHr. En primer lugar la hormona recombinante es estructuralmente idéntica a la isoforma 22K nativa, lo que las hace analíticamente indistinguibles. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, existe una amplia fluctuación fisiológica de los niveles de concentración de la hormona en sangre, debido a la naturaleza pulsátil de su secreción y a la influencia que numerosos factores externos ejercen sobre estos. Además la vida media de la hGH circulante limita la detección de la hormona a un corto periodo de tiempo. Todos estos factores hacen imposible conocer si ha existido administración de hGHr a partir de una simple cuantificación de la concentración de la hGH total o de la hGH 22K, y convierten el desarrollo de un test robusto para detectar el uso fraudulento de la hGH en el deporte, en uno de los mayores desafíos en la lucha contra el dopaje [27, 28].

Para abordar estos problemas se han investigado principalmente dos estrategias alternativas, un método directo de detección de hGHr, del cual han surgido distintas variantes, y un método indirecto [29]. La estrategia de detección directa del dopaje con hGHr, denominada “método de las isoformas”, se basa en la abundancia relativa de la variante 22K en comparación con las otras isoformas, tras la administración de hormona. Como se comentó anteriormente el aumento de los niveles de hGH conlleva un aumento

de IGF-I cuya presencia en plasma inhibe la liberación de la hormona debido a un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa. De esta forma la disminución de los niveles circulantes de todas las isoformas de la hGH pituitaria (de origen endógeno), fracción denominada pit-hGH, resulta en una elevación de los niveles de hGH 22K que corresponde a la hGHr administrada, fracción denominada rec-hGH. El método, desarrollado y patentado por Strasburger y col. [30] consiste en la realización de dos inmunoensayos, uno para determinar exclusivamente los niveles de rec-hGH, y otro ensayo para determinar la fracción pit-hGH. El primer ensayo utiliza como anticuerpo captura un anticuerpo monoclonal que presentan una alta afinidad por la hGH 22K y en el segundo ensayo el anticuerpo captura presenta baja afinidad por esta por esta isoforma. Un tercer anticuerpo monoclonal es utilizado como anticuerpo de detección en los dos ensayos. De esta manera, el cálculo del ratio rec-hGH:pit-hGH permite la determinación de la abundancia relativa de la variante 22K, por tanto de la hGHr administrada.

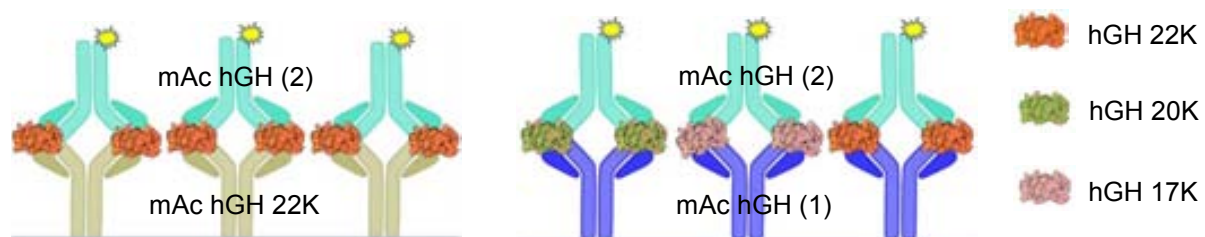


Figura 3.2. Inmunoensayos realizados en el método de las isoformas basado en el cálculo rec hGH:pit hGH. La relación entre la concentración de hGH 22K determinada en un primer ensayo (izq.), y concentración de hGH total, determinada en un segundo ensayo (dcha.), permite detectar el dopaje con hGHr.

La posterior disponibilidad de un anticuerpo altamente específico para la isoforma hGH 20K ha permitido el desarrollo de una variante del método que se basa en la determinación de la relación hGH 22K: hGH 20K en plasma. Esta relación es aproximadamente de 9:1 y parece ser independiente del sexo, edad, ejercicio físico e incluso ciertas patologías [31]. El notable incremento de esta proporción tras la administración de hGHr ha sido descrito en varios estudios de dopaje, sugiriendo este parámetro como el indicador más apropiado para la detección de dopaje con hGHr [32],

aunque aún no se han comparado ambas estrategias de detección de dopaje con hGHr. Sin embargo, debido a la corta vida media de la hGHr en sangre, las dos variantes del método de las isoformas están limitadas a las primeras 3-5 o 24-48 horas tras la administración de la hormona, dependiendo de si es administrada por vía intravenosa (pico máximo a las 60 min) o intramuscular (pico máximo a las 2-6 h), respectivamente [20].

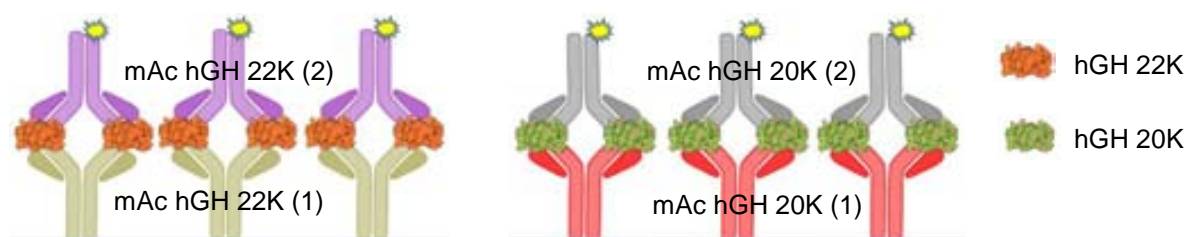


Figura 3.3. Inmunoensayos realizados en el método de las isoformas basado en el cálculo hGH 22K:hGH 20K. La relación entre la concentración de hGH 22K determinada en un primer ensayo (izq.), y concentración de hGH 20K, determinada en un segundo ensayo (dcha.), permite detectar el dopaje con hGHr.

El segundo método empleado actualmente para el desarrollo de un test anti-doping es un método indirecto de la medida de la concentración plasmática de la hGHr, que amplía la ventana de detección de la misma. Este método se basa en los efectos fisiológicos de la hormona que producen una elevación de los niveles circulantes de proteínas del eje IGF-IGFBP, con mayor vida media (de 90 a 500 h) y niveles de concentración en plasma más estables que la hGH [33]. La determinación de los niveles circulantes de estas proteínas, constituyen la base de este segundo método de detección de dopaje con hGH [27]. Aunque los niveles plasmáticos de estas proteínas en un individuo se mantengan más estables que los de la hGH, existe sin embargo una amplia variación de los mismos entre individuos dependiendo de la edad, género, peso corporal, actividad física, dieta y etnia entre otros factores [34]. Esta variabilidad interindividual dificulta la definición del nivel de corte a partir del cual sea probable que se haya producido un dopaje con hGH [35]. Además existe una gran heterogeneidad en los

anticuerpos empleados, por lo que la implementación de este método depende en gran medida de poder establecer inmunoensayos estandarizados [36].

Entre los métodos de detección directa de la hGHr las técnicas más utilizadas se basan en inmunoensayos tipo sándwich que pueden ser enzimáticos (ELISA), inmunofluorimétricos (IFMA), o inmunoquimioluminométricos (ICMA). La sensibilidad que puede alcanzarse con estas técnicas es aproximadamente de 2 pg/mL [4]. Para la determinación de proteínas dependientes de la hGH (método indirecto de detección de hGHr) las técnicas más empleadas son RIA, ELISA y sistemas autoanalizadores de inmunoensayos [37].

3.2. Esquema básico del ensayo de detección de las isoformas hGH 22K y hGH 20K

El método que se diseñó para la determinación de las isoformas 22 y 20K de la hGH se basó en el desarrollo de un inmunoensayo tipo sándwich. En el inmunoensayo se utilizaron tres anticuerpos, el mAc hGH-12 que reconoce a ambas isoformas con la misma especificidad [38], el mAc hGH-25 que es selectivo para la isoforma hGH 22K y el mAc hGH-33 que es selectivo para la hGH 20K. Con estos tres anticuerpos se diseñó un inmunoensayo en el que el mAc hGH-12 se utilizó como anticuerpo de captura, y por tanto, para la funcionalización de la superficie sensora, y los otros dos anticuerpos se utilizaron para la detección selectiva de ambas isoformas. La preparación de la superficie de mAc hGH-12 requirió la optimización de un protocolo de funcionalización basado en el uso del sistema biotina/estreptavidina, descrito en el apartado 1.4, para dirigir la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie. La evaluación de las distintas condiciones utilizadas durante este proceso de optimización se llevó a cabo mediante la detección de la isoforma hGH 22K. El motivo de la elección de la 22K en lugar de la variante de 20 kDa fue la mayor disponibilidad comercial y menor coste. En la Figura 3.2 se muestra un esquema del método empleado.

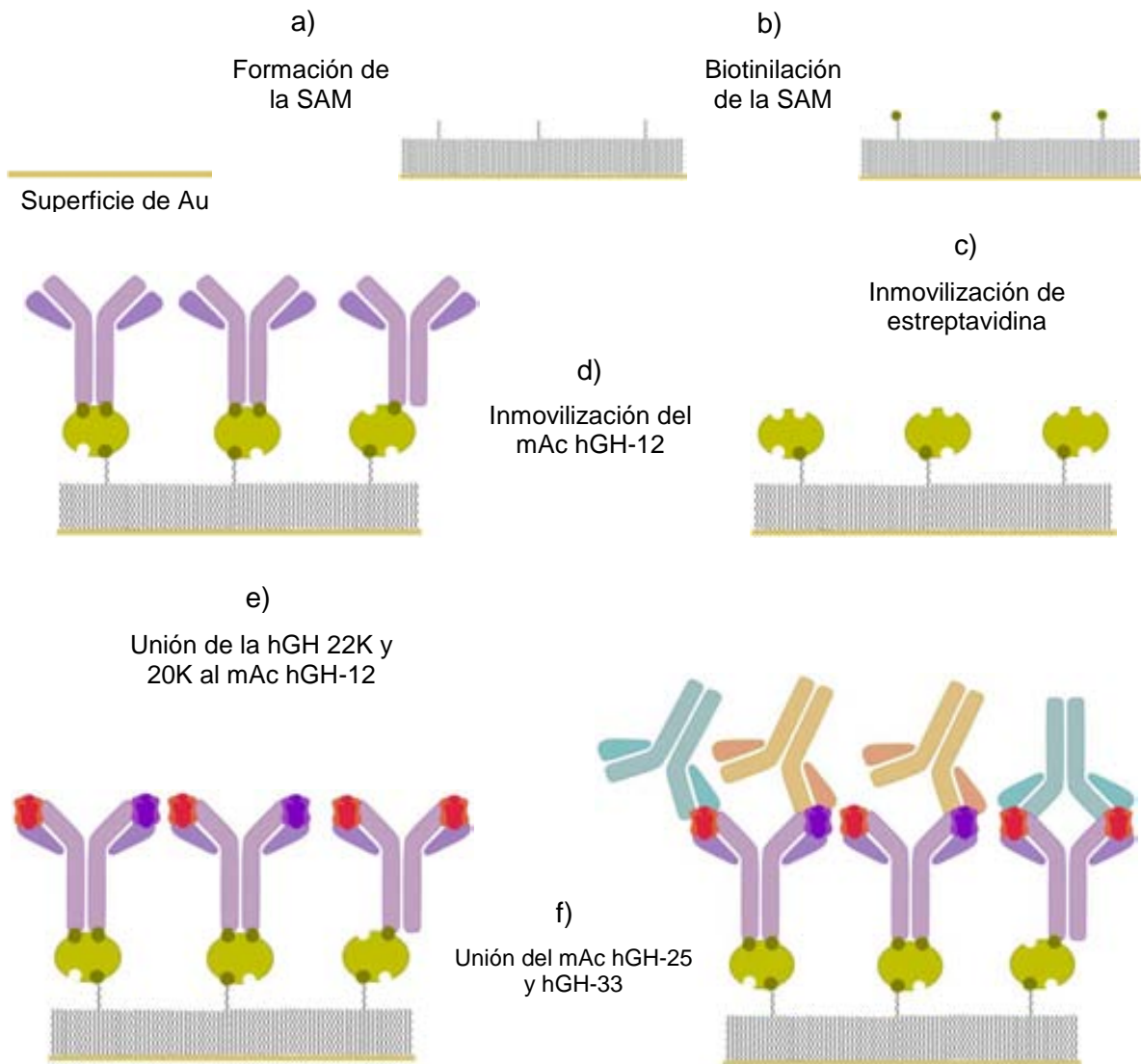


Figura 3.2. Representación esquemática del método empleado para la determinación de las isoformas hGH 22 y 20K. A) Formación de la SAM, b) biotinilación de la SAM, c) inmovilización de estreptavidina, d) inmovilización del anticuerpo mAc hGH-12 biotinilado, e) unión de las isoformas de la hGH y f) detección de la hGH 20 y 22K mediante el reconocimiento por los anticuerpos selectivos mAc hGH-25 y mAc hGH-33.

3.3. Inmovilización del anticuerpo anti-hGH (mAc hGH-12) mediante el sistema biotina/estreptavidina

La inmovilización de anticuerpos mediante el sistema biotina-estreptavidina requiere la previa biotinilación del anticuerpo, y la formación de una monocapa de

estreptavidina sobre la superficie. Para la formación de esta última, se funcionalizó primero la superficie sensora con una monocapa de alcanotioles que posteriormente se biotiniló para proceder a la inmovilización de la estreptavidina. Como se ha comentado anteriormente, es muy importante controlar la densidad de puntos de unión del anticuerpo a la superficie para prevenir en lo posible el impedimento estérico entre moléculas del mismo, que dificulta su inmovilización. En este caso, la eficiencia de la inmovilización del anticuerpo depende de la densidad o distribución de la estreptavidina, puesto que esta molécula funciona de punto de anclaje del anticuerpo a la superficie. Con la intención de formar una monocapa de estreptavidina en la que la proteína presentara la distribución óptima que permitiera conseguir la máxima eficiencia en la inmovilización del mAc hGH-12, se llevó a cabo un estudio del efecto de la variación de la composición de la SAM, formada por una molécula que presentaría la biotina para el anclaje de la estreptavidina y una molécula inerte que funcionaría de molécula espaciadora, sobre el rendimiento del inmunoensayo para la detección de hGH. Por otro lado, para la biotinilación del mAc hGH-12 se procedió previamente a su purificación por afinidad, con la que se consigue un alto grado de purificación que garantiza que en el proceso de biotinilación solo se modifiquen las moléculas de mAc hGH-12, previniendo así que la posible presencia de otros anticuerpos reduzca la eficiencia de la inmovilización del anticuerpo específico.

3.3.1. Purificación y biotinilación del mAc hGH-12

Las inmunoglobulinas contenidas en líquido ascítico son purificadas mediante precipitación al añadir una solución de sulfato de amonio al 40-50%, lo que permite separarlas del resto de componentes del líquido ascítico. Es un método de purificación poco específico puesto que además de no discriminar entre distintos tipos de inmunoglobulinas, es frecuente la presencia de otras proteínas en el precipitado. Con la intención de partir de una muestra de mAc hGH-12 con un alto grado de purificación y evitar así que tras el proceso de biotinilación, exista contaminación con otras inmunoglobulinas o proteínas biotiniladas, el anticuerpo también fue purificado por cromatografía de afinidad. Para ello, se utilizó una columna de hGH 22K, previamente

preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó 1 mL a 1,7 mg/mL de hGH en buffer carbonato (NaHCO_3 0,2 M/ NaCl 0,5 M, pH 8,3) y se inyectó en la columna mediante el uso de una jeringuilla a un flujo de 1 mL/min. Inmediatamente después se sellaron los extremos de la columna y esta se mantuvo a temperatura ambiente durante 40 minutos para permitir el acoplamiento de la hormona. Para desactivar el exceso de grupos NHS activos que no han reaccionado con la hGH, y eliminar la parte de la misma unida a la columna de forma inespecífica, se realizó un procedimiento de lavado y desactivación mediante inyecciones alternas de los buffers etanolamina 0,5 M/ NaCl 0,5 M pH 8,3 y acetato 0,1 M/0,5 M NaCl , pH 4 (18 mL de cada buffer). Finalmente se inyectó 2 mL de PBS pH 7,4 para neutralizar el pH. Tanto el lavado y desactivación como el ajuste del pH se realizaron, al igual que la carga de la hGH, a un flujo de 1 mL/min. Una vez montada la columna de hGH se procedió a la purificación del mAc hGH-12 para lo que primero se preparó la muestra de anticuerpo en el buffer adecuado. La suspensión del mAc hGH-12 en la mezcla de líquido ascítico y sulfato de amonio se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm y el precipitado obtenido se redisolvió en PBS pH 7,4. Tras equilibrar la columna con este buffer se inyectó el anticuerpo a una concentración de 4 mg/mL, utilizando un flujo de 1 mL/min, el cual se empleó durante todo el proceso de purificación. A continuación se lavó la columna con 10 mL de PBS pH 7,4 para eliminar las posibles uniones inespecíficas. Finalmente se procedió a la elución del mAc hGH-12 para lo que se prepararon tres buffers distintos con la intención de establecer las condiciones más suaves, que afecten lo menos posible la estabilidad del anticuerpo. Los buffers utilizados, en el orden en que se inyectaron, fueron el acetato sódico 0,05 M/ NaCl 0,5 M, pH 4, que presenta las condiciones más suaves, el citrato 0,1 M, pH 3, y la glicina (Gly) 0,1 M, pH 2,5, siendo este último el buffer de condiciones más extremas. Solo con la solución de Gly pH 2,5 se consiguió eluir el anticuerpo, que inmediatamente después se cargó en una columna PD-10 (*desalting column*) para eliminar la Gly dializando la solución de anticuerpo en PBS.

Una vez purificado el anticuerpo se procedió a la biotinylación del mAc hGH-12 con el reactivo sulfo-NHS-LC-biotina, que reacciona con los grupos amino del anticuerpo. Para estudiar el efecto del grado de biotinylación del mAc hGH-12 sobre el

rendimiento del inmunoensayo se varió la relación molar biotina:Ac. Se prepararon cinco soluciones de 1 mL de anticuerpo a una concentración de 1 mg/mL en PBS pH 8, conteniendo cada una un volumen distinto de una solución de sulfo-NHS-LC-biotina 20 mM, de forma que presentaran un exceso molar de biotina de 5, 10, 25, 50 y 100, respectivamente. Tras incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente, el exceso de biotina sin reaccionar se eliminó mediante el uso de una columna PD 10 con la que se dializó el mAc hGH-12 en PBS pH 7,4.

3.3.2. Formación de la monocapa de estreptavidina

El primer paso para la creación de la monocapa de estreptavidina fue la funcionalización de la superficie sensora con una SAM adecuada, basada en la mezcla de los alcanotioles MHDA y MUOH. Para conseguir una densidad y distribución adecuada de estreptavidina que maximizara la eficiencia de la inmovilización del mAc hGH-12 y con ello la capacidad de unión a la hGH, se procedió a la optimización de la fracción molar de MHDA (χ_{MHDA}). Se prepararon soluciones con la mezcla de ambos alcanotioles, variando las proporciones de MHDA y MUOH para obtener en una concentración total de 250 μM , las fracciones molares de MHDA de 0,01, 0,014, 0,02, 0,034, 0,05, 0,1, 0,2 y 1. Con cada una de estas soluciones se cubrió una superficie sensora para el ensamblaje ex-situ de la SAM durante la noche. Una vez formada, se procedió a la biotilación de la SAM siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4. Tras la activación de la monocapa de alcanotioles se inyectó una solución de biotina-LC-hidrazida, preparada en buffer acetato pH 4,5 a una concentración de 5 mM, para la modificación de los grupos carboxilos de las moléculas de MHDA. Después de la biotilación de la monocapa se procedió a la inmovilización de la estreptavidina en PBST pH 7,4 a una concentración de 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, tras establecer un flujo continuo de este mismo buffer.

Por otro lado se llevó a cabo un experimento para descartar que en el procedimiento utilizado tuviera lugar la adsorción inespecífica de la estreptavidina o de la biotina. Este consistió en la funcionalización de la superficie sensora con la SAM que presentara la fracción de MHDA óptima, sobre la que se inyectó una solución 5 mM de biotina en acetato (obviando el paso de activación de la SAM) utilizando solo una de las

dos celdas de medida del sensor. En un segundo paso, sobre ambas celdas se fluyó la solución de 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina. Esta no dio lugar a respuesta en ninguna de las celdas por lo que se pudo comprobar que la unión de la estreptavidina a la superficie solo tiene lugar a través de la monocapa biotinilada de forma específica.

Alternativamente al método descrito para la formación de la monocapa de biotina, se llevó a cabo la funcionalización de la superficie sensora utilizando derivados de la molécula de PEG. El PEG, con fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, es un polímero de gran solubilidad acuosa, ampliamente utilizado en la industria como disolvente debido a que no presenta toxicidad y es biodegradable. Además, el uso del PEG para prevenir la adsorción inespecífica de moléculas en aplicaciones farmacéuticas y fabricación de dispositivos biomédicos es cada vez mayor, debido a la gran biocompatibilidad que presenta esta molécula. Existen muchos derivados del PEG disponibles comercialmente. En este trabajo se utilizaron una molécula de PEG con un tamaño de 10000 Da, tiolada en un extremo y biotinilada en el otro extremo (SH-PEG-biotina), y otra de 5000 Da que en lugar de biotina presenta un grupo metoxi terminal (SH-PEG-OCH₃). Se preparó una SAM compuesta únicamente de PEG-biotina y una SAM mixta en la que la molécula biotinilada se mezcló con la molécula de metoxi-PEG (mPEG). De esta manera el mPEG, se utilizó como molécula espaciadora de manera análoga a la función del MUOH en la SAM de alcanotioles. Se prepararon dos superficies con la SAM compuesta únicamente por PEG-biotina empleando soluciones de 0,25 y 0,5 mM en agua. Al mismo tiempo, se funcionalizaron otras dos superficies con la mezcla PEG-biotina/mPEG, preparada en agua en las proporciones 5 μM :245 μM y 50 μM :200 μM , lo que supone un valor de $\chi_{\text{PEG-biotina}}$ de 0,02 y 0,2, respectivamente. La formación de las SAMs se llevó a cabo ex-situ, en las mismas condiciones que la SAM de alcanotioles. En el siguiente paso se procedió a la inmovilización de estreptavidina, para lo cual se estableció un flujo continuo de PBST pH 7,4, y se inyectó la proteína preparada en este mismo buffer a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Las diferentes estrategias seguidas para la formación de la monocapa de biotina, previamente a la inmovilización de estreptavidina se representa en la Figura 3.3

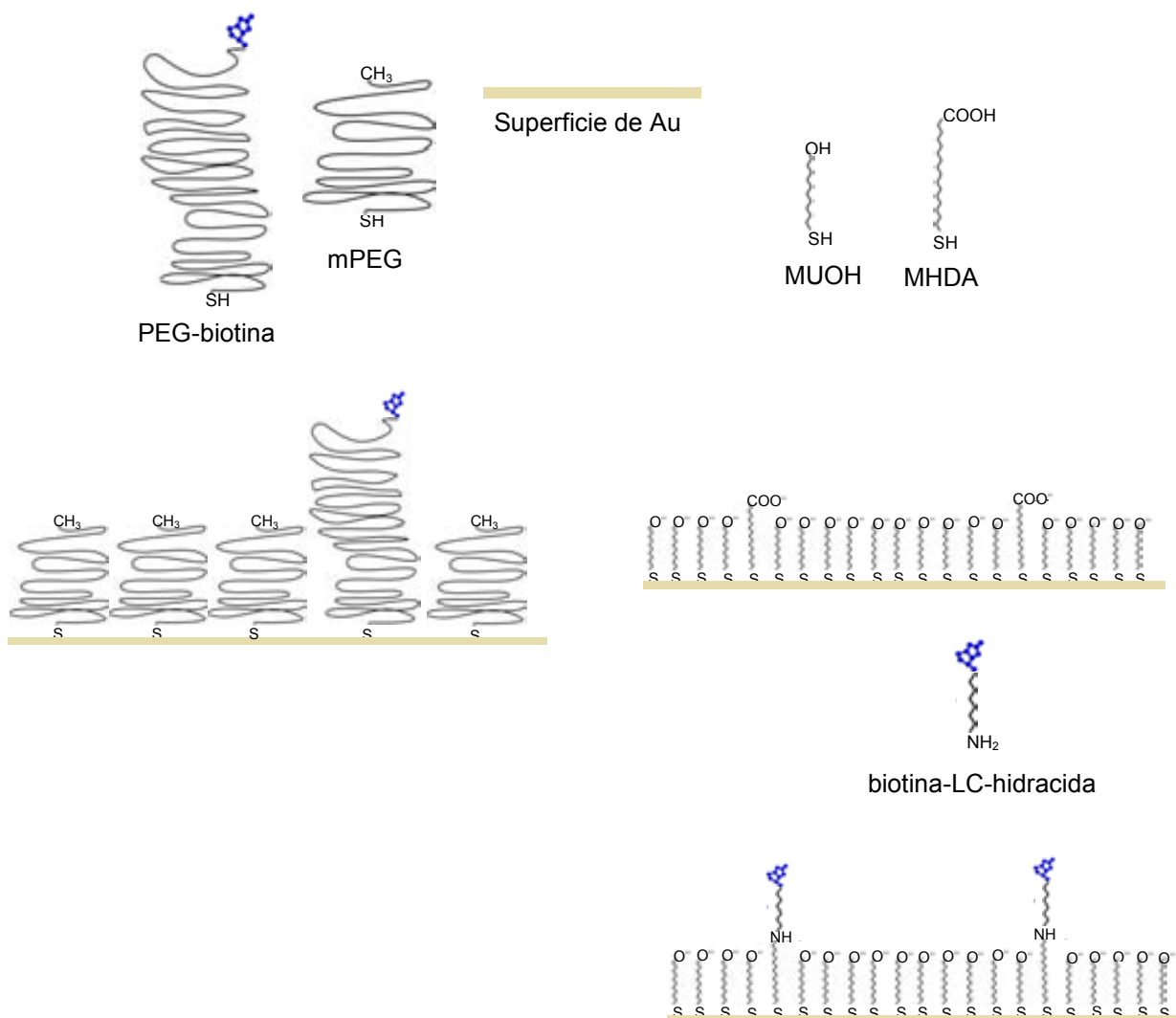


Figura 3.3. Representación esquemática de la formación de la monocapa de biotina, preparando la SAM a partir de una mezcla de (izq.) derivados del PEG o (dcha.) de alcanotioles.

3.3.3. Inmovilización del mAc hGH-12 biotinilado

La evaluación de la eficiencia de las distintas superficies de estreptavidina preparadas se llevó a cabo mediante la inmovilización del mAc hGH-12 biotinilado con un exceso molar de biotina de 50 veces respecto al anticuerpo, y posterior ensayo de detección de hGH. Para descartar la posible fisiorción del anticuerpo se inyectó la solución del mAc hGH-12 biotinilado en un ratio 1:50 sobre la superficie cubierta por la SAM biotinilada y sin biotinilar. Puesto que no se obtuvo señal alguna, se confirmó que

la unión del anticuerpo biotinilado a la superficie solo es posible a través de su acoplamiento a la estreptavidina. Una vez seleccionada la superficie de estreptavidina óptima con la que se alcanza el máximo rendimiento del inmunoensayo, se procedió al estudio del efecto que ejerce sobre el mismo, el grado de biotinilación del mAc hGH-12. En todos los casos el anticuerpo fue inmovilizado en PBST pH 7,4 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con un flujo continuo del mismo buffer que se utilizó hasta el final del inmunoensayo.

3.4. Condiciones óptimas de inmovilización

El primer paso en el desarrollo del inmunoensayo para la determinación de las isoformas hGH 22 y 20K fue la funcionalización de la superficie sensora con el mAc hGH-12. La inmovilización del anticuerpo se llevó a cabo utilizando el sistema biotina-estreptavidina, mediante la formación de una SAM biotinilada sobre la superficie sensora y la biotinilación del anticuerpo, de manera que la estreptavidina se utilizó como “linker molecular” entre ambos.

3.4.1. Formación de la SAM

Como se comentó anteriormente el fenómeno de impedimento estérico afecta en gran medida a la eficiencia de la inmovilización del anticuerpo, que en este caso depende de la inmovilización previa de estreptavidina, por lo que el control a este nivel es clave para el éxito del procedimiento. Puesto que el grado de impedimento estérico entre moléculas de estreptavidina depende fundamentalmente de la distribución de los puntos de anclaje de esta a la superficie, el primer paso en el desarrollo del método de inmovilización del mAc hGH-12 fue la optimización de la composición de la SAM. En el caso de la SAM de MHDA y MUOH se varió la fracción molar de alcanotiol a biotínilar (χ_{MHDA}) en un rango de 0,01 a 1. Tras la biotinilación de la monocapa se inmovilizó la estreptavidina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y finalmente se llevó a cabo el acoplamiento del anticuerpo. Tras la inmovilización del anticuerpo se comprobó la funcionalidad de las superficies obtenidas mediante la inyección de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hGH

en PBST pH 7,4. Los resultados se evaluaron en función del nivel de anticuerpo inmovilizado que condujera a la mayor señal de unión de la hormona. En la Figura 3.3.a se comparan las señales producidas por la inmovilización de estreptavidina y por la unión del anticuerpo en las distintas superficies. Como se observa, la respuesta del sensor en la inmovilización de la estreptavidina aumenta con la fracción del MHDA hasta llegar a un valor de la misma, igual a 0,034, cuyo aumento produce una disminución de la señal de la proteína. Mientras que en el rango de χ_{MHDA} entre 0,02 y 0,05, esta señal varía de forma insignificante, el aumento de este parámetro desde 0,014 a 0,02, al igual que desde 0,2 a 1, da lugar a un gran salto en el nivel de inmovilización de la estreptavidina. La respuesta del SPR en la inmovilización del mAc hGH-12 sigue el mismo perfil que la de la estreptavidina hasta alcanzar un valor de χ_{MHDA} igual a 0,02, cuyo aumento produce una disminución de la señal de anticuerpo, que disminuye con el aumento de χ_{MHDA} , llegando a ser nula en el caso del uso de la SAM de χ_{MHDA} igual a 1. Esta disminución se acompaña de un aumento de la relación señal estreptavidina:señal Ac respecto al observado en el rango de χ_{MHDA} entre 0,01 y 0,02, el cual se hace más notable a medida que aumenta la fracción molar de MHDA.

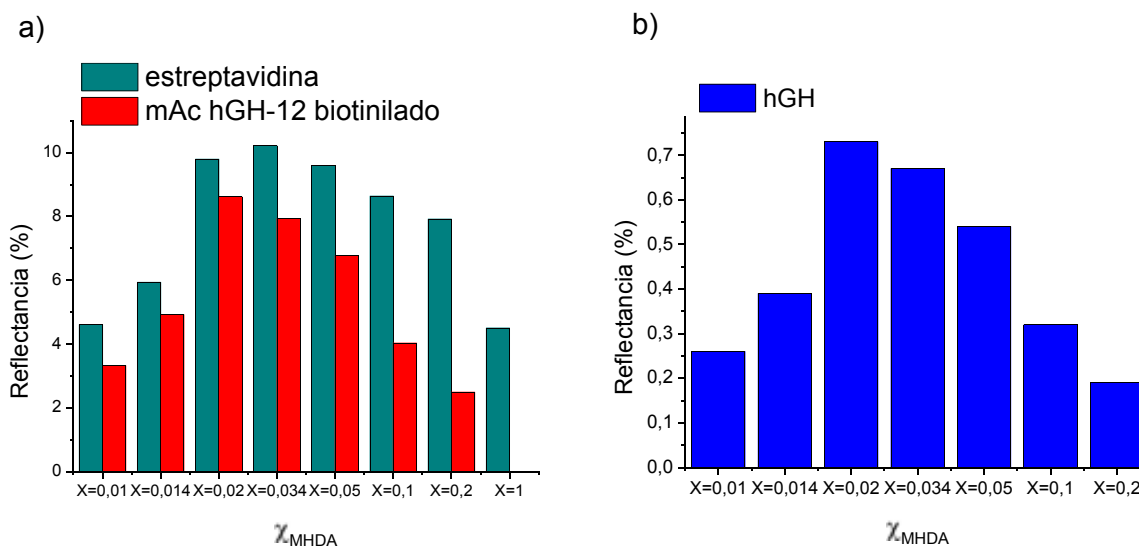


Figura 3.3. Representación de la respuesta SPR producida por la inmovilización de la estreptavidina y correspondiente unión del anticuerpo a la misma (b), y por la unión de la hGH al anticuerpo (c), en función del valor de χ_{MHDA} de la SAM.

Los resultados indican que la cantidad de estreptavidina inmovilizada aumenta con la densidad de puntos de unión (χ_{MHDA}) de esta a la superficie, especialmente a partir del uso de la fracción de MHDA de 0,014, hasta llegar a un valor crítico ($\chi_{\text{MHDA}}=0,034$) por encima del cual los sitios de unión a la estreptavidina quedan demasiado cerca unos de otros, favoreciendo el impedimento estérico entre moléculas vecinas durante su inmovilización lo que produce una disminución de la señal a medida que aumenta el valor de χ_{MHDA} , siendo más notable esta disminución a partir de la fracción molar de 0,1. La unión del mAc hGH-12 a la estreptavidina aumenta de forma paralela a la unión de esta a la superficie a medida que se incrementa el valor de χ_{MHDA} , aunque el fenómeno de impedimento estérico que limita la densidad máxima de las moléculas en la superficie se pone de manifiesto antes que en el caso de la estreptavidina, probablemente como consecuencia del mayor tamaño del anticuerpo. De este modo la máxima inmovilización del mAc hGH-12 se observa en la superficie con la SAM de $\chi_{\text{MHDA}}=0,02$. Por otro lado, el hecho de que por encima de este valor señales de estreptavidina parecidas a las obtenidas cuando se utiliza una concentración de MHDA muy inferior, den lugar a menor cantidad de anticuerpo inmovilizado, sugiere que en los casos de densidades de MHDA mayores varía la disposición de las moléculas de estreptavidina, que probablemente se encuentren más compactadas, de forma que se dificulte más la accesibilidad del anticuerpo. Esta idea viene reforzada por el hecho de que este aumento en la diferencia entre la cantidad de estreptavidina y anticuerpo inmovilizado se intensifica a medida que aumenta χ_{MHDA} . Por otro lado, en la Figura 3.3.b se comparan las señales de detección de hGH obtenidas en cada caso. Como puede observarse la señal de unión de la hormona al mAc hGH-12 muestra una fuerte correlación con el nivel de anticuerpo inmovilizado, de forma que el mayor rendimiento de la superficie se consiguió con la SAM formada por la fracción molar de MHDA de 0,02, que se seleccionó como la óptima para la formación de la SAM mixta de MHDA/MUOH. Los sensorgramas correspondientes a la inmovilización de la estreptavidina y posterior acoplamiento del mAc hGH-12, así como la unión de la hGH al anticuerpo, llevando a cabo el inmunoensayo en la superficie funcionalizada con la SAM de $\chi_{\text{MHDA}}=0,02$ se muestran en la Figura 3.4.

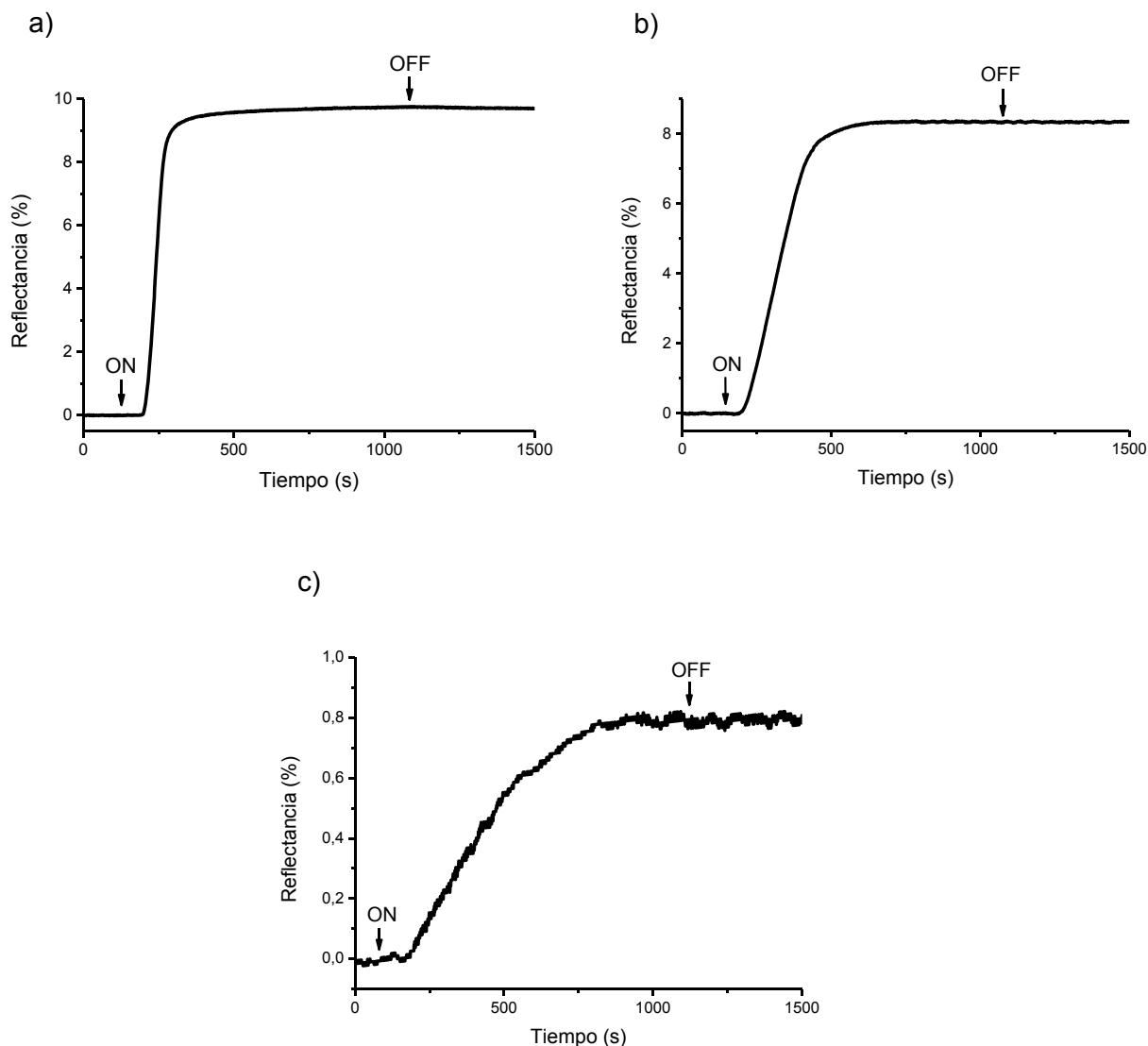


Figura 3.4. Sensorgramas correspondientes a la inmovilización de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina (a), unión de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo a la misma (b) y detección de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hGH (c) utilizando una SAM de $\chi_{\text{MHDA}}=0,02$.

El método desarrollado para la formación de la monocapa de estreptavidina se comparó con el uso de una SAM basada en un derivado biotinilado utilizando una molécula de PEG tiolada en un extremo. Con esta nueva estrategia, se elimina el paso de la biotinilación de la SAM y con ello, una fuente de variabilidad, y al mismo tiempo se aumenta la flexibilidad de la SAM y su resistencia a la fisorción de proteínas. Se prepararon dos nuevos tipos de superficies biotiniladas. Una de ellas formada

exclusivamente por la molécula de PEG-biotina, y la otra, por una mezcla de esta y otro derivado de la molécula de PEG tiolada, con un grupo metoxi terminal. Esta segunda molécula, sin capacidad de unir estreptavidina, funcionaría como molécula espaciadora, y se escogió con un tamaño de aproximadamente la mitad del que tiene la molécula biotinilada para no dificultar el acceso de la estreptavidina. Se prepararon distintas superficies de SAM de PEG-biotina y de la mezcla PEG-biotina/mPEG, de manera que se estudió el efecto de la variación de la fracción molar de PEG-biotina, de 0,02 a 1, y de la concentración en el caso de $\chi_{\text{PEG-biotina}}=1$. La respuesta SPR en la inmovilización de 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina y posterior acoplamiento del mAc hGH-12 en las distintas superficies se muestra en las Figuras 3.5.a y 3.5.b, respectivamente. Como se observa, el uso de cualquiera de estas SAMs produjo señales SPR muy bajas en comparación con las señales de inmovilización de estreptavidina y correspondiente unión del anticuerpo, obtenidas utilizando la SAM de alcanotioles de χ_{MHDA} igual a 0,02 (9,7 y 8,5, respectivamente). Dada la baja respuesta de las superficies no se llevó a cabo la detección de hGH. Como se observa, la disminución de $\chi_{\text{PEG-biotina}}$ lleva a un menor nivel de inmovilización, llegando incluso a no observarse señal de inmovilización de anticuerpo alguna cuando el valor de $\chi_{\text{PEG-biotina}}$ es 0,02, lo que sugiere que al contrario que en el caso de la monocapa de alcanotioles biotinilada, la inmovilización de estreptavidina no se encuentra limitada por una densidad de biotina demasiado alta que favorezca el impedimento estérico entre moléculas de estreptavidina. Por otro lado, el aumento de la concentración de PEG-biotina en la SAM de $\chi_{\text{PEG-biotina}}=1$, de 0,25 a 0,5 mM no varía la respuesta de la inmovilización de estreptavidina, lo que indica que la superficie sensora se encuentra saturada a una fracción molar de la molécula igual a 0,25. Teniendo en cuenta el elevado peso molecular de las moléculas de PEG utilizadas, especialmente la de PEG-biotina, en relación con el peso molecular de los alcanotioles, 10000 frente a 288 g/mol en el caso de la molécula biotinilada y 5000 frente a 204 g/mol en el caso de la molécula espaciadora, en la formación de la SAM la superficie debe saturarse a concentraciones más bajas de PEG que de alcanotiol. Puesto que la biotina, con un peso molecular de 240 g/mol, solo supone un 2,4% del peso del derivado biotinilado del PEG, los resultados sugieren que la baja eficiencia en la inmovilización

del mAc hGH-12 se debe a un pobre cubrimiento de la superficie con biotina como consecuencia del elevado tamaño de las moléculas utilizadas para la formación de la SAM. En este caso sería necesario optimizar las condiciones de la formación de la monocapa de PEG lo cual se descartó en este trabajo, dada la gran eficiencia que el uso de la SAM de MHDA y MUOH había demostrado en el desarrollo de la superficie de mAc hGH-12.

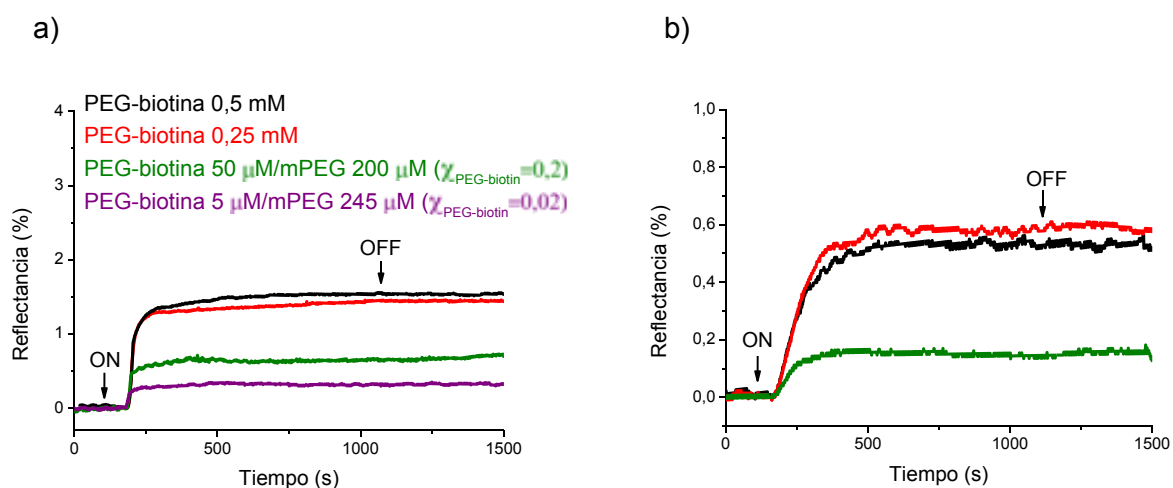


Figura 3.5. Sensorgramas correspondientes a la inmovilización de estreptavidina (a) y correspondiente unión del anticuerpo biotinilado (b), sobre las SAM formadas por PEG-biotina y PEG-biotina/mPEG.

3.4.2. Comparación de la eficiencia de la monocapa de estreptavidina formada, con la de un chip comercial de estreptavidina

Finalmente, una vez optimizado el protocolo de formación de la superficie de estreptavidina, se comparó la eficiencia de esta con la de un chip comercial funcionalizado con esta proteína. Este chip, fabricado por *Xantec*, se basa en una superficie cubierta por un hidrogel de carboxidextrano de densidad media, que forma una capa de 200 nm de grosor. La respuesta SPR para la inmovilización del mAc hGH-12 y la correspondiente detección de 1 μg/mL de hGH en PBST pH 7,4 se muestran en la Figura 3.7. Como se puede observar, el uso del chip comercial redujo drásticamente el rendimiento del inmunoensayo frente al obtenido con el método desarrollado en este

trabajo con la formación de la monocapa de estreptavidina a partir de una superficie sensora no funcionalizada; la disminución fue aproximadamente de un 70% de la señal de inmovilización del mAc hGH-12, y además no dio lugar a señal de detección de hGH alguna. La baja señal de inmovilización de anticuerpo podría explicarse por un fenómeno de impedimento estérico debido a una gran densidad de estreptavidina sobre la superficie. A diferencia de las monocapas autoensambladas los hidrogeles de dextrano no permiten controlar la distribución de los puntos de unión a la molécula a inmovilizar, puesto que todas las moléculas que conforman el hidrogel contienen un grupo carboxílico terminal. Así pues, la densidad de los grupos carboxílicos depende de la densidad del hidrogel, y es con seguridad, mucho mayor que la que presenta la SAM de MHDA:MOUH preparada en este trabajo. Por otro lado, en una matriz tridimensional, como la forma de estos hidrogeles, la molécula de anticuerpo biotinilada puede unirse a la estreptavidina por multitud de sitios, lo que puede conllevar que los dominios de unión a la hormona queden difícilmente accesibles a la misma. Esto explicaría la ausencia de señal de detección de hGH, puesto que con la señal de anticuerpo obtenida y de acuerdo a resultados de ensayos realizados utilizando la SAM de MHDA:MUOH, se esperaba mayor respuesta.

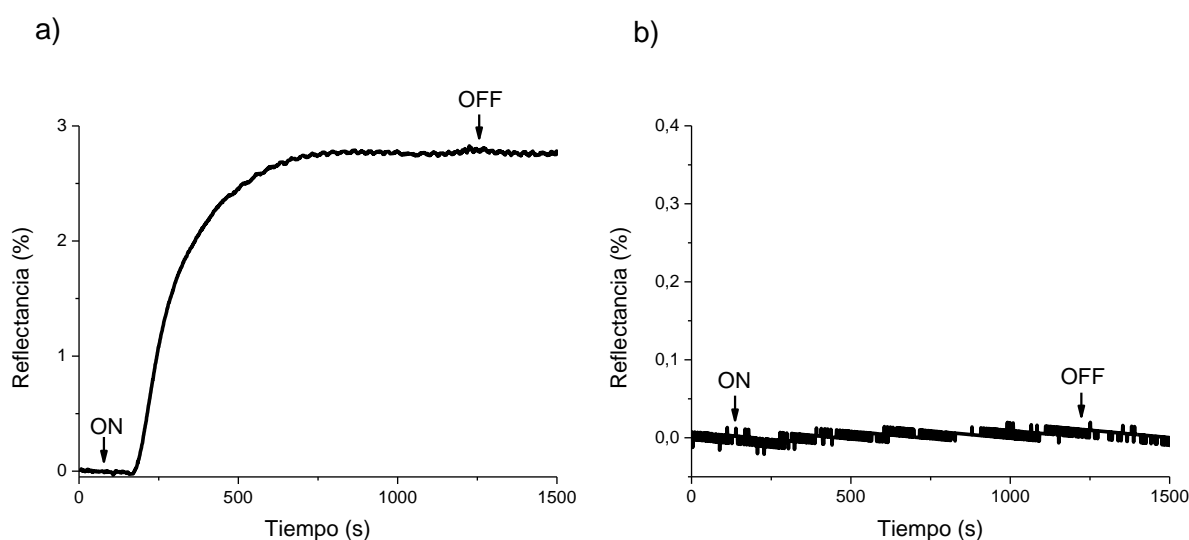


Figura 3.7. Sensorgramas correspondientes al inmunoensayo realizado utilizando un chip de estreptavidina comercial: a) inmovilización del mAc hGH-12 biotinilado y (b) detección de la hGH.

3.4.3. Selección del grado de biotilación del mAc hGH-12

El paso siguiente a la formación de la monocapa de estreptavidina fue el estudio de la influencia del grado de biotilación del mAc hGH-12 sobre el rendimiento del inmunoensayo. Puesto que la estrategia de biotilación utilizada está dirigida a los grupos amino del anticuerpo, la zona de reconocimiento de la hormona puede resultar alterada y, por tanto, su capacidad de unión a la misma, por lo que la única forma de reducir este efecto, es optimizar el grado de biotilación del mismo. Los mAc hGH-12 modificados con diferente exceso molar del reactivo de biotina fueron inyectados sobre superficies de estreptavidina previamente preparadas siguiendo el protocolo optimizado anteriormente. Una vez llevada a cabo la inmovilización del mAc hGH-12 biotilado se comprobó su funcionalidad mediante la inyección de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hGH en PBST pH 7,4. La Figura 3.8 muestra la respuesta SPR para la inmovilización del anticuerpo biotilado utilizando diferentes relaciones molares mAc hGH-12:sulfo-NHS-LC-biotina (1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100), así como las correspondientes señales de detección de la hGH. La señal de inmovilización del mAc hGH-12 aumentó con el grado de biotilación especialmente al pasar de un exceso molar de biotina de 25 a 50 veces respecto a la concentración del anticuerpo. La diferencia en el nivel de inmovilización de este fue menor entre el uso de un exceso de 50 o 100, e insignificante entre el uso de un exceso de 5 y 10. Sin embargo, la mayor respuesta SPR para la detección de la hGH no se correspondió con la observada para la inmovilización del mAc hGH-12, de forma que el mayor rendimiento del inmunoensayo se obtuvo utilizando el anticuerpo biotilado en una relación 1:50, mientras que la señal obtenida con el anticuerpo con mayor grado de biotilación fue menor incluso que la que se obtuvo biotilando el anticuerpo en una relación 1:25. Este resultado indica que la biotilación del anticuerpo en una relación superior a 1:50 altera la funcionalidad del mismo reduciendo considerablemente su capacidad de reconocimiento de la hGH. Sugiere también que el leve aumento de la señal de inmovilización del anticuerpo observado al incrementar el exceso molar de biotina de 50 a 100 veces, en comparación con el observado cuando este aumenta de 25 a 50 veces, se debe a que el incremento del grado de biotilación del anticuerpo por encima del ratio 1:50 lleva a la saturación de la monocapa de estreptavidina, y no a que el anticuerpo

presente menor grado de biotinylación de lo que le correspondería con el exceso de biotina utilizado, y que significaría que estaría teniendo lugar la saturación de la propia reacción de biotinylación. Puesto que el mayor rendimiento del inmunoensayo se obtuvo empleando el mAc hGH-12 biotinylado en ratio 1:50, este fue el grado de biotinylación seleccionado para la modificación del mismo.

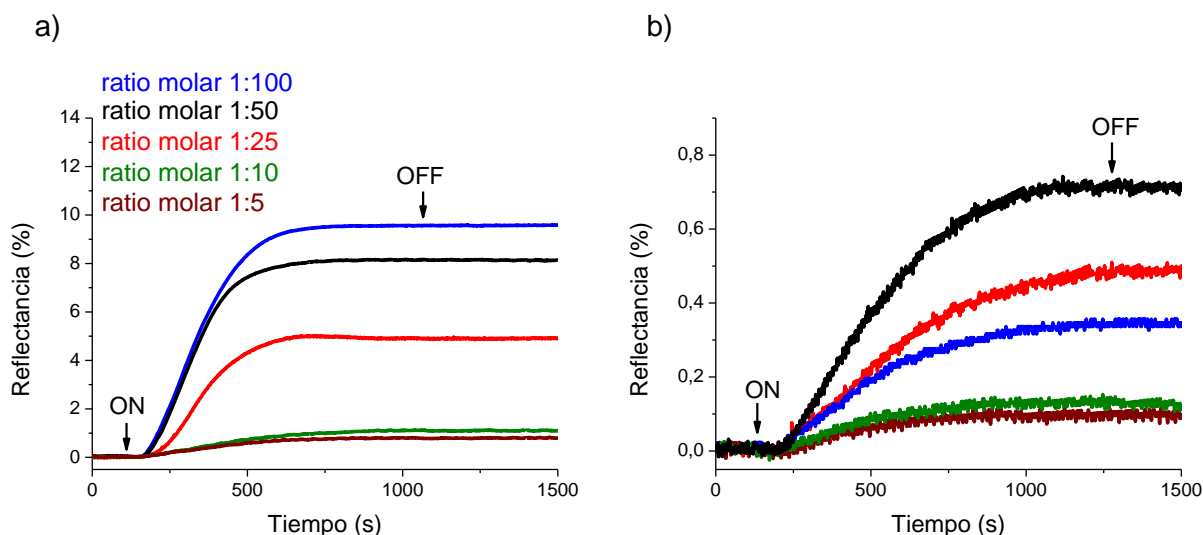


Figura 3.8. Señales de inmovilización del mAc hGH-12 con distinto grado de biotinylación.

3.5. Evaluación de la eficiencia de la monocapa de mAc hGH-12

La eficiencia de la superficie biofuncionalizada de mAc hGH-12 se evaluó llevando a cabo un inmunoensayo directo para la detección de hGH en un rango de concentración entre 0,05 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se prepararon las soluciones de hormona de distinta concentración y cada una se inyectó tres veces secuencialmente sobre una misma superficie, llevando a cabo la regeneración de la misma tras cada medida. Las señales de la determinación de la hormona en el intervalo de concentración ensayado, se muestran en el sensorgrama de la Figura 3.9.a. La curva de calibrado calculada a partir de los resultados obtenidos de las medidas por triplicado se muestra en la Figura 3.9.b, al igual que las características analíticas del inmunoensayo. Cada punto de la curva representa el valor medio de las tres señales obtenidas. El límite de detección (LOD) calculado es 5

ng/mL y el rango lineal es de $37-10^3$ ng/mL. El LOD es inferior al nivel de corte establecido para el diagnóstico de insuficiencia de hGH (10 ng/mL) lo que indica que con este método podría alcanzarse la sensibilidad necesaria para la aplicación del inmunosensor en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con niveles bajos de hGH, para lo que se mide la hormona circulante sin discriminar entre isoformas.

Para la regeneración de la superficie se utilizó una solución de HCl 5 mM, la cual había demostrado en anteriores trabajos del grupo su utilidad para la reutilización de inmunosensores. El flujo de HCl se mantuvo solo durante 100 segundos y a una velocidad de 30 μ L/min. A pesar de la dificultad de conservar la funcionalidad de las superficies sensoras modificada con anticuerpo tras el uso de buffers de regeneración, la solución de HCl empleada para la ruptura de la interacción entre el mAc hGH-12 y la hGH permitió la reutilización del sensor a lo largo de tres ciclos de medida en los que se recuperó la señal inicial del SPR después de cada regeneración tal como refleja la Figura 3.10.

Para evaluar la reproducibilidad del inmunoensayo se calculó el CV del intraensayo a partir de las medidas realizadas reutilizando la superficie de mAc hGH-12, y el CV del interensayo a partir de las medidas realizadas con distintos chips de este anticuerpo. Los valores medios del CV intra e interensayo obtenidos fueron de 8,23 y 7,4%, respectivamente, lo que demuestra la baja variabilidad del inmunoensayo. Dada la dificultad de conseguir reproducir las medidas realizadas con una misma superficie de anticuerpo debido a la vulnerabilidad del mismo frente al uso de soluciones de condiciones extremas como el HCl 5 mM (pH 2,3), el bajo CV intraensayo obtenido en este trabajo demuestra la gran eficiencia del método utilizado para la inmovilización del mAc hGH-12, que permitió la reutilización de la superficie sensora al menos durante tres ciclos de medida.

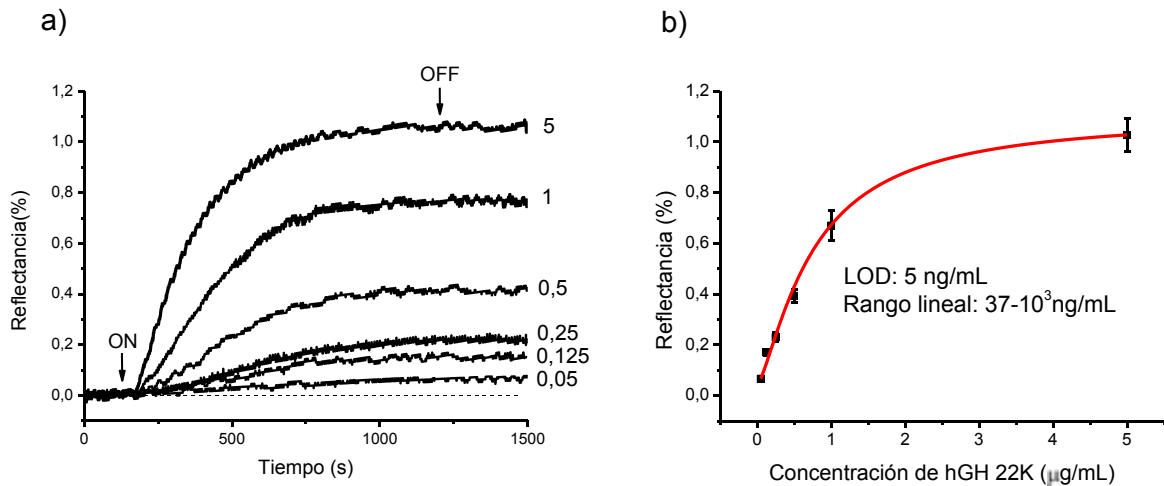


Figura 3.9. Inmunoensayo para la determinación de la hGH en el intervalo de concentración de 0,05-5 $\mu\text{g/mL}$. A) Señales SPR de detección de la hormona y (b) Curva de calibrado.

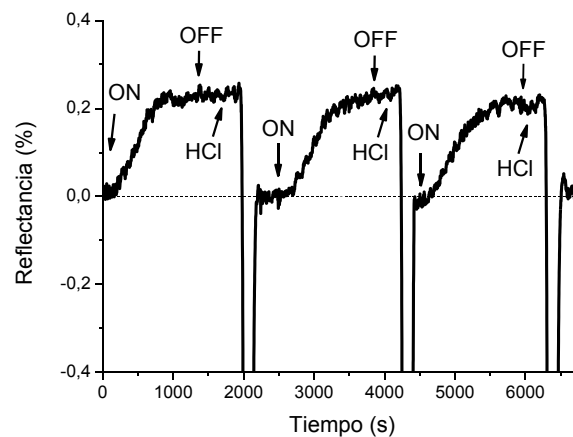


Figura 3.10. Sensorgrama correspondiente a tres ciclos de medida de la hGH donde se observa la señal de detección de la hormona y las correspondiente regeneración de la superficie de mAc hGH-12 tras la unión de la hormona utilizando HCl 5 mM.

3.6. Inmunoensayo sándwich para la determinación de isoformas hGH 22 y 20K en suero

Tras desarrollar la superficie de mAc hGH-12 y comprobar la eficiencia de la misma, se procedió a la realización de un inmunoensayo tipo sándwich para la

determinación de las isoformas 22 y 20K de la hGH en muestras de suero humano. Como se comentó en el apartado 3.2, para la detección selectiva de estas isoformas se utilizaron los anticuerpos hGH-25 y 33. Para evaluar previamente la selectividad de los anticuerpos se realizó primero un ensayo en PBST pH 7,4. Se preparó una solución de cada isoforma a 1 $\mu\text{g/mL}$ y se fluyeron sobre la misma superficie de mAc hGH-12, utilizando una celda de medida para cada isoforma. Tras la unión de estas al anticuerpo se realizaron dos inyecciones sucesivas en cada celda, primero del anticuerpo no específico (mAc hGH-25 donde se unió la hGH 20K y mAc hGH-33 donde se unió la hGH 22K) y seguidamente del anticuerpo específico, para cada variante de la hGH, ambos preparados a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. El PBST se utilizó tanto en el flujo como en la preparación de la muestras. Como se observa en los sensorgramas de la Figura 3.11 tras las altas señales de unión de las dos isoformas a la superficie de mAc hGH-12 no se observó respuesta de unión del anticuerpo inespecífico en cada caso, mientras que el específico dio lugar a una gran señal de reconocimiento de la variante correspondiente. De esta forma se demostró tanto la alta especificidad de la unión del mAc hGH-25 y 33 por la hGH 22K y 20, respectivamente, como la ausencia de adsorción inespecífica de estos anticuerpos sobre la superficie sensora.

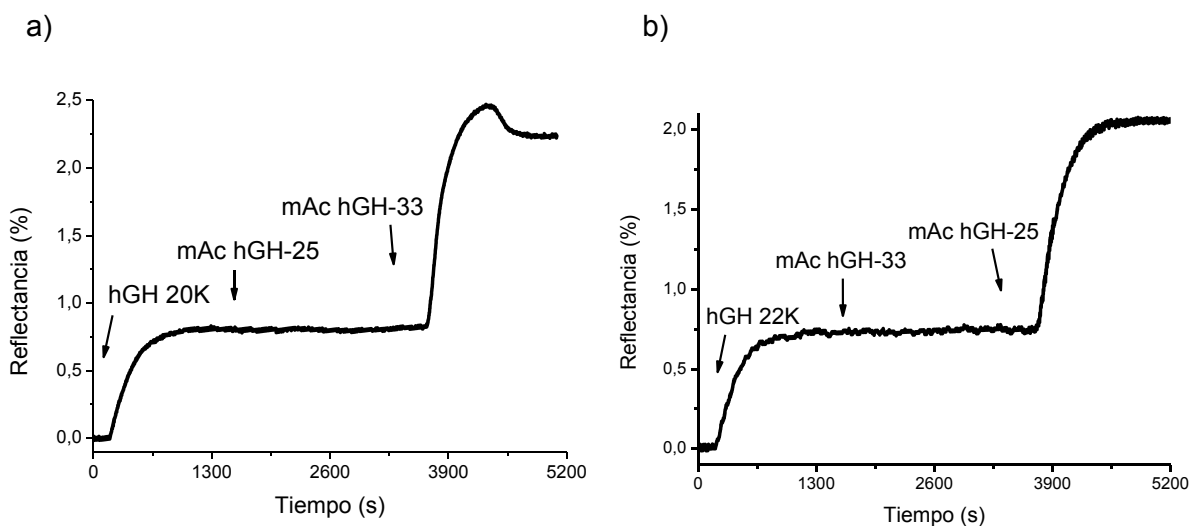


Figura 3.11. Evaluación de la selectividad de los anticuerpos mAc hGH-25 y mAc hGH-33 en la detección de la hGH 22K (a) y hGH 20K (b).

Una vez descartada la posibilidad de reactividad cruzada en el ensayo sándwich, se comprobó si la reducción de la concentración del anticuerpo de detección afectaba al rendimiento del inmunoensayo. Dado el comportamiento similar observado entre los anticuerpos hGH 25 y 33, solo se utilizó el par hGH 22K/mAc hGH-25 para la prueba, que se realizó utilizando PBST pH 7,4 como buffer de trabajo. Una solución de 50 ng/mL de hGH 22K, la concentración de hormona más baja utilizada en el inmunoensayo directo descrito en el apartado previo, se fluyó sobre una superficie de mAc hGH-12 y seguidamente se inyectó una solución del mAc hGH-25 a 25 $\mu\text{g/mL}$ en una de las celdas de medida y otra a 10 $\mu\text{g/mL}$ en la otra celda. Como se observa en la Figura 3.12, la disminución de la concentración de anticuerpo en más de la mitad de la ensayada previamente, conduce a una pérdida insignificante de la señal de SPR. Por lo tanto, se seleccionó 10 $\mu\text{g/mL}$ como la concentración de los anticuerpos hGH-25 y 33 a utilizar en el inmunoensayo.

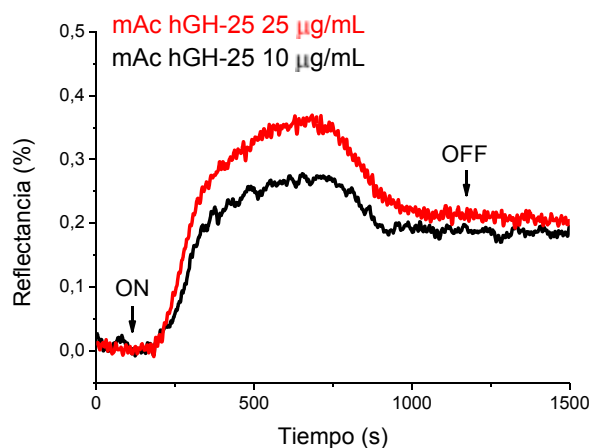


Figura 3.12. Optimización de la concentración del anticuerpo de detección. Unión del mAc hGH-25 a la hGH 22K.

Como se mencionó en el apartado 2.5, para llevar a cabo el inmunoensayo con muestras de suero humano se utilizó el buffer PBST-S, que previene la adsorción inespecífica cuando se trabaja con este tipo de muestras. Previamente a la realización del inmunoensayo en suero se llevó a cabo la detección de las isoformas de la hormona a partir de una mezcla de ambas en PBST-S, a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ cada una. De

esta forma se observó la respuesta SPR bajo las condiciones que se emplearían en el ensayo con muestras de suero, en las que las isoformas de la hGH se unen a la superficie de mAc hGH-12 de forma simultánea, y la posterior unión de los correspondientes anticuerpos para la detección selectiva de las mismas se realiza en PBST-S, utilizando la misma celda de medida. Además, con la intención de comprobar si el orden de inyección de los anticuerpos influye en la señal de detección producida por la unión de estos a las isoformas respectivas, se evaluaron las dos secuencias de inyección posibles, preparando los anticuerpos hGH-25 y 33 en PBST-S a 10 µg/mL. Las señales de detección obtenidas se muestran en la Figura 3.13 donde se observa que la respuesta del SPR no varió entre las dos secuencias de inyección utilizadas. Sin embargo, la señal de unión del mAc hGH-25 a la hGH 22K fue algo menor que la del mAc hGH-33 a la isoforma 20K, debido probablemente a que la reducción de la unión Ag-Ac causada por el buffer PBST-S tiene un efecto más acusado sobre la interacción del par hGH-22K/mAc hGH-25 que sobre la del par hGH-20K/mAc hGH-33.

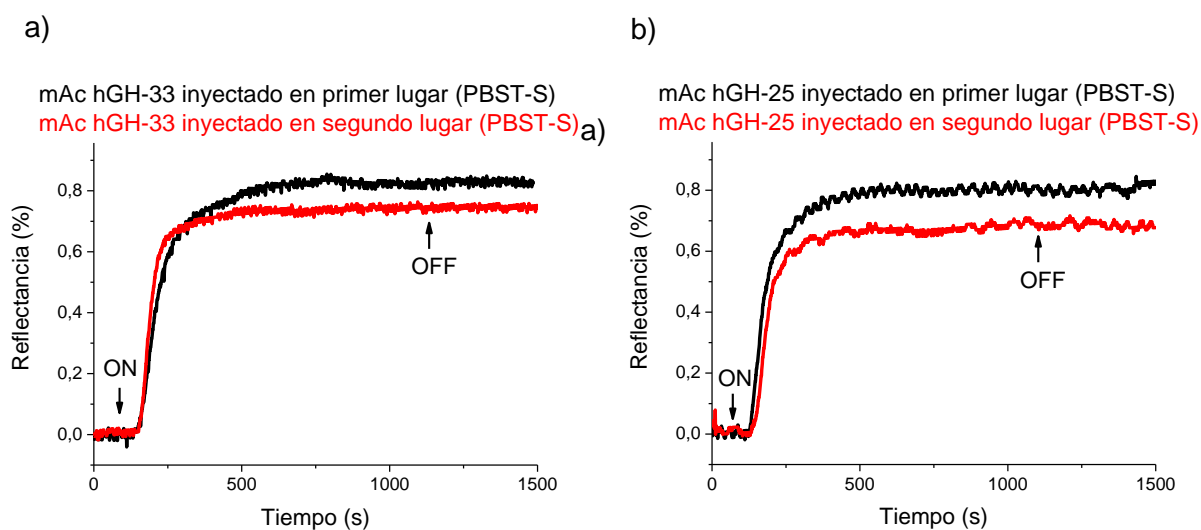


Figura 3.13. Señales de acoplamiento de los anticuerpos hGH-25 (a) y hGH-33 (b) en PBST-S en función de la secuencia de inyección llevada a cabo.

Puesto que los niveles circulantes de la hGH 20K son aproximadamente de un orden inferior al de la 22K, para llevar a cabo el inmunoensayo en suero, las isoformas se ensayaron en dos intervalos de concentración distintos, 5–50 ng/mL y 1–1.5×10³ ng/mL,

respectivamente, de forma que las condiciones de trabajo se asemejaran lo más posible a condiciones reales. Se prepararon soluciones con la hGH 22 y 20K mezcladas en distintas proporciones en suero humano comercial diluido en proporción 1:1 con PBST-S. Las relaciones 22K:20K (ng/mL) utilizadas fueron 1:0.5, 1:1, 10:1, 20:1, 40:10, 100:10, 200:20, 500:20, $10^3:50$ y $1.5 \times 10^3:50$. Cada muestra con la mezcla de isoformas se fluyó sobre la superficie funcionalizada con mAc hGH-12 seguida de una solución del anticuerpo hGH-25 y otra de hGH-33, ambas inyectadas secuencialmente, en este orden, a $10 \mu\text{g/mL}$ en PBST-S, para la detección selectiva de isoforma 22K y 20K, respectivamente.

Para poder reutilizar la superficie sensora se hicieron pruebas con la solución de HCl 5 mM, que había demostrado su eficacia para regenerar la superficie de mAc hGH-12 en el inmunoensayo directo (apartado 3.5). Sin embargo, en este formato de inmunoensayo el HCl solo consiguió eliminar parte del anticuerpo de detección puesto que no se logró recuperar la señal original, previa a la inyección de la muestra de suero. Puesto que alargar la exposición de la superficie a la solución de HCl o buscar condiciones de regeneración más extremas conllevaría una probable alteración de la funcionalidad del anticuerpo y con ello una pérdida de sensibilidad del inmunoensayo, se optó por no reutilizar la superficie de mAc hGH-12, de forma que solo se realizó una medida con cada zona sensora. Se llevaron a cabo triplicados de cada muestra, dos medidas se realizaron en un mismo chip, cada una en una celda distinta, y para la tercera medida se utilizó un chip distinto, que dio lugar a una respuesta similar. Como se observa en la Figura 3.14, las curvas de calibrado calculadas a partir de los resultados obtenidos se ajustan a funciones diferentes.

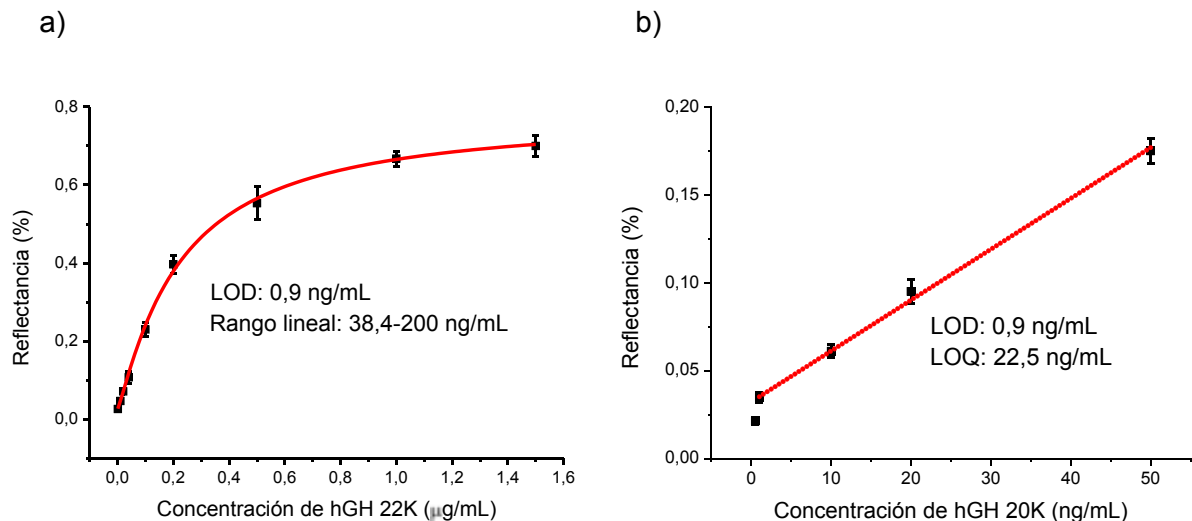


Figura 3.14. Curvas de calibrado del inmunoensayo para la determinación en suero de la hGH 22K (a) and 20K (b) en un intervalo de concentración de 0.5–50 ng/mL y 1–1.5×10³ ng/mL, respectivamente. El límite de detección fue de 0,9 ng/mL para las dos isoformas. El CV del inmunoensayo fue de 6,7% en el caso de la determinación de la hGH 22K y de 7,16% en el caso de la hGH 20K.

Debido al diferente intervalo de concentración ensayado solo se alcanzó la zona de saturación de la curva en el caso de la determinación de la isoforma 22K, mientras que la respuesta de la determinación de la 20K se ajustó a un modelo lineal con un alto coeficiente de correlación ($R^2=0.9967$). El límite de detección del inmunonensayo para ambas variantes es de 0,9 ng/mL. Aunque aún no se han establecidos niveles de corte para la detección de dopaje con hGHr, este valor es inferior al nivel basal medio de la hGH 22K en suero, de aproximadamente 1 ng/mL [39], aunque supera el de la variante de 20 kDa, que es aproximadamente un 10% del de la hGH 22K. La sensibilidad del inmunoensayo es por tanto adecuada para la determinación de esta última isoforma tras la administración de hGHr, la cual produce la elevación de los niveles circulantes de la hGH 22K. El intervalo de trabajo del inmunoensayo permite la determinación de esta isoforma hasta un nivel de concentración máximo de 200 ng/mL, dos veces superior a los picos máximos alcanzados en condiciones fisiológicas. Sin embargo, aunque los niveles alcanzados por ambas variantes tras el dopaje con la forma recombinante dependen de la concentración de hGH presente en suero en el momento de la administración de la misma, debido a la reducción del nivel de la isoforma 20K que esta causa, la detección

de sus niveles en suero tras el dopaje con la hormona es difícil con la sensibilidad alcanzada en este inmunoensayo. Por otro lado los valores medios de los coeficientes de variación son 6,7% y 7,16%, en la determinación de las isoformas de 22 y 20 kDa respectivamente, lo que demuestra la alta reproducibilidad del inmunoensayo.

3.7. Conclusión

En este trabajo se ha desarrollado un inmunosensor SPR para la determinación simultánea de las isoformas de 22 y 20 kDa en suero humano, básica en el desarrollo de tests anti-doping. Hasta el momento este es el único biosensor publicado que permite la determinación de las variantes de la hormona en un único ensayo. Para su desarrollo se ha optimizado un método de biofuncionalización basado en el uso del sistema biotina/estreptavidina para la inmovilización dirigida de un anticuerpo específico para las dos isoformas, y utilizando otros dos anticuerpos altamente selectivos para la detección de cada una de ellas en un inmunoensayo tipo sándwich. En el ensayo directo realizado previamente para evaluar la eficiencia de la superficie sensora se alcanzó un límite de detección de 5 ng/mL, valor comparable al alcanzado por inmunosensores basados en el formato de inhibición, utilizado preferentemente cuando se pretende conseguir una gran sensibilidad. Además, la superficie pudo reutilizarse hasta tres veces con muy poca variabilidad entre las medidas, algo poco común en este formato de inmunoensayo en el que la superficie se funcionaliza con el anticuerpo en lugar del analito, debido a la dificultad de mantener la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado tras someterlo a las condiciones extremas propias de las soluciones ácidas utilizadas para regenerar la superficie sensora. La excelente reproducibilidad del ensayo, no sólo reutilizando la misma superficie sino también realizándolo en distintos chips, junto con la alta sensibilidad alcanzada, demuestran el éxito del método utilizado para el desarrollo de la superficie anti-hGH. Por otro lado, la alta especificidad de los anticuerpos utilizados para la determinación de la hGH 22 y 20K hizo posible llevar a cabo un inmunoensayo sándwich altamente selectivo y reproducible, cuya sensibilidad permite la detección de ambas variantes en suero a niveles tan bajos como 0,9 ng/mL. El inmunosensor desarrollado permite la determinación rápida y fiable de ambas isoformas, haciendo uso

de un reducido volumen de muestra, lo que junto con la portabilidad del dispositivo, que permite realizar las medidas en el momento de la competición o en las circunstancias más apropiadas para la detección del dopaje con la hGHR, hacen que este método resulte una herramienta muy prometedora para su aplicación en tests anti-doping. Sin embargo, aunque las autoridades y organizaciones deportivas no han establecido aun los niveles de corte de las isoformas de la hGH para poder detectar condiciones de dopaje [40], los niveles de concentración extremadamente bajos que la hGH 20K puede alcanzar en suero en dichas condiciones (inferiores a 50 pg/mL), limitarían seriamente la aplicación de este inmunosensor en tests anti-doping. De forma alternativa, el método desarrollado en este trabajo podría llevarse a cabo utilizando otros dispositivos biosensores de mayor sensibilidad, como los que están siendo desarrollados en nuestro grupo, interferómetros biomodales basados en tecnología optoelectrónica de Silicio, cuya sensibilidad es aproximadamente 1000 veces superior a la de los sistemas SPR [41, 42].

3.8. Referencias

- 1 Segura J., Gutiérrez-Gallego R., Ventura R., Pascual J.A., Bosch J., Such-Sanmartín G., Nikolovski Z., Pinyot A. and Pichini S., *Growth hormone in sport: beyond Beijing 2008*. Ther. Drug Monit., 2009. **31**:3-13.
- 2 Ayuk J. and Sheppard M.C., *Growth hormone and its disorders*. Postgrad. Med. J., 2006. **82**:24-30.
- 3 Baumann G., *Growth-Hormone Heterogeneity - Genes, Isohormones, Variants, and Binding-Proteins*. Endocrine Reviews, 1991. **12**(4):424-449.
- 4 Bidlingmaier M. and Strasburger C.J., *Growth hormone assays: current methodologies and their limitations*. Pituitary, 2007. **10**(2):115-119.
- 5 Baumann G., *Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma*. Horm. Res., 1999. **51**(1):2-6.
- 6 Baumann G. P., *Growth hormone isoforms*. Growth Horm. IGF. Res., 2009. **19**:333-340.
- 7 Lacroix M.C., Guibourdenche J., Frenzo J.L., Muller F. and Evain-Brion D. *Human placental growth hormone--a review*, 2002. Placenta **23**(A):S87-S94.
- 8 Gahete M.D., Duran-Prado M., Luque R.M., Martínez-Fuentes A.J., Quintero A., Gutiérrez-Pascual E., Córdoba-Chacón J., Malagón M.M., Gracia-Navarro F. and Castano J.P. *Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2009. **1163**:137-153.

- 9 Anderson L.L., Jętkinija S. and Scanes C.G. *Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches*. *Exp.Biol.Med.*(Maywood.), 2004. 229:291-302.
- 10 Veldhuis J.D. and Bowers C.Y. *Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender*. *J.Endocrinol.Invest.*, 2003. **26**:799-813.
- 11 Jorgensen J.O., Krag M., Kanaley J., Moller J., Hansen T.K., Moller N., Christiansen J.S. and Orskov H. *Exercise, hormones, and body temperature. regulation and action of GH during exercise*. *J.Endocrinol.Invest.*, 2003. **26**:838-842.
- 12 Popii V. and Baumann G. *Laboratory measurement of growth hormone*. *Clinica Chimica Acta*, 2004. **350**:1-16.
- 13 Strobl J.S and Thomas M.J., *Human Growth Hormone*. *Pharmacological Reviews*, 1994. **46**(1):1-34.
- 14 Holt R.I.G., Erotokritou-Mulligan I. and Sönksen P.H. *The history of doping and growth hormone abuse in sport*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2009. **19**:320-326.
- 15 Prokop L., The struggle against doping and its history. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 1970. **10**(1):45-48.
- 16 Todd T., Anabolic Steroids: The Gremlins of Sport. *Journal of Sport History*, 1987. **14**(1).
- 17 Mayes R., The Modern Olympics & Post-Modern Athletics: A Clash in Values. *The Journal of Philosophy Science & Law*, 2010. **10**.
- 18 Todd T., A history of the use of anabolic in sport. In: Berryman J.W., Park R.J. (eds) *Sport and exercise science*. *Essays in the history of sports medicine*. 1992. 319-350.
- 19 Johnston L. and Conly J. *Creutzfeldt-Jakob disease and infection control*. *Can. J. Infect. Dis.*, 2001. **12**(6):332-336.
- 20 Kuret J.A. y Murad F. *Hormonas adenohipofisarias y sustancias relacionadas*. En: Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S. and Taylor P. (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México DF: Editorial Médica Panamericana, 1991. 1295-1318.
- 21 Cowart V.S., *Human growth hormone: the latest ergogenic aid?*. *Physician Sportsmed*, 1988. **16**:175.
- 22 World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code – The 2008 Prohibited List International Standard, 2008. <http://www.wadaama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf> (accessed 13.05.09).
- 23 De Mondenard J.P., *Hormone de croissance (hGH)*. In: *Le dopage aux jeux olympiques. La triche récompensé*. Editions Amphora SA, 1996. 185-186.
- 24 Rennie M.J., *Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes?*. *Br. J. Sports Med.*, 2003. **37**:100-105.

- 25 Rickert VI, Pawlak-Morello C., Sheppard V. and Jay M.S., *Human growth hormone: a new substance of abuse among adolescents?*. Clin. Pediatr., 1992. 31:723.
- 26 Nelson A.E. and Ho K.K., *A robust test for growth hormone doping – present status and future prospects*. Asian J. Androl., 2008. **10**(3):416-425.
- 27 Nelson A.E. and Ho K.K., *A robust test for growth hormone doping – present status and future prospects*. Asian J. Androl., 2008. **10**(3):416-25.
- 28 Barroso O., Mazzoni I. and Rabin O., *Hormone abuse in sports: the antidoping perspective*. Asian J. Androl., 2008; **10**(3):391-402.
- 29 Barroso O., Schamasch P. and Rabin O., *Detection of GH abuse in sport: Past, present and future*. Growth Hormone & IGF Research, 2009. **19**:369-374.
- 30 Wu Z., Bidlingmaier M., Dall R. and Strasburger C.J., *Detection of doping with human growth hormone*. Lancet, 1999. **353**:895.
- 31 Ishikawa M., Yokoya S., Tachibana K., Hasegawa Y., Yasuda T., Tokuhiko E., Hashimoto Y. and Tanaka T., *Serum Levels of 20-Kilodalton Human Growth Hormone (GH) Are Parallel Those of 22-Kilodalton Human GH in Normal and Short Children*. J. Clin. Endocrinol., 1999. **84**:98-104.
- 32 Tsushima T., Katoh Y., Miyachi Y., Chihara K., Teramoto A., Irie M. and Hashimoto Y., *Serum Concentration of 20K Human Growth Hormone (20K hGH) Measured by a Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Clin. Endocrinol. Metab., 1999. **84**:317-322.
- 33 McHugh C.M., Park R.T., Sonksen P.H. and Holt R.I., *Challenges in detecting the abuse of growth hormone in sport*. Clin. Chem., 2005. **51**:1587-1593.
- 34 Sartorio A., Agosti F., Marazzi N., Trecate L., Silvestri G., Lafortuna C., Cappa M., De Palo E., Faglia G., Corradini C., Cella S., Rigamonti A. and Müller E.E., *Gender-, age-, body composition- and training workload-dependent differences of GH response to a discipline-specific training session in elite athletes: a study on the field*. J. Endocrinol. Invest., 2004. **27**:121-129.
- 35 Rigamonti A.E., Cella S.G., Marazzi N., Di Luigi L., Sartorio A. and Müller E.E., *Growth hormone abuse: methods of detection*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2005. **16**(4):160-166.
- 36 Banfi G., Casari E., Murone M. and Bonini P., *Discrepancies among commercial kits for assaying growth hormone*. Clin. Chem., 1990. **36**:402.
- 37 Cowan D. A. and Bartlett C., *Laboratory issues in the implementation of the marker method*. Growth Horm. IGF. Res., 2009. **19**:357-360.
- 38 Mellado M., Rodriguez-Frade J.M., Kremer L., and Martinez-Alonso C.J., *Characterization of monoclonal antibodies specific for human growth hormone 22K and 20K isoforms*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1996. **81**:1613-1618.

39 Toogood A.A., Nass R.M., Pezzoli S.S., O'Neill P.A., Thorner M.O. and Shalet S.M., *Preservation of Growth Hormone Pulsatility Despite Pituitary Pathology, Surgery, and Irradiation*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1997. **82**:2215-2221.

40 Bidlingmaier M., Suhr J., Ernst A., Wu Z., Keller A., Strasburger C.J. and Bergmann A. *High-Sensitivity Chemiluminescence Immunoassays for Detection of Growth Hormone Doping in Sports*. Clinical Chemistry, 2009. **55**(3):445-453.

41 Zinoviev K.E., González-Guerrero A.B., Domínguez C., Lechuga L.M., *Integrated Bimodal Waveguide Interferometric Biosensor for Label-Free Analysis*. Journal of Lightwave Technology, 2011. **29**:1926–1930.

42 Duval D., González-Guerrero A.B., Dante S., Osmond J., Monge R., Fernández L.J, Zinoviev K.E., Domínguez C. and Lechuga L.M., *Nanophotonic lab-on-a-chip platforms including novel bimodal interferometers, microfluidics and grating couplers*. Lab Chip, 2012. **12**:1987-1994.

4. Inmunoensayo SPR para el diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito (HC)

4.1. Introducción

4.1.1. Hormona estimulante del tiroides (hTSH)

La hormona estimulante de la glándula tiroides (hTSH), también conocida como Tirotropina, se sintetiza en la adenohipófisis al igual que la hGH, y pertenece a una familia de glicoproteínas formada por la hTSH, hLH (hormona luteinizante), hFSH (hormona estimulante folicular) y hCG (gonadotropina coriónica), que presentan una estructura heterodimérica compuesta por la subunidad α , que es común a las cuatro glicoproteínas, y una subunidad β que confiere una actividad biológica específica a cada una de ellas [1]. La hTSH está formada por 210 aminoácidos y aunque el peso molecular calculado a partir de su secuencia aminoacídica es de 28000 Da, los carbohidratos presentes en su estructura aumentan significativamente este valor que se estima cercano a 30000 Da. La hTSH desempeña un papel clave en la función tiroidea puesto que estimula

el crecimiento de la glándula y es responsable de la regulación de la síntesis de hormonas tiroideas, tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃), a través de las cuales el tiroides controla el metabolismo y mantiene la temperatura corporal normal y el ritmo cardíaco [2, 3]. La síntesis y liberación de la hTSH está regulada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que ejerce una función estimuladora de la hTSH, y por las propias hormonas tiroideas T₃ y T₄ cuya presencia en circulación causa un efecto inhibitorio de la liberación de la hTSH mediante un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa. Además, la hGH, la dopamina y los glucocorticoides disminuyen la liberación de la hormona.

4.1.2. Diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito Neonatal

El hipotiroidismo congénito (HC) se define como una deficiencia de hormonas tiroideas que se presenta en el momento del nacimiento del individuo. Las causas más comunes de esta enfermedad son un problema en el desarrollo de la glándula del tiroides (disgénesis) o un desorden en la biosíntesis de las hormonas tiroideas (dishormogénesis), resultando ambas en un HC primario. El HC secundario o central está causado por una deficiencia congénita de la hTSH, que en muy raras ocasiones se debe a una causa aislada (mutaciones en el gen que codifica para la subunidad β de la hTSH), sino que normalmente está asociada a otras deficiencias de hormonas pituitarias, lo que se diagnostica como Hipopituitarismo Congénito. Por otro lado, cuando la deficiencia congénita afecta directamente al transporte hormonal o causa la resistencia de tejidos diana a la Tiroxina, se diagnostica un HC periférico, el cual es también extremadamente raro. Según si la enfermedad es o no reversible, el HC se clasifica en permanente o transitorio. El primero se refiere a una deficiencia de hormonas tiroideas persistente, que requiere un tratamiento de por vida. El HC transitorio, por el contrario, significa una deficiencia temporal de T₃ y T₄, de forma que tras los primeros meses o años después del nacimiento se alcanzan niveles normales de hormona. La etiología de la enfermedad determina el tipo de HC en el diagnóstico de confirmación, que es fundamental para el tratamiento de la misma [4]. El 75% de los hipotiroidismos congénitos corresponden a disgenesias tiroideas, ya sea agenesia (ausencia total de la glándula), hipoplasia

(desarrollo incompleto de la glándula), o más frecuentemente, ectopía de la glándula, caso en el que normalmente el niño nace con tiroides lingual o sublingual. El 10% de los casos de HC se deben una dishormogénesis tiroidea, y el resto a hipotiroidismos secundario y transitorio [5].

El HC primario se desarrolla en la etapa fetal y afecta principalmente al sistema nervioso y tejido esquelético, aunque el recién nacido no presenta síntomas debido a la protección relativa y transitoria otorgada por el paso transplacentario de hormonas tiroideas maternas. Es la enfermedad endocrina más frecuente en pediatría, con una incidencia de 1 entre 3000 o 4000 recién nacidos, y la causa más común de retraso mental prevenible por medio de un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno [6, 7]. A comienzos de 1970 se creó un programa de *screening* neonatal para la detección temprana de la enfermedad que se puso en funcionamiento en países desarrollados y gran parte de los países en desarrollo. Este diagnóstico previene el retraso mental si el tratamiento comienza dentro del primer mes de vida [7-9]. El método, desarrollado ampliamente durante los últimos 35 años, se lleva a cabo de forma rutinaria entre las primeras 48 y 72 h tras el nacimiento, y consiste en la medida de la concentración de hTSH en sangre total obtenida mediante la punción del talón del recién nacido, con la que se impregna un papel de filtro. En el caso de un resultado positivo en este test, se realiza una prueba de confirmación diagnóstica en la que se determinan los niveles de hTSH y T₄ en suero, cuyos niveles fisiológicos en el momento del nacimiento se encuentran en el intervalo de concentración de 1,7-10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (0,23-1,37 ng/mL) y 650-1630 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente [8, 10]. El nivel de corte de la hTSH en sangre total es de 10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (1,37 ng/mL), de forma que niveles inferiores indican la ausencia de hipotiroidismo. Un nivel de hTSH por encima de 25 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (3,34 ng/mL) sugiere HC primario e implica que se realice un estudio de confirmación diagnóstica de forma inmediata. Por otro lado, se mantiene una zona de seguridad con niveles de hTSH entre 10-25 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (1,37-3,34 ng/mL) en sangre total, ante la posibilidad de hipotiroidismos con leves elevaciones de hTSH, y se procede a una segunda determinación a las dos semanas aproximadamente del nacimiento. Si tras el segundo test los niveles de hTSH se mantienen por encima de 10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (1,37 ng/mL) se procede a la confirmación

diagnóstica. Niveles séricos de hTSH superiores a $10 \mu\text{U/mL}$ ($1,37 \text{ ng/mL}$) y de T_4 inferiores a $650 \mu\text{g/mL}$ confirman el diagnóstico, de manera que se procede a un estudio completo realizando las pruebas necesarias para conocer las causas de la enfermedad y poder realizar el tratamiento apropiado. Este estudio se realiza igualmente en caso de descartarse HC primario con niveles de hTSH superiores a $10 \mu\text{U/mL}$ ($1,37 \text{ ng/mL}$), con la intención de averiguar el tipo de HC que padece el niño [8, 11]. Frente a resultados no concluyentes también se debe realizar tratamiento.

Los inmunoensayos que se llevan a cabo en la determinación de la hTSH y la T_4 , tanto en el test de *screening* como en las pruebas confirmatorias son de tipo ELISA, IRMA y flouorinmunoanálisis [8, 12]. El uso del biosensor SPR frente a estas tres técnicas inmunológicas aporta importantes ventajas. Por un lado se evita el uso de moléculas marcadoras, necesarias en las técnicas convencionales, que requieren de previas etapas de incubación de la muestra, así como del empleo de personal cualificado para el trabajo con cierto tipo de marcadores (como en el caso del uso de radioisótopos) e instrumentación. Estos requerimientos hacen el análisis más laborioso e incrementan los costes del mismo así como el tiempo empleado. En este sentido el uso del biosensor SPR permite la automatización del análisis, puesto que este se realiza con una simple inyección de la muestra en el dispositivo, y una lectura directa del resultado. Puesto que el tiempo de análisis está limitado exclusivamente al recorrido de la muestra desde su inyección hasta que alcanza la superficie sensora, la medida se realiza en 20 minutos. Por otro lado, la portabilidad de estos dispositivos permite realizar medidas in-situ, de forma que la muestra de sangre total o suero del recién nacido puede ser analizada en el mismo momento y lugar en que se obtiene, lo que junto con la rapidez del análisis los hace ideales para su uso en el *screening* neonatal. En contraposición, la desventaja que presenta el uso del biosensor SPR frente a las técnicas analíticas utilizadas convencionalmente en la determinación de la TSH y T_4 , es que no permite alcanzar la sensibilidad que puede llegar a obtenerse empleando los kits comerciales disponibles, $0,5 \text{ pg/mL}$ en el caso de la T_4 y $0,05 \mu\text{U/mL}$ (7 pg/mL) en el caso de la TSH.

4.2. Estrategias utilizadas para el desarrollo del inmunoensayo de detección de la hTSH

El inmunoensayo para la determinación de hTSH se llevó a cabo empleando dos métodos distintos para la inmovilización del anticuerpo mAc hTSH-2. El primero de ellos se basó en el uso del sistema biotina/estreptavidina optimizando el método desarrollado previamente para la inmovilización del mAc hGH-12 en el trabajo con las isoformas de la hGH (Capítulo 3), con el que se consiguió un alto rendimiento en el inmunoensayo. La superficie se funcionalizó con la SAM optimizada en ese trabajo, formada por una mezcla de MHDA y MUOH, en la que $\chi_{\text{MHDA}}=0,02$. Como se comentó anteriormente, el método requiere la biotinilación tanto de la SAM de la superficie como del anticuerpo. En este trabajo fueron utilizadas nuevas estrategias para llevar a cabo ambos procesos, con la intención aumentar la eficiencia de la inmovilización del anticuerpo, y con ello el rendimiento del inmunoensayo. Con el fin de comparar la eficiencia del método de inmovilización de anticuerpos vía biotina/estreptavidina, con otra estrategia de inmovilización utilizada convencionalmente, el inmunoensayo de la hTSH también se llevó a cabo mediante el desarrollo de un método para la inmovilización del mAc hTSH-2, basado en el uso de la proteína G. En este método, el anticuerpo fue inmovilizado en su forma nativa sobre una monocapa de proteína G preparada mediante la unión covalente de esta proteína a la superficie sensora previamente funcionalizada con la SAM apropiada.

4.3. Inmovilización del anticuerpo anti-hTSH (mAc hTSH-2) mediante el sistema biotina/estreptavidina

Para la formación de la monocapa de estreptavidina se utilizó una nueva estrategia de biotinilación de la SAM de la superficie, basada en el uso de una molécula distinta a la biotina-LC-hidrazida, empleada en el procedimiento de biotinilación de la SAM descrito en el Capítulo 3. En el reactivo biotina-LC-hidrazida, la biotina está unida a una cadena hidrocarbonada (LC) que funciona de brazo espaciador, y se une a la SAM a través del grupo hidrazida que presenta el extremo de dicha cadena. El nuevo reactivo

que se empleó, amino-PEG₂-biotina, es un derivado del PEG biotinilado en el que la cadena de PEG, de longitud similar a la cadena hidrocarbonada del primer reactivo, actúa al igual que éste como brazo espaciador entre la molécula de biotina y la superficie de la monocapa. A diferencia de las cadenas hidrocarbonadas el PEG aporta flexibilidad al brazo espaciador, lo que favorece la libertad de movimiento de las moléculas de estreptavidina que se unan a la biotina, y por otro lado, debido al carácter hidrofílico de la molécula, el PEG ejerce una fuerte inhibición de la adsorción inespecífica de otras proteínas. Para comparar ambas estrategias de biotinilación se prepararon dos superficies de estreptavidina empleando los dos reactivos de biotina siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.

La biotinilación del mAc hTSH-2 para su unión a la monocapa de estreptavidina se llevó a cabo siguiendo dos estrategias diferenciadas en función de la zona del anticuerpo que resulta modificada. Una de ellas se utilizó para la biotinilación de los grupos amino del anticuerpo, y la otra para la biotinilación de los radicales glucídicos presentes en su estructura, tras la oxidación de los mismos. Para la primera estrategia se emplearon dos derivados de biotina distintos, el reactivo sulfo-NHS-LC-biotina, empleado en el Capítulo 3, y el reactivo NHS-PEG₄-biotina, mientras que para la biotinilación de los radicales glucídicos oxidados se empleó biotina-LC-hydrazida (también utilizado en la biotinilación de la SAM). Mientras que los derivados con el grupo NHS reaccionan con los grupos amino del anticuerpo, pertenecientes mayormente a las cadenas laterales de Lisinas distribuidas por toda su superficie, el reactivo biotina-LC-hydrazida reacciona con los grupos aldehídos, los cuales forman parte de los radicales glucídicos una vez han sido oxidados. Puesto que a diferencia de los residuos de Lisina, presentes en toda la estructura del anticuerpo, las cadenas glucídicas sólo se encuentran en la región Fc, esta estrategia de biotinilación, dirigida a la zona del anticuerpo que no interviene en la unión con el antígeno, resulta mucho más interesante que la primera. Sin embargo, el patrón de glicosilación varía mucho entre anticuerpos policlonales y monoclonales ya que estos últimos presentan menos carbohidratos en su estructura, por lo que esta estrategia de biotinilación puede no resultar eficiente para ese tipo de anticuerpos, como es el caso de este trabajo. En el caso de que la biotinilación se lleve a cabo vía grupos amino del anticuerpo, el uso de un reactivo con una molécula de

PEG como brazo espaciador entre la biotina y el anticuerpo, en lugar del brazo LC del derivado de biotina hasta ahora empleado, al igual que en el caso de la biotilación de la monoacapa de tioles, aporta libertad de movimiento a los anticuerpos unidos a la estreptavidina, además de ejercer una fuerte inhibición de la adsorción inespecífica. Además, debido al tamaño del PEG del NHS-PEG₄-biotina, la longitud del brazo espaciador es mayor que la del sulfo-NHS-LC-biotina, lo que aporta mayor capacidad para prevenir el impedimento estérico entre anticuerpos.

Al igual que en el trabajo con la hGH, para aumentar el rendimiento de la biotilación y evitar en lo posible la contaminación de la muestra de mAc hTSH-2 biotilado con otras proteínas presentes en el líquido ascítico murino (muestra de partida), se llevó a cabo la purificación por afinidad del anticuerpo previamente a su biotilación. El mAc hTSH-2 fue purificado mediante cromatografía de afinidad. Debido al alto coste de la hTSH, se descartó funcionalizar la columna con la propia hormona, y se utilizó una columna de proteína G comercial. Dada la gran afinidad que la proteína G presenta por la región Fc de todas las subclases de IgG (especialmente de ratón y humanos), estas columnas cromatográficas permite obtener la muestra de anticuerpos libre de cualquier proteína o anticuerpo que no sea IgG. De este modo el grado de purificación del mAc hTSH-2 (IgG₁) depende solo del contenido de otras IgGs presentes en la muestra, que se supone representan una fracción mínima de anticuerpo. Para purificar el mAc hTSH-2 en primer lugar el líquido ascítico precipitado con sulfato amónico, se separó del resto de componentes del mismo mediante centrifugación y se preparó en fosfato sódico 20 mM pH 7. La purificación se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.3.1 para la columna de hGH, utilizando como buffer de unión a la columna el fosfato sódico pH 7 y eluyendo el anticuerpo con una solución de Gly-HCl pH 2,8.

Una vez purificado, se procedió a la biotilación del mAc hTSH-2, utilizando la relación biotina:Ac 50:1, que ya había demostrado ser la relación molar óptima para la inmovilización del anticuerpo en el trabajo con la hGH. La biotilación con los reactivos NHS-PEG₄-biotina y sulfo-NHS-LC-biotina se realizó siguiendo el mismo protocolo. Se prepararon dos soluciones de 1 mL de anticuerpo a una concentración de 1 mg/mL en

PBS pH 8, y a cada una se le añadió el volumen necesario de uno u otro reactivo, ambos preparados en agua a una concentración de 20 mM, para alcanzar un exceso molar de biotina de 50. Tras incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente, el exceso de biotina sin reaccionar se eliminó mediante el uso de una columna PD 10 con la que se dializó el medio del mAc hTSH-2 a PBS pH 7,4. Para la biotinilación con biotina-LC-hidrazida se procedió primero a la oxidación del anticuerpo, para lo cual se mezcló 1 mL de mAc hTSH-2 con 1 mL del agente oxidante, NaIO₄ 20 mM, ambos preparados en PBS pH 7,4, y la solución se incubó durante 30 minutos a 4° C, protegiéndola de la luz. Posteriormente se utilizó una columna PD 10 para eliminar el exceso de reactivo y cambiar el buffer de la muestra a PBS pH 7,4. Para la biotinilación del mAc hTSH-2 oxidado, a esta muestra se le añadió 54 µL de una disolución 50 mM de Biotina-LC-Hidracida preparada en DMSO, dejando la mezcla reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave, y posteriormente se eliminó el exceso de reactivo mediante diálisis del mAc hTSH-2 en una columna PD 10.

Las muestras de anticuerpo obtenidas con las distintas estrategias de biotinilación se inyectaron sobre la superficie del sensor preparada con estreptavidina a una concentración de 10 µg/mL en PBST pH 7,4, y la eficiencia de las distintas funcionalizaciones obtenidas, se evaluaron posteriormente mediante la inyección de una solución de 1 µg/mL de hTSH en ese mismo buffer.

4.4. Inmovilización del mAc hTSH-2 mediante la proteína G

El segundo método utilizado en el desarrollo del inmunoensayo para la detección de hTSH, se basó en el uso de la proteína G para la inmovilización del mAc hTSH-2. Esta proteína, descrita en el apartado 1.4, presenta afinidad por el fragmento Fc de numerosos tipos de anticuerpo, y mayor afinidad que la proteína A por las IgG₁ de ratón, tipo de inmunoglobulina al que pertenece el mAc hTSH-2. La unión del anticuerpo a la proteína G, previamente inmovilizada sobre la superficie sensora, permite el acoplamiento de este a la misma con una orientación apropiada para la unión del antígeno. En este método de inmovilización es fundamental la selección de condiciones de pH y fuerza iónica apropiadas para la unión del anticuerpo a la superficie sensora,

parámetros de gran importancia en la inmovilización de proteínas, debido a la influencia de estos sobre la conformación estructural y carga eléctrica de las mismas. Por este motivo, en primer lugar se optimizaron las condiciones de los buffers de inmovilización de la proteína G y del mAc hTSH-2, estudiando el efecto del pH y fuerza iónica del medio. Posteriormente, se optimizó la composición de la SAM, dado su papel clave en la distribución de los sitios de unión del anticuerpo a la superficie, y por tanto, en el grado de impedimento estérico, que afecta enormemente a la eficiencia de su inmovilización.

4.4.1. Optimización de buffers de inmovilización

Para la selección de los buffers adecuados para la inmovilización de la proteína G y para el acoplamiento del mAc hTSH-2 se utilizaron superficies funcionalizadas con la SAM que resultó óptima en la inmovilización de anticuerpos vía biotina/estreptavidina, compuesta por MHDA y MUOH, con una fracción molar de MHDA de 0,02. En la inmovilización de la proteína G se comparó el uso de los buffers PBS pH 7,4 y acetato pH 4, valores de pH superior e inferior al pI de la proteína (4,5), respectivamente. La proteína G se preparó a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y su inmovilización se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4. Para el estudio de las condiciones de inmovilización del mAc hTSH-2, este se preparó a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en acetato y PBS a pH 5,3, valor de pH indicado como óptimo por el fabricante, y en PBS pH 7,4. Estas soluciones de anticuerpo se fluyeron sobre las superficies de proteína G preparadas con PBS pH 7,4 y acetato pH 4, utilizando un flujo continuo de agua en el caso del acoplamiento del mAc hTSH-2 en los buffers acetato y PBS de pH 5,3, y un flujo de PBS pH 7,4 en el caso del acoplamiento del anticuerpo en este mismo buffer. Finalmente se cambió de buffer en continuo a PBST pH 7,4 y se inyectó 1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH preparada en este mismo buffer para evaluar la eficiencia de las distintas superficies de mAc hTSH-2 obtenidas.

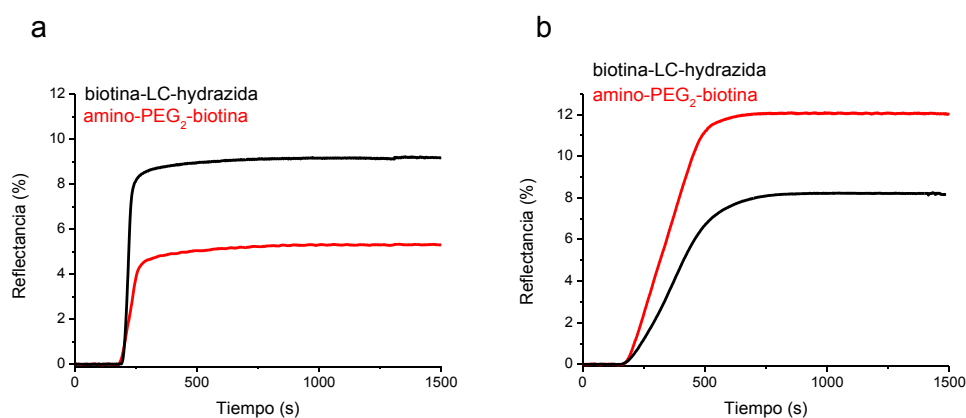
4.4.2. Formación de la SAM

Con la intención de encontrar la distribución del mAc hTSH-2 que permitiera alcanzar el máximo rendimiento del inmunoensayo se optimizó la proporción de los alcanotioles MHDA y MOUH, ensayándose las siguientes fracciones molares de MHDA (χ_{MHDA}): 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,55, y 1. El ensamblaje de la SAM se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez formada la monocapa, se llevó a cabo la inmovilización de la proteína G seguida del acoplamiento del mAc hTSH-2 en las condiciones previamente optimizadas como se conto en el apartado anterior, evaluándose finalmente el resultado de la optimización de la SAM mediante la detección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH en PBST pH 7,4, utilizando un flujo continuo de este mismo buffer.

4.5. Inmunoensayo para la determinación de hTSH mediante la inmovilización del mAc hTSH-2 vía biotina/estreptavidina

4.5.1. Condiciones óptimas para la inmovilización del mAc hTSH-2

En primer lugar se seleccionó el método adecuado para la biotilación de la SAM de la superficie, comparando el uso del reactivo amino-PEG₂-biotina y biotina-LC-hidrazida. Como se observa en la Figura 4.1, el primero de estos disminuyó considerablemente la señal de estreptavidina obtenida con biotina-LC-hidrazida, y sin embargo, aumentó la sensibilidad del inmunoensayo también de forma notable.



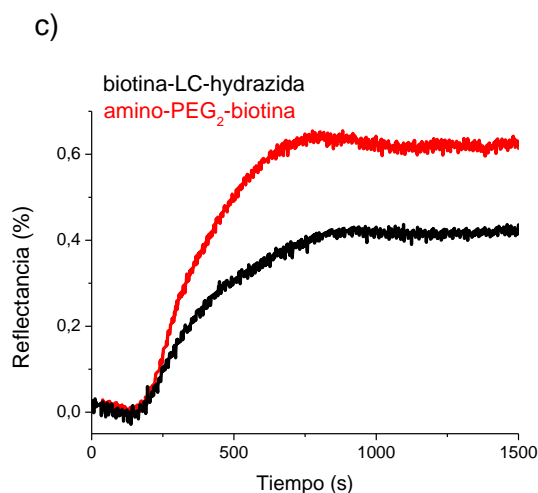


Figura 4.1. Sensorgramas correspondientes a: (a) la inmovilización de la estreptavidina, (b) acoplamiento del mAc hTSH-2 biotinilado y (c) detección de la hTSH empleando dos reactivos distintos para la biotinilación de la SAM.

Dada la gran afinidad de la unión biotina-estreptavidina, que tiene lugar incluso en condiciones extremas, la diferencia en la señal de estreptavidina sugiere que la gran densidad de ésta sobre la superficie biotinilada con el reactivo de cadena hidrocarbonada, corresponde a moléculas de estreptavidina que al unirse a la biotina se disponen de “forma tumbada” sobre la superficie. Esta disposición se vería impedida por la presencia de la cadena del PEG debido a la fuerte inhibición de la fisorción que ésta ejerce, impidiendo que tras la unión a la biotina, las moléculas de estreptavidina “se tumben”, obligándolas así a una disposición más vertical lo que favorece una orientación más adecuada para la posterior unión del anticuerpo biotinilado (Figura 4.2). Además, la mayor libertad de movimiento de la estreptavidina debida la flexibilidad de la cadena del PEG, también contribuiría a mejorar su orientación para una mayor accesibilidad del anticuerpo. De esta forma se explicaría la diferencia observada en la señal de inmovilización del mAc hTSH-2 y correspondiente unión de hTSH. En vista de la mejora de los resultados obtenidos biotinilando la monocapa con amina-PEG₂-biotina en lugar de biotina-LC-hidrazida, se escogió el primer el reactivo para la formación de la monocapa biotinilada.

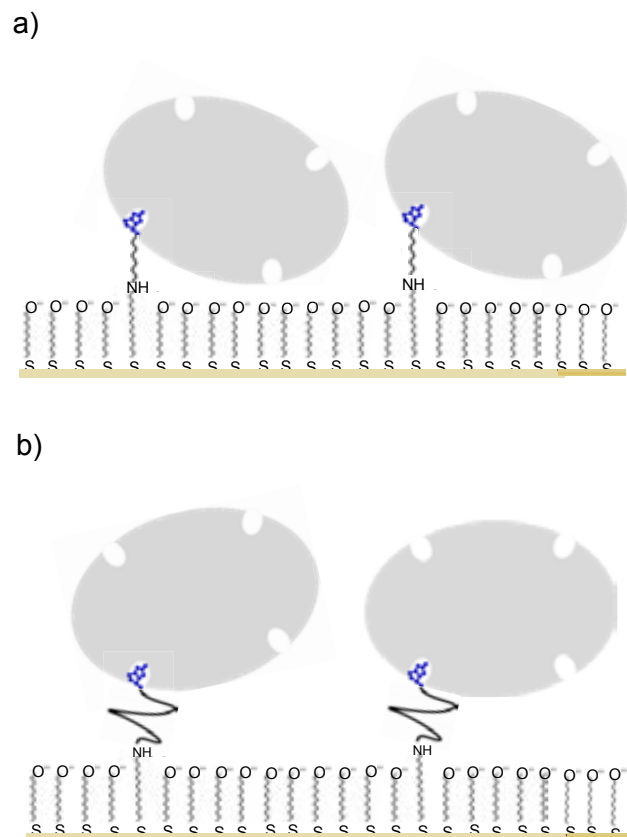
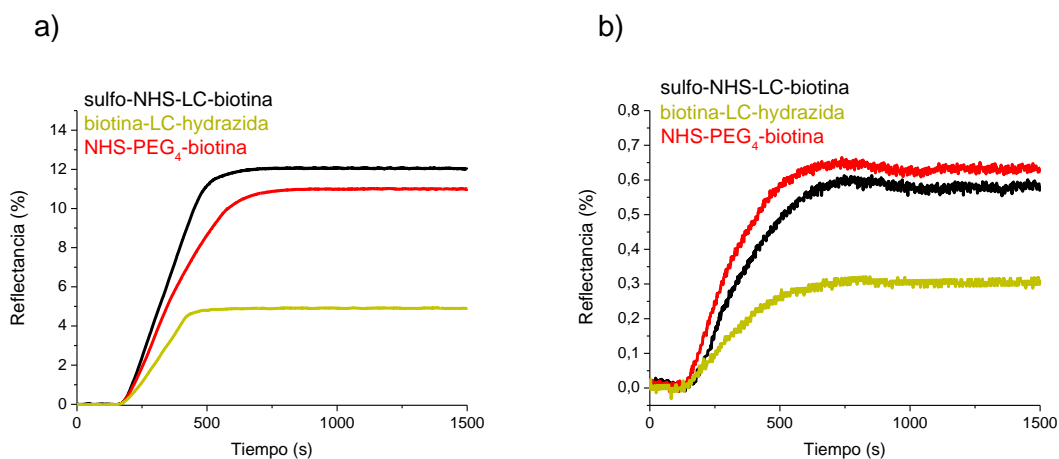


Figura 4.2. Unión de la esteptavidina a la monocapa biotinilada con (a) biotina-LC-hidracida y (b) amina-PEG₂-biotina.

A continuación se seleccionó el método de biotinilación del anticuerpo. Puesto que el objetivo del inmunoensayo de la hTSH era la detección en suero de niveles de concentración por debajo de 1,37 ng/mL, que equivalen a 10 μ U/mL, nivel de corte utilizado en el diagnóstico de HC, se consideró la posibilidad de utilizar un segundo anticuerpo para amplificar la respuesta en la detección de la hormona. Así pues, en esta segunda etapa de optimización se llevó a cabo un inmunoensayo tipo sándwich con la intención de obtener la máxima sensibilidad posible. Para ello se escogió como anticuerpo de detección el mAc hCG-21, que presenta una gran afinidad por la subunidad α de la hormona, no reconocida por el mAc hTSH-2. Este anticuerpo se preparó en PBST a 10 μ g/mL y se inyectó sobre la superficie sensora tras la unión de la hormona al mAc hTSH-2.

De las distintas estrategias utilizadas para la biotinilación del mAc hTSH-2, aquella dirigida a la modificación de la zona glicosilada del anticuerpo dio lugar a una gran reducción de la sensibilidad del inmunoensayo obtenida al biotinar el mismo a

través de sus grupos amino (Figura 4.3). Puesto que el método empleado para la biotilación del anticuerpo a través de sus grupos glucídicos está dirigido a la zona Fc de la molécula, siendo por tanto más específico que el segundo método, debería dar lugar a una mejor orientación del anticuerpo inmovilizado, la baja respuesta obtenida podría explicarse, por un contenido pobre en carbohidratos en la estructura del mAc hTSH-2. Por otro lado, los dos reactivos empleados para la biotilación del mAc hTSH-2 vía grupos amino produjeron resultados muy similares, aunque el sulfo-NHS-LC-biotin mejoró levemente la sensibilidad del ensayo. Así pues, el uso del derivado biotilado del PEG, al contrario que en el caso de la biotilación de la monocapa de tioles, no mejora el resultado obtenido con el reactivo con brazo espaciador LC. Las propiedades del NHS-PEG₄-biotina, que en principio deberían favorecer la libertad de movimiento del anticuerpo, y una disposición espacial en la que éste se encuentra más alejado de la superficie, podrían no tener efecto en este caso, si tras la unión a la estreptavidina, el anticuerpo biotilado con sulfo-NHS-LC-biotin se orienta de una forma adecuada, que no dificulta la accesibilidad de la hTSH. Puesto que el mayor rendimiento del inmunoensayo se observó utilizando este último reactivo en la modificación del mAc hTSH-2, fue el seleccionado para el desarrollo de este método.



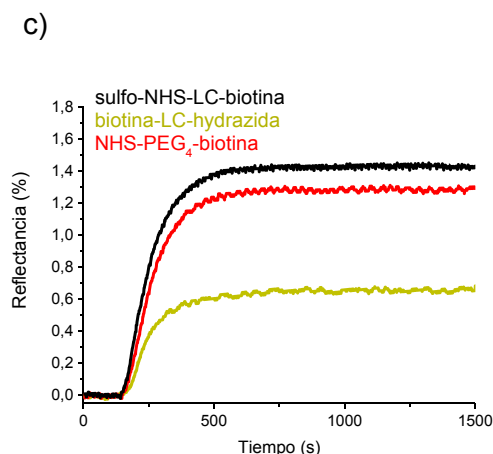


Figura 4.3. Inmunoensayo tipo sándwich empleando distintos reactivos para la biotinilación del mAc hTSH-2. Sensorgramas correspondientes a: (a) la inmovilización del anticuerpo, (b) unión de la hTSH al mAc hTSH y (c) unión del mAc hCG-21 a la hTSH.

Tras la optimización del proceso de formación de la superficie de mAc hTSH-2, se procedió a la selección de la concentración adecuada del mAc hCG-21 con la intención de emplear la cantidad mínima necesaria para alcanzar la máxima respuesta en la detección de la hTSH. Para ello, se funcionalizaron tres superficies sensoras con el mAc hTSH-2 llevando a cabo el protocolo de inmovilización optimizado, y tras fluir una solución de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH en PBST pH 7,4 sobre cada monocapa biofuncionalizada, se inyectó una solución de 50, 10 o 5 $\mu\text{g/mL}$ de mAc hCG-21 en este mismo buffer. Como se observa en la Figura 4.4, la concentración más baja de anticuerpo con la que se alcanzó la mayor señal de detección fue 10 $\mu\text{g/mL}$, por lo que esta se seleccionó para la realización del inmunoensayo.

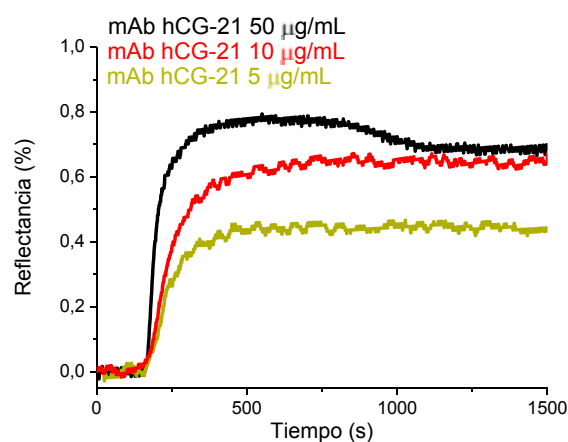


Figura 4.4. Sensorgrama correspondiente a la inmovilización del mAc hCG-21 a distintas concentraciones.

4.5.2. Determinación de hTSH en suero

Una vez optimizadas las condiciones del inmunoensayo para la detección de la hTSH en PBST se procedió a realización del inmunoensayo en suero. Previamente se comprobó la sensibilidad que podía alcanzarse en la detección de la hTSH en PBST, realizándose dos curvas de calibrado, una correspondiente a la detección directa de la hormona, y otra a la detección de la misma a través del sándwich con el anticuerpo hCG-21. En la Figura 4.5 se muestran los sensorgramas en cada caso, y las curvas de calibrado obtenidas indicando las correspondientes características analíticas. El límite de detección del ensayo directo supera el nivel de corte establecido para el diagnóstico de HC (1,37 ng/mL). Sin embargo, el uso del mAc hCG-21 como segundo anticuerpo aumenta notablemente la sensibilidad del inmunoensayo permitiendo reducir el límite de detección hasta 0,5 ng/mL, por lo que se procedió a la realización del mismo en suero.

La detección de la hTSH en suero se llevó a cabo en un rango de concentración entre 2 ng/mL y 5 µg/mL, realizando tres réplicas de cada medida. Tras la unión de la hTSH a la superficie de mAc hTSH-2, se procedió a la unión del segundo anticuerpo a la hormona. En la secuencia de ensayo no se llevó a cabo la regeneración de la superficie, de forma que las réplicas de las medidas se realizaron en el mismo o en distinto chip, pero siempre utilizando distintas celdas de medida. Al igual que en el trabajo con las isoformas de la hGH, la hTSH se preparó en suero humano comercial diluido en proporción 1:1 con PBST-S, buffer descrito en el apartado 2.5, con el que también se preparó el mAc hCG-21, y que se mantuvo en continuo una vez inmovilizado el mAc hTSH-2. En la Figura 4.6 se muestra la curva de calibrado. El límite de detección de este inmunoensayo es 1,2 ng/mL lo que permitiría su aplicación en el diagnóstico de confirmación del HC. Por otro lado la reproducibilidad del ensayo resultó excelente mostrando un coeficiente de variación de 6,26%.

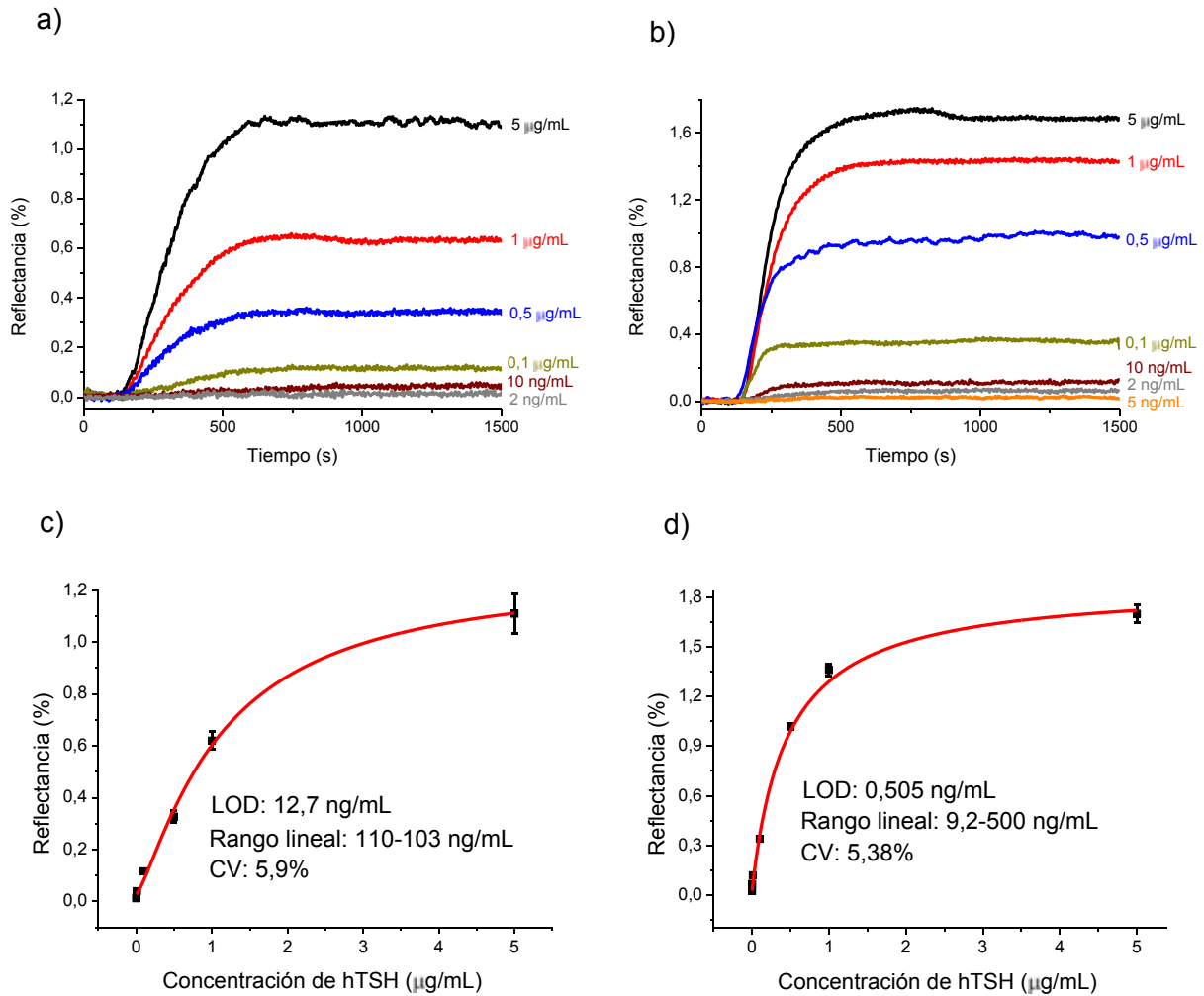


Figura 4.5. Inmunoensayo sándwich para la detección de la hTSH en buffer: (a) sensorgramas correspondiente a la unión de la hTSH al mAc hTSH-2 y (b) a la unión del mAc hCG-21 a la hTSH, y (c) (d) las correspondientes curvas de calibrado.

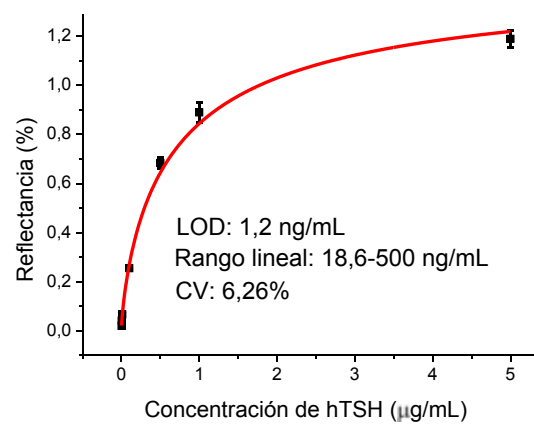


Figura 4.6. Curva de calibrado para la detección de la hTSH en suero.

4.6. Inmunoensayo para la determinación de hTSH mediante la inmovilización del mAc hTSH vía proteína G

4.6.1. Condiciones óptimas para la inmovilización del mAc hTSH-2

Los primeros parámetros a optimizar en el método de inmovilización del anticuerpo basado en el uso de la proteína G, fueron las condiciones de los buffers utilizados para la biofuncionalización con el mAc hTSH-2. Para ello, utilizando las condiciones de fuerza iónica que permiten la inmovilización de la proteína G mediante su acoplamiento amino a la SAM de la superficie, se estudió la influencia del pH de inmovilización de esta proteína, así como la del pH y fuerza iónica del acoplamiento del anticuerpo, sobre el rendimiento del inmunoensayo. En la Figura 4.7 se muestra la respuesta del SPR de la inmovilización de la proteína G en los buffers acetato y PBS, de pH 4 y 7,4, respectivamente. En la Figura 4.8 se muestran los sensorgramas correspondientes al acoplamiento del mAc hTSH-2 en los buffers acetato pH 5,3 y PBS de pH 5,3 y 7,4, sobre los dos tipos de superficie biofuncionalizadas con proteína G, así como las señales producidas por la posterior unión de la hTSH. Tanto las señales de unión del anticuerpo a la proteína G como las de detección de hormona se representan con el mismo código de colores empleado en la inmovilización de la proteína G, para establecer la correspondencia entre las mismas y el buffer utilizado en este procedimiento.

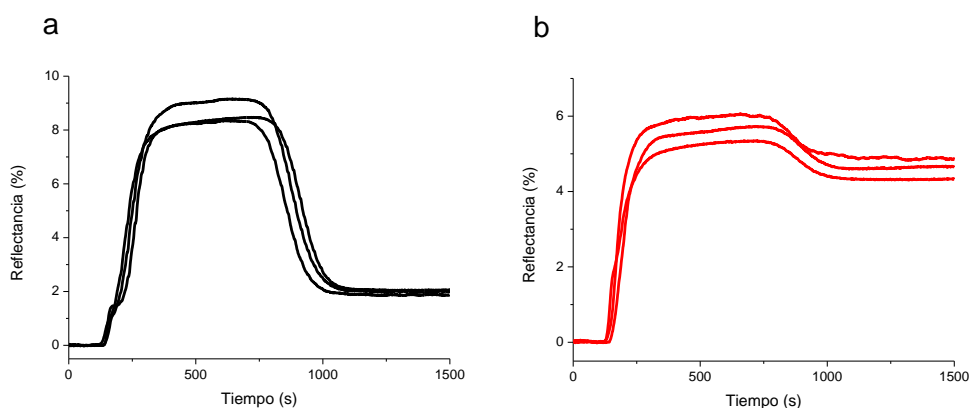


Figura 4.7. Señales de SPR obtenidas en la inmovilización de la proteína G en los buffers PBS pH 7,4 (a) y acetato pH 4 (b). Los sensorgramas muestran tres réplicas de cada medida.

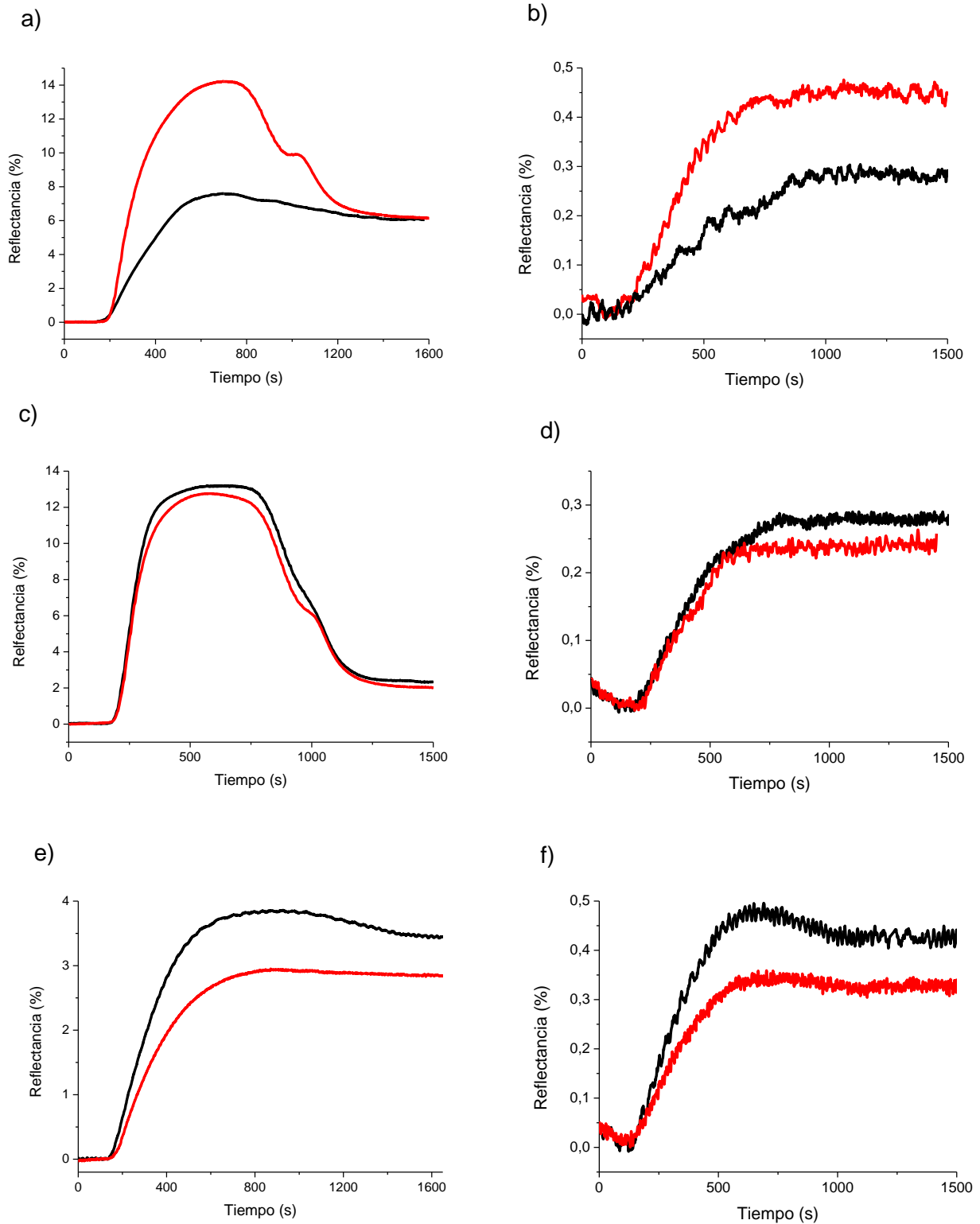


Figura 4.8. Sensorgramas correspondiente al acoplamiento del mAc hTSH-2 a la proteína G en buffer acetato pH 5,3 (a), PSB pH 5,3 (c) y PBS pH 7,4 (e), y la señales producidas por la unión de la hTSH en cada caso (b, d y f). Se distinguen las señales obtenidas cuando la proteína G se inmovilizó en PBS (negro) y en acetato (rojo).

Como se esperaba, la señal de inmovilización de la proteína G en acetato pH 4, valor de pH inferior a su pI (4,5), es mucho mayor que la obtenida utilizando PBS pH 7,4, valor de pH superior al mismo, aunque este último disminuye la variabilidad observada con acetato. Sin embargo, se observa como resultados tan diferentes en la inmovilización de la proteína dan lugar a un nivel similar de acoplamiento de anticuerpo, o incluso mayor en la superficie donde se obtuvo menor señal de inmovilización de proteína G, dependiendo del buffer utilizado en la unión del mAc hTSH-2. La señal del anticuerpo inyectado en acetato pH 5,3 siguió un perfil muy distinto en las monocapas de proteína G obtenidas en distintas condiciones de pH (Figura 4.8.a). Aunque el aumento neto de señal debido al acoplamiento del anticuerpo fue el mismo, el flujo de mAc hTSH-2 sobre la superficie sensora dio lugar a un cambio en la respuesta sensora mucho mayor sobre aquella preparada utilizando el buffer de pH 4. La señal de unión de la hTSH al anticuerpo fue también mucho mayor cuando se utilizó esta superficie en lugar de la preparada inmovilizando la proteína G en PBS pH 7,4 (Figura 4.8.b). El uso de PBS para la inmovilización del anticuerpo llevó a una disminución de la señal obtenida con acetato, especialmente cuando se utilizó la monocapa de proteína G preparada en condiciones de pH inferior a su pI, sin embargo resultó en una mayor correlación con la señal de unión de la hTSH. La respuesta tanto en el acoplamiento del mAc hTSH-2 como en la unión de la hormona, fue mayor al inmovilizarlo en PBS pH 7,4 que en PBS pH 5,3 (Figura 4.8.c, d, e y f).

Dada la discordancia de los resultados teniendo en cuenta la falta de correlación entre la señal de acoplamiento de anticuerpo y la señal de detección de hormona cuando la inmovilización del mAc hTSH-2 se lleva a cabo en acetato pH 5,3, se inyectaron las distintas soluciones del mismo sobre la superficie sin proteína G, únicamente cubierta por la SAM, para descartar la posible fisisorción del anticuerpo. En la Figura 4.9.a se muestra la respuesta para cada caso. Los resultados demuestran que el buffer PBS ejerce una fuerte inhibición de la adsorción del anticuerpo sobre la superficie, que se hace más notable al aumentar el pH, de manera que el PBS de pH 7,4 inhibe completamente su unión a la SAM y el de pH 5,3 da lugar a una señal casi despreciable. Sin embargo, se observa una gran adsorción cuando se inyecta en acetato pH 5,3, aunque el mAc hTSH-2

adsorbido sobre la SAM no muestra capacidad de reconocimiento de la hTSH, puesto que la inyección de la hormona no produce señal de detección (Figura 4.9.b). Estos resultados explican la falta de correlación entre las señales de acoplamiento de anticuerpo y la correspondiente unión de hTSH cuando el primero es inmovilizado en acetato pH 5,3. Puesto que el anticuerpo fisisorbido no conserva su función de unión a la hTSH, la señal de detección obtenida en los experimentos realizados inmovilizándolo en este buffer, corresponde a la unión de la hormona a la fracción de mAc hTSH-2 unido a la proteína G. Así pues, la diferencia observada en las señales de detección de hormona obtenidas cuando el anticuerpo ha sido inmovilizado en acetato pH 5,3, indica la presencia de mayor cantidad del mismo fisisorbido en la superficie de proteína G preparada en condiciones de pH superior a su pI (pH 7,4). Teniendo en cuenta que a este pH se inmoviliza menor cantidad de proteína que a pH inferior a su pI (pH 4), los resultados sugieren que la mayor disponibilidad de superficie libre probablemente favorece en mayor medida la fisisorción del anticuerpo que en el caso en que la proteína G se inmoviliza en acetato pH 4.

Por otro lado, la diferencia en la pendiente inicial de la señal observada durante la unión del mAc hTSH-2 en acetato pH 5,3 a la superficie de proteína G (Figura 4.8.a), indica que se une mayor cantidad de anticuerpo sobre la monocapa de proteína obtenida al utilizar el buffer de pH 4, ya que la densidad de proteína G en esta monocapa es mayor que en la monocapa de proteína preparada a pH 7,4. Sin embargo, la disminución de la señal hasta alcanzar el mismo nivel que la señal obtenida al utilizar esta segunda monocapa, sugiere que tiene lugar la disociación de parte del anticuerpo unido a la proteína como consecuencia de una interacción débil entre ambos, probablemente causada porque la inmovilización de la proteína G en acetato pH 4 resulta en una orientación tal de la misma que dificulta la accesibilidad del mAc hTSH-2.

Por otra parte, la fisisorción del anticuerpo en acetato pH 5,3 explica la similitud entre los niveles de señales de unión de hTSH obtenidos al llevar a cabo el acoplamiento del mismo en este buffer y en PBS pH 5,3 sobre la superficie de proteína G preparada a pH superior a su pI, ya que probablemente en ambos casos la fracción de mAc hTSH-2 unido a la proteína G es similar (Figura 4.8.b y d).

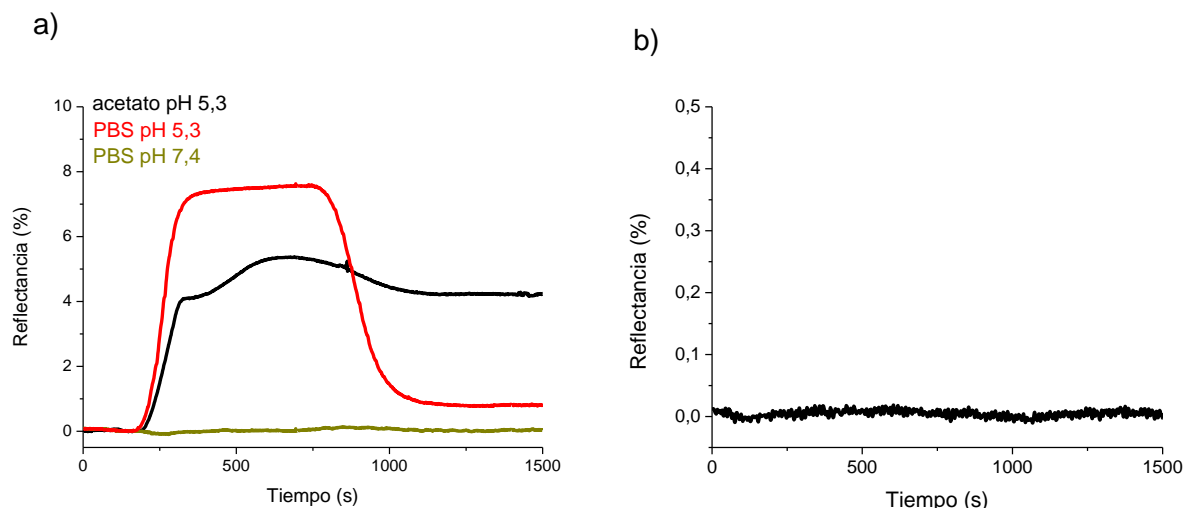


Figura 4.9. Señales SPR correspondientes a la fisorción del mAc hTSH-2 en los distintos buffers utilizados para su acoplamiento a la proteína G (a), y (b) señal de unión de la hTSH a la superficie de anticuerpo donde se obtuvo mayor señal de inmovilización del mismo (con acetato).

Como se comentó anteriormente aunque la señal de inmovilización de proteína G fue considerablemente mayor en acetato pH 4 que en PBS pH 7,4 (Figura 4.7), el nivel de acoplamiento del mAc hTSH-2 fue similar o incluso mayor en el caso en que la proteína G se inmovilizó a pH superior a su pI (Figura 4.8). Este último caso se observó cuando la inmovilización del anticuerpo se llevó a cabo en PBS de pH 5,3 y 7,4. Puesto que en estas condiciones la fisorción del mismo es nula o despreciable, la mayor respuesta de la superficie de proteína G preparada a pH 7,4 sugiere que la conformación que adopta la molécula en condiciones de pH superior a su pI favorece un acoplamiento de la misma a la SAM en el que intervienen menos residuos aminoacídicos, aumentando así la probabilidad de mayor número de dominios de unión al anticuerpo libres. Finalmente, puesto que se descartó realizar la inmovilización del mAc hTSH-2 en acetato pH 5,3, dada la fisorción del anticuerpo se seleccionó el PBS pH 7,4 como buffer óptimo para llevar a cabo tanto la inmovilización de la proteína G como la del anticuerpo, ya que el mayor rendimiento del inmunoensayo se consiguió con estas condiciones.

Una vez seleccionados los buffers de inmovilización adecuados para la realización del inmunoensayo, se procedió a la optimización de la distribución de la

proteína G sobre la superficie. Para ello se estudió el efecto de la variación de la proporción de puntos de unión a la proteína de la SAM, que al igual que la que se utilizó en el inmunoensayo basado en el sistema biotina-estreptavidina para la inmovilización del anticuerpo (apartado 4.4), se formó con la mezcla de los alcanotioles MHDA y MUOH. Se ensayaron distintas fracciones molares de MHDA en un intervalo de 0,01 a 1, llevándose a cabo la inmovilización de la proteína G en PBS pH 7,4 a 50 $\mu\text{g/mL}$ mediante el método covalente descrito en el apartado 2.4. Posteriormente se estableció un flujo continuo de PBS pH 7,4 y se realizó el acoplamiento del mAc hTSH-2 en este mismo buffer a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, y finalmente se estableció un flujo continuo de PBST pH 7,4 y se procedió a la detección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH en este mismo buffer. La respuesta del sensor para la inmovilización de la proteína G y acoplamiento del anticuerpo, obtenida con las distintas superficies, se muestra en el gráfico de la Figura 4.10.a. Como se observa, la señal de inmovilización de proteína G aumenta con la fracción molar de MHDA, con un gran aumento cuando se incrementa χ_{MHDA} de 0,1 a 0,55, valor por encima del cual la señal se mantiene invariable. Este resultado indica que la saturación de la superficie por la proteína G tiene lugar cuando la fracción molar de MHDA de la SAM es igual o superior a 0,55. El acoplamiento del mAc hTSH-2 a la proteína aumentó con la señal de inmovilización de ésta hasta llegar a la monocapa de χ_{MHDA} igual a 0,05, a partir de la cual al aumentar la proporción de MHDA la señal de anticuerpo fue descendiendo, de forma que los niveles de señal obtenidos con las dos fracciones molares mayores de MHDA y la menor de ésta fueron muy similares. Como se observa en la Figura 4.10.b la respuesta en la detección de la hTSH muestra una fuerte correlación con la de la inmovilización del anticuerpo. Ambas sugieren que la unión del mAc hTSH-2 a la proteína G aumenta con la cantidad de proteína inmovilizada, hasta alcanzar una densidad óptima de la misma sobre la superficie a partir de la cual el impedimento estérico entre moléculas de anticuerpo reduce el acoplamiento de éste a la misma. Así pues, la SAM óptima que dio lugar al mayor rendimiento del inmunoensayo fue la de χ_{MHDA} igual a 0,05.

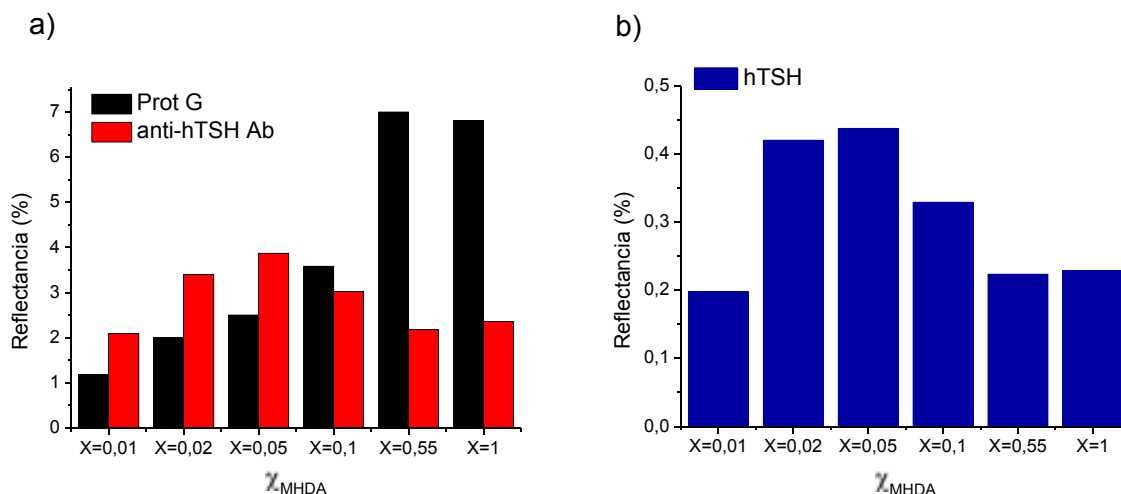


Figura 4.10. Representación de la señales de SPR producidas por la inmovilización de la proteína G y correspondiente acoplamiento del mAc hTSH-2 a la misma (a), y por la unión de la hTSH al anticuerpo (b), en función del valor de χ_{MHDA} de la SAM.

4.6.2. Reutilización de la superficie de mAc hTSH-2

Cuando el anticuerpo se inmoviliza, en su forma nativa, a través de su unión por afinidad a una proteína, como es el caso de la proteína G, la reutilización de la superficie de anticuerpo está limitada por el tipo de unión que se establece entre la proteína receptora y el anticuerpo. Debido a que la unión entre la proteína G y un anticuerpo son de la misma naturaleza físico-química que las que mantienen unido el anticuerpo a su antígeno específico, y que ambas interacciones presenta una afinidad similar ($K_a 10^8$ - 10^9) [13, 14], cualquier buffer utilizado para la ruptura de la unión Ag-Ac afectaría igualmente a la unión del anticuerpo a la proteína orientadora, perdiéndose anticuerpo de la superficie. Los procedimientos empleados para poder regenerar la superficie sensora en estos casos hacen uso de una reacción de entrecruzamiento mediada por una molécula denominada entrecruzador (*crosslinker*), capaz de generar enlaces covalentes entre ambos. El principal problema que presenta el uso de *crosslinkers*, es que reaccionan con grupos funcionales que pueden estar presentes tanto en el anticuerpo como en la proteína de unión al mismo, por lo que pueden generar uniones dentro de las mismas moléculas, y por tanto, alterar su funcionalidad.

Para poder reutilizar la superficie funcionalizada con mAc hTSH-2, se llevó a cabo un procedimiento de entrecruzamiento (*crosslinking*) mediante el uso de la molécula BS³ (bis-(sulfosuccinimidil)-suberato), la cual reacciona con los grupos amino de las proteínas para establecer enlaces amida. Con la intención de minimizar la posible alteración de la funcionalidad del anticuerpo debido a la reacción de entrecruzamiento, se optimizó la concentración de BS³ más baja posible que permitiera que la unión entre el mAc hTSH-2 y la proteína G no resultara afectada por el proceso de regeneración de la superficie. Puesto que no se conocían las condiciones del buffer de regeneración que permitieran romper la unión hTSH–mAc anti-hTSH, preservando lo más posible la estabilidad del anticuerpo, estas se optimizaron previamente al estudio de la concentración de BS³. Este proceso se llevó a cabo utilizando el sistema biotina/estreptavidina, que garantiza la unión del anticuerpo a la superficie durante el proceso de regeneración. Las soluciones de regeneración que se ensayaron fueron HCl 5 mM y Gly 50 mM/HCl pH 2,8. El HCl 5 mM se escogió porque fue la solución empleada en el trabajo con la hGH, y había funcionado exitosamente. La glicina de pH 2,8 se escogió porque había sido utilizada como buffer de elución en la purificación del mAc hTSH-2, y había resultado el buffer más eficiente en la ruptura de la unión del anticuerpo a la columna de proteína G, empleando las condiciones menos extremas posibles. Tras la unión de la hTSH (inyectada en PBST pH 7,4 a una concentración de 1 µg/mL) a la superficie de mAc hTSH-2, preparada mediante el método basado en el sistema biotina-estreptavidina utilizado en el inmunoensayo descrito en el apartado 4.4, se fluyeron las soluciones de HCl 5 mM y Gly 50 mM pH 2,8, en celdas independientes, durante 30 segundos y manteniendo el flujo de PBST a 30 µL/min. Posteriormente se inyectó de nuevo la misma solución de hormona. Como se observa en la Figura 4.11, tras el paso de las dos soluciones de regeneración se recuperó el nivel de señal de SPR original, previo a la inyección de ambas. Sin embargo, la respuesta de la superficie en la detección de la hTSH tras utilizar las distintas soluciones fue distinta, de manera que aquella donde se empleó el HCl 5 mM, dio lugar a una señal de detección menor de la observada en la primera inyección de hormona, mientras que la superficie regenerada con Gly 50 mM pH 2,8 dio lugar a la misma respuesta. Aunque las dos soluciones empleadas produjeron la ruptura total de la unión de la hTSH al anticuerpo

recuperándose la señal SPR basal, este resultado indica que la solución de HCl 5 mM es demasiado agresiva en cuanto a la estabilidad del anticuerpo se refiere y no permite reproducir la respuesta en el siguiente ciclo de medida de la hTSH, mientras que el buffer de glicina no afecta a la estabilidad de la superficie biofuncionalizada con mAc hTSH-2. Puesto que con esta solución se consiguió regenerar la superficie sin reducir su eficiencia, se seleccionó para el desarrollo del inmunoensayo.

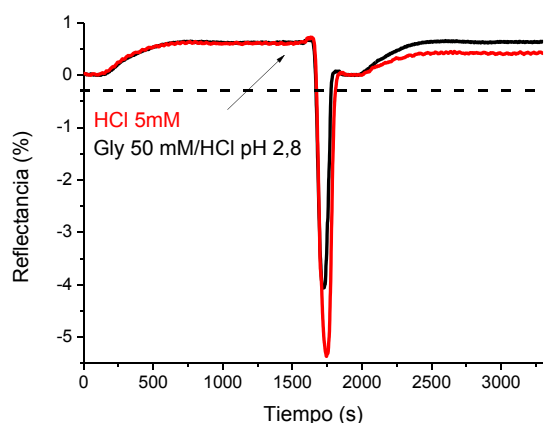


Figura 4.11. Sensorgrama correspondiente a dos ciclos de medida de la hTSH utilizando distintas condiciones de regeneración.

Posteriormente se procedió a la optimización de la concentración del BS3 utilizando la Gly 50 mM pH 2,8 para regenerar la superficie. Las instrucciones del fabricante del reactivo sugieren que para concentraciones de anticuerpo mayores de 5 mg/mL debe emplearse una cantidad del reactivo 10 veces superior, mientras que para una concentración inferior se recomienda utilizar de 20 a 50 veces mayor cantidad de BS³. Puesto que la concentración de mAc hTSH-2 a inmovilizar era de 3 órdenes menor (10 µg/mL), se optó por empezar estudiando el efecto de concentraciones de *crosslinker* en un intervalo de relación molar Ac:BS³ por encima de 1:50. Se prepararon tres superficies sensoras con la proteína G, utilizando las condiciones óptimas descritas en el apartado 4.5.1. Tras el acoplamiento del mAc hTSH-2 sobre cada superficie de proteína G, se realizó el procedimiento de *crosslinking* según las instrucciones del fabricante y

ensayando las relaciones molares $Ac:BS^3$ 1:100, 1:500 y 1:1000. Seguidamente se fluyó sobre cada superficie de anticuerpo la solución regeneradora para evaluar la eficiencia del mismo. Como se observa en la Figura 4.12 la mayor relación molar $Ac:BS^3$ ensayada, 1:1000, fue la única con la que se consiguió que no se perdiera mAc hTSH-2 unido a la monocapa de proteína G, por lo que fue la relación óptima seleccionada para la reutilización de la superficie. En el sensorgrama de la Figura 4.13 se muestra la repuesta a lo largo de tres ciclos de medida. Se puede observar como la sensibilidad del inmunoensayo no resulta afectada por el uso del *crosslinker*, y como el sistema de regeneración permite la reutilización de la superficie al menos durante tres ciclos de medida sin alterar la funcionalidad de la misma.

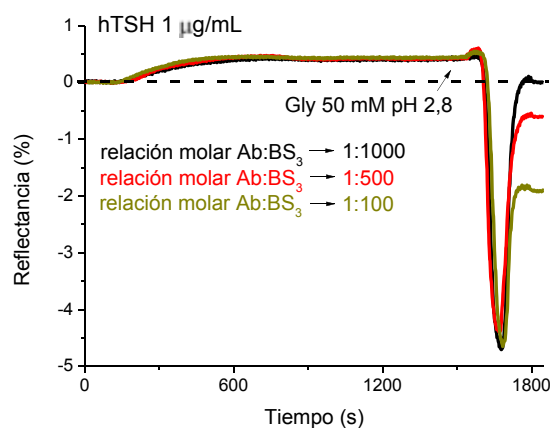


Figura 4.12. El sensorgrama muestra la regeneración de las superficies de mAc hTSH-2 obtenidas variando la concentración de BS^3 , tras la unión de la hTSH.

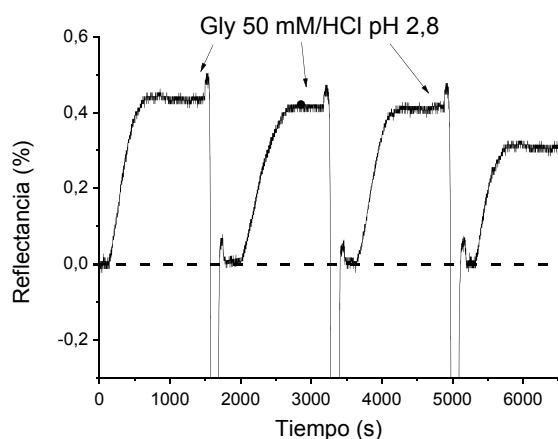


Figura 4.13. Sensorgrama obtenido realizando cuatro medidas de detección de $1 \mu\text{g/mL}$ de hTSH con la misma superficie de mAc hTSH-2.

4.6.3. Inmunoensayo directo para determinación de hTSH

Una vez desarrollado el método de inmovilización del mAc hTSH-2 mediante proteína G, se evaluó la eficiencia del mismo mediante la detección de distintas concentraciones de hTSH en PBST. Teniendo en cuenta que la señal de detección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH en PBST obtenida fue considerablemente inferior a la obtenida cuando el anticuerpo se inmovilizó mediante el método basado en el sistema biotina/estreptavidina, y que con este se alcanzó un LOD en el inmunoensayo directo de 12 ng/mL, en esta ocasión no se ensayaron concentraciones por debajo de 50 ng/mL.

De acuerdo con las condiciones optimizadas en el apartado 4.5.1, para la preparación de la superficie de mAc hTSH-2 se funcionalizó la superficie sensora con una SAM de fracción molar MHDA igual a 0,05, y sobre esta se inmovilizó covalentemente la proteína G en PBS pH 7,4. Posteriormente el anticuerpo se acopló a la superficie utilizando este mismo buffer para su unión a la proteína G. Finalmente para aumentar la estabilidad de esta unión se llevó a cabo una reacción de entrecruzamiento utilizando el *crosslinker* en un exceso molar respecto al anticuerpo de 1000. En el sensorgrama de la Figura 4.14.a se muestra la respuesta del sensor para la detección de la hTSH en un rango de concentración entre 0,05 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$. Cada medida se realizó por triplicado utilizando la misma superficie receptora que se regeneró después de cada determinación mediante la inyección de una solución de Gly pH 2,8. Para evaluar el efecto de la utilización de distintas superficies sobre la reproducibilidad del inmunoensayo este se realizó en tres chips distintos. La curva de calibrado calculada a partir de los resultados obtenidos con un mismo chip sensor, y las correspondientes características analíticas se muestran en la Figura 4.14.b.

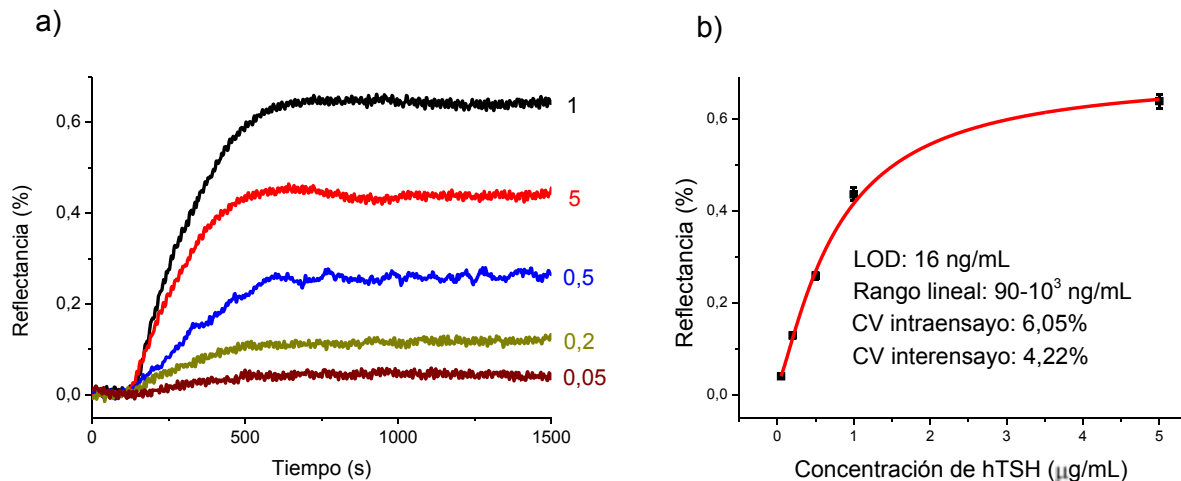


Figura 4.14. Inmunoensayo para la detección de hTSH utilizando el método de la proteína G para la inmovilización del mAc hTSH-2.

Como se puede observar el LOD del inmunoensayo (16 ng/mL) se encuentra por encima del nivel de corte establecido para el diagnóstico de HC. La estrategia utilizada para aumentar la sensibilidad del inmunosensor preparado mediante el uso de sistema biotina-estreptavidina no podría llevarse a cabo en este caso, puesto que existe la posibilidad de que el segundo anticuerpo utilizado en el formato de ensayo tipo sándwich se una a la monocapa de proteína G, lo que podría resultar en falsos positivos en cualquier análisis. Sin embargo, aunque el inmunosensor no presente sensibilidad suficiente para ser de utilidad en el diagnóstico del HC, la excelente reproducibilidad del ensayo, con coeficientes de variación tan bajos como 4,11% y 2,76%, utilizando tanto el mismo, como distintos chips, respectivamente, demuestra la alta fiabilidad del método utilizado que podría ser extrapolado a otros biosensores ópticos de mayor sensibilidad.

4.7. Conclusiones

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un inmunosensor SPR con aplicación en el diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito Neonatal, utilizando dos métodos distintos para la funcionalización de la superficie sensora con el anticuerpo mAc hTSH-2. Estos métodos se han basado en el uso del sistema biotina-estreptavidina o de la

proteína G para la inmovilización del mismo. Tras la optimización de las condiciones de trabajo con cada uno de ellos, se han desarrollado dos protocolos para la formación de la superficie receptora con los anticuerpos anti-hTSH. Para evaluar la eficiencia en cada caso se ha llevado a cabo un inmunoensayo para la detección de hTSH en PBST.

A diferencia de la gran estabilidad de la unión del anticuerpo a la superficie que proporciona el método de inmovilización basado en el sistema biotina/estreptavidina, que como se comprobó en el trabajo con la hGH no resulta afectada por el proceso de regeneración de la superficie, en el caso de la inmovilización del anticuerpo a través de la proteína G, fue necesario completar el protocolo desarrollado para aportar suficiente estabilidad a la unión del mAc hTSH-2 a la superficie frente al uso de condiciones para la regeneración de la misma. Una vez modificado, el método de inmovilización del anticuerpo vía proteína G permitió la reutilización de la superficie de hTSH hasta tres veces sin afectar la funcionalidad de la misma.

La reproducibilidad del ensayo es excelente utilizando cualquiera de los dos protocolos desarrollados, lo que significa que con ambas estrategias se logra una de las metas fundamentales en la elaboración de un inmunosensor, la fiabilidad del mismo. La sensibilidad del inmunoensayo es algo mayor cuando se utiliza el método de inmovilización del anticuerpo basado en el sistema biotina-estreptavidina, aunque al igual que en el caso en que este se inmoviliza mediante el método de la proteína G, el límite de detección alcanzado es superior al nivel de corte establecido para el diagnóstico de HC en neonatos (1,37 ng/mL). Para aumentar la sensibilidad del inmunosensor se empleó un segundo anticuerpo en un ensayo tipo sándwich. Puesto que en el caso en que la superficie se funcionaliza utilizando el protocolo basado en la proteína G, el uso de un segundo anticuerpo está limitado por la respuesta inespecífica que puede causar la unión del mismo tanto a la hormona como a la proteína G que presente dominios de unión libres, el ensayo sándwich solo se llevó a cabo en el inmunosensor en el que el anticuerpo se inmovilizó utilizando la estrategia basada en el sistema biotina-estreptavidina. Al amplificar la señal de detección de la hTSH el inmunosensor permite detectar la hormona a niveles de concentración tan bajos como 0,5 ng/mL en PBST y 1,2 ng/mL en suero, por lo que este demostró su utilidad en el diagnóstico de confirmación

de HC, e incluso en el test de screening siempre que la preparación de las muestras a partir de los discos de papel impregnados con la sangre del recién nacido, no resultara en una pérdida de la hTSH originalmente presente en la muestra.

4.8. Referencias

- 1 Pierce J.G. and Parsons T.F., *Glycoprotein Hormones: Structure and Function*. Annual Review of Biochemistry, 1981. **50**(1):465-495.
- 2 Szkudlinski M.W., Fremont V., Ronin C. and Weintraub B.D., *Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships*. Physiol. Rev., 2002. **82**(2):473-502.
- 3 Haarburger D., *Thyroid disease: thyroid function tests and interpretation*. Continuing Medical Education, 2012. **30**(7).
- 4 Rastogi M.V. and LaFranchi S.H., *Congenital hypothyroidism*. Journal of Rare Diseases, 2010. **5**(17):1-22.
- 5 Shim M.L., *Case Based Pediatrics For Medical Students and Residents Department of Pediatrics*. Thyroid Disorders, 2002. Chapter XV.2.
- 6 Jameson J.L. and De Groot L.J., *Endocrinology*. 6th Edition Adult and Pediatric, Expert Consult Premium Edition - Enhanced Online Features and Print. Vol. 2.
- 7 Ludueña M.P., Mazzi Gonzales de Prada E. y Sandi K.P., *Hipotiroidismo congénito: a propósito de un caso*. Rec. Sol. Bol. Ped., 2002. **41**(1):11-14.
- 8 Najafi M., Farsi M.M. and Sabahi M.J., *Primary blood TSH/back up TSH measurements: an improved approach for neonatal thyroid screening*. Clin. Lab. Anal., 2011. **25**(1):61-3.
- 9 LaFranchi S.H., *Newborn screening strategies for congenital hypothyroidism: an update*. J. Inherit Metab. Dis., 2010. **33**(2):S225-33.
- 10 Oyarzábal M., Chueca M., Elso J. and Sola A., *Neonatal screening of congenital Hypothyroidism: result of the Navarra program*. An. Sist. Sanit. Navar., 1998. **21**(3):331-9.
- 11 Mayayo E., Ferrández Longás A. y Labarta J.I., *Interpretación de las pruebas tiroideas*. Anales Españoles de Pediatría, 2002. **56**(4):42-52.
- 12 Dufour D.R., *Laboratory tests of thyroid function: uses and limitations*. Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 2007. **36**(3):579-94.
- 13 Bronner V., Tabul M. and Bravman T., *Rapid Screening and Selection of Optimal Antibody Capturing Agents Using the ProteOn PR36 Protein Interaction Array System*. Technical Note 5820. Bio-Rad Laboratories, Inc., 2009.

14 Delves P., Martin S., Burton D. and Roitt I., *Roitt's Essential Immunology*. Ed. Blackwell publishing, 2006.

5. Inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR mediante el uso de la proteína de fusión *proteína A-dominio de unión al oro (PAG)* y su aplicación en la detección de hGH

5.1. Introducción

5.1.1. Descripción de la proteína de fusión PAG

Recientemente la ingeniería genética ha dado lugar a la generación de péptidos de pequeño tamaño (secuencias desde 7 aminoácidos) con afinidad de unión específica por distintos materiales inorgánicos, que han resultado de gran interés en el campo de la (nano)biotecnología. La selección de péptidos de unión específica y selectiva para un determinado material ha sido posible mediante el uso de técnicas de presentación en bacteriófagos y superficie celular bacteriana (phage display y cell-surface display) que han sido adaptadas para este propósito. En estas técnicas, bacterias y fagos modificados genéticamente, expresan en su superficie péptidos que han sido generados al azar. Estos

son expuestos ante superficies de distinto material de forma que en función de la afinidad que presenten los péptidos por estos materiales, las bacterias y fagos se adhieren a la “superficie diana”. Posteriormente los distintos péptidos son aislados y analizados. De esta forma se han obtenido secuencias peptídicas con afinidad de unión a un gran número de materiales, como los semiconductores (GaAs, ZnS, Cu₂O y ZnO), metales nobles (Au, Ag, Pd y Pt), óxidos metálicos (SiO₂, ZnO y zeolitas) o cristales iónicos (CaCO₃, Cr₂O₃ y Fe₂O₃). Además de la afinidad por superficies inorgánicas la capacidad de auto y co-ensamblarse en nanoestructuras ordenadas, propia de las moléculas biológicas, es otra propiedad de estos péptidos explotada por la (nano)biotecnología, donde el uso de los mismos ha encontrado importantes aplicaciones en el campo de la medicina. Como ejemplo, en medicina regenerativa, el desarrollo de tejidos mixtos entre moléculas biológicas y materiales inorgánicos nanoestructurados está resultando muy útil para la construcción de prótesis e implantes con mínimos problemas de rechazo. También se han desarrollado nanofibras artificiales de péptidos, de 7 nm de diámetro, capaces de autoensamblarse y solidificar la solución en la que estaban disueltos, lo que permite reconstruir tejidos humanos. El uso de péptidos afines a material inorgánico en la síntesis de nanopartículas también ha beneficiado a otras dos ramas de la nanomedicina, como son el diagnóstico y la liberación controlada de fármacos. Otra aplicación interesante propuesta originalmente por Brown [1], se basa en el uso de péptidos de unión a metales como *linkers* moleculares para la fabricación de dispositivos biosensores, de gran importancia para el diagnóstico clínico.

Brown (Dpto. Biología, Univ. de Copenhague), pionero en el aislamiento y utilización de péptidos de unión a superficies inorgánicas, descubrió un polipéptido con alta afinidad de unión al oro, constituido por la secuencia aminoacídica MHGKTQATSGTIQS repetida tres veces (3R-GBP1). Este investigador sugirió que la inmovilización de proteínas fusionadas con péptidos de unión a metales, podría controlar la orientación de estas sobre superficies sensoras, de una forma más fácil y menos laboriosa que los métodos utilizados convencionalmente. Otros investigadores [2, 3] que han trabajado en la caracterización de péptidos de unión al oro (GBP), también han demostrado la alta afinidad del 3R-GBP1 por este metal. Curiosamente, ninguna de las

secuencias GBP contiene cisteína, de la que se conoce su propiedad de formar enlaces del tipo oro-tiol a través de su grupo $-SH$, conocido por el fuerte enlace que establece con el oro, y que permite la formación de monocapas auto-ensambladas (SAM), utilizadas frecuentemente en la fabricación de biosensores. Sin embargo la cinética de adsorción del polipéptido 3R-GBP1 sigue el mismo modelo que los alcanotioles (Langmuir), y sus parámetros cinéticos, $K_{eq} = 10^7 M^{-1}$ y $\Delta G = -8 Kcal/mol$, son similares a los de estos, cuya energía de adsorción se sitúa en el rango de -5 a $-10 Kcal/mol$. La naturaleza de la unión del GBP al oro es diferente a la que se establece entre el grupo tiol y el metal, y ofrece un nuevo campo para la interacción proteína-superficie de oro. Los mecanismos de reconocimiento responsables de esta alta afinidad no han sido aún estudiados en detalle, y no está claro como el polipéptido en su conformación desplegada dirige los procesos de reconocimiento e interacción con el oro, o que característica molecular permitiría el comportamiento auto-asociativo. En la Figura 5.1 se muestran imágenes de microscopio de fuerzas atómicas (AFM) y resultados de simulaciones moleculares, que han permitido al grupo de Sarikaya [2, 4-7] obtener información acerca de la disposición del 3R-GBP 1 sobre la superficie de Au, como su orientación geométrica y el grosor de la monocapa que forma sobre la superficie.

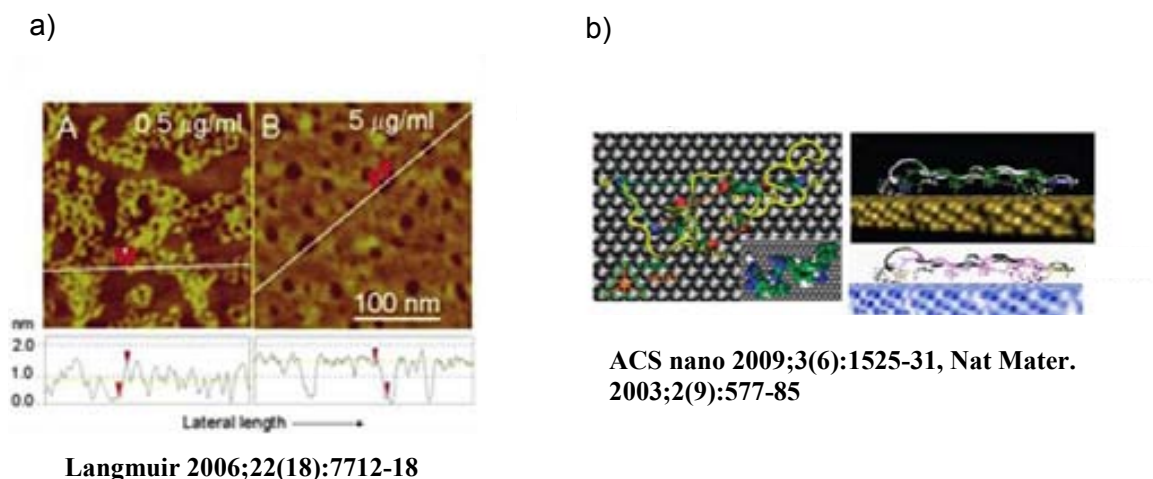


Figura 5.1. Adsorción del 3R-GBP1 sobre el oro. A) Imagen de AFM y (b) modelo de simulación de la orientación geométrica que adopta el péptido.

Insertar la secuencia 3R-GBP en una proteína permite la inmovilización sitio-específica de la misma sobre una superficie de oro, lo que convierte al péptido en una

herramienta de gran utilidad para llevar a cabo la inmovilización orientada de proteínas sobre superficies sensoras, tal y como se había sugerido en la literatura. A pesar de las posibilidades que ofrece esta molécula para dirigir la inmovilización de proteínas, y, como se ha explicado anteriormente, la importancia de conseguir una orientación adecuada de las mismas para un óptimo rendimiento del biosensor, y el reto que esto supone en la funcionalización de superficies sensoras, son escasos los estudios encontrados en la bibliografía al respecto.

En este trabajo se ha desarrollado un método de inmovilización de anticuerpos para la fabricación de inmunosensores SPR, basado en el uso de una proteína de fusión con la secuencia 3R-GBP1 como un sistema molecular capaz de autoensamblarse sobre la superficie de oro y de unir de forma específica anticuerpos en su forma nativa, a través de la región Fc de los mismos. Esta proteína, diseñada y producida por el grupo del Dr. Antonio Caruz (Inmunogenética) de la Univ. de Jaen, y a la que se denominó PAG (Protein A-Gold binding domain), consiste en una fusión del péptido de unión al oro con dos dominios de unión a anticuerpos de la proteína A de origen microbiano. Al contener la misma molécula, las funciones de unión a la región Fc de anticuerpos y de unión al oro, el PAG ofrece una manera novedosa y elegante de inmovilizar anticuerpos de forma orientada sobre la superficie sensora de dispositivos SPR (Figura 5.2).

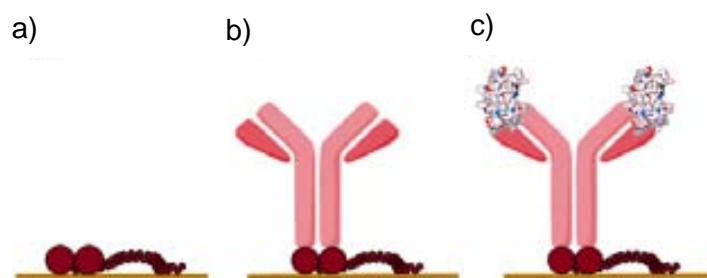


Figura 5.2. Representación del inmunoensayo directo mediante el uso del PAG. A) Autoensamblaje del PAG sobre la superficie de oro. B) Acoplamiento del anticuerpo al PAG. C) Unión del analito al anticuerpo inmovilizado.

Puesto que la simple inmovilización del PAG es el único paso previo al acoplamiento del anticuerpo, con este método se prescinde tanto del uso de anticuerpos modificados química o genéticamente, como de cualquier reactivo o molécula necesaria en los métodos utilizados convencionalmente, como los mostrados en el Capítulo anterior. Esta proteína de fusión, con un peso molecular de 19769.7 g/mol y un punto isoeléctrico (pI) teórico de 6.33, está constituida por una única cadena de 181 aminoácidos con la siguiente secuencia aminoacídica: DPKTAALAQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQS ANLLAEAKKLNDAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDD PSQSANLLAEAKKLNGAQAPKVDANSAGKSTMHGKTQATSGTIQSMHGKTQAT SGTIQSMHGKTQATSGTIQS.

Como se observa, uno de los extremos de la secuencia está formado por un fragmento de 14 aminoácidos tres veces repetido (resaltado en distintos colores), el cual corresponde al dominio de unión al oro. El tamaño molecular del 3R-GBP calculado es de 4,3 kDa, y la molécula adsorbida sobre una superficie el oro (en un rango de concentración entre 0,5 y 5 µg/mL) forma monocapas de 1 nm de grosor [7]. Si el dominio GBP forma esta fina capa sobre la superficie de oro, los dominios de unión a anticuerpo del PAG deben situarse prácticamente “adheridos” a la misma, minimizando la distancia entre la interacción Ag-Ac y la superficie sensora, lo que potencia la sensibilidad del inmunoensayo debido al propio principio físico por el que opera el SPR, en el que campo evanescente es mas intenso a medida que se acerca a la superficie transductora.

5.1.2. Diagnóstico de enfermedades relacionadas con la alteración de la secreción de hGH

La determinación de los niveles de hGH en suero es indispensable tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del tratamiento de trastornos relacionados con una secreción anormal de la hormona, que pueden llegar a ser muy graves dependiendo de la etapa de la vida del individuo en la que esta tenga lugar. Debido a su papel protagonista en el crecimiento y desarrollo del individuo, la deficiencia en la secreción de la hormona

se manifiesta de forma más importante en niños, donde se produce una alteración de la tasa de crecimiento. La deficiencia de hGH en niños presenta una incidencia de 1 entre 5000 individuos y está asociada a defectos congénitos o adquiridos de la secreción o acción de la hormona. Las formas adquiridas presentan a menudo otros déficits asociados. Las causas de la deficiencia de hGH, en la mayoría de los casos son de naturaleza idiopática (no definida). Los niños presentan una estatura y velocidad de crecimiento considerablemente inferior a la que les corresponde [8]. Si la deficiencia de la hormona se descubre a tiempo los efectos derivados de la misma pueden revertirse mediante la administración de hGH sintética (hGHR) [9]. Los niños con una deficiencia severa de hGH sin tratar pueden perder un 30 % de la estatura que potencialmente tendrían. Además presentan debilidad muscular, densidad ósea reducida y características fenotípicas particulares que incluye rasgos faciales característicos con frente amplia y abombada y raíz nasal hundida. A nivel metabólico se manifiesta con un aumento de niveles de proteína de alta densidad (LDL) [10]. En adultos la deficiencia de hGH es extremadamente rara y son casos en el que el individuo fue diagnosticado en la adolescencia o en la infancia, o bien se deben a una extirpación quirúrgica de la glándula pituitaria como consecuencia del tratamiento de un tumor en la misma. En adultos, el déficit de hGH cursa con dislipemia (alteración del metabolismo de los lípidos) y aumento de riesgo cardiovascular, además aumenta la masa grasa y disminuye la masa magra corporal, aunque no presenta síntomas fisiológicos visibles y sólo puede ponerse de manifiesto por análisis de sus niveles en sangre.

Por otro lado la hipersecreción crónica de hGH, producida generalmente por tumores pituitarios benignos, causa una enfermedad debilitante asociada a un crecimiento exagerado de los huesos y partes blandas. Si el exceso en la secreción de hGH comienza antes del periodo de pubertad, cuando aún no ha finalizado el crecimiento óseo del niño, da lugar a gigantismo, que se caracteriza por un crecimiento lineal corporal excesivo. Si empieza una vez se hayan soldado las epífisis de los huesos, el individuo padece acromegalia que se caracteriza por un crecimiento local, especialmente de cráneo y huesos de la cara y cursa con miopatía, neuropatía periférica, diabetes mellitus y enfermedad cardíaca. Ambas enfermedades son muy poco frecuentes (1 caso

por 1.000.000 [11]) y aunque son irreversibles, la cirugía para extirpar el tumor hipofisario puede corregir la secreción anormal de la hormona.

Como se comentó en el apartado 3.1.2, los niveles de concentración de hGH en orina son mucho menores que en sangre, lo que junto con la variabilidad que el proceso de excreción de orina experimenta entre distintos días, han propiciado que la sangre sea el tipo de muestra escogida para el diagnóstico de desórdenes de los niveles de hGH. En los últimos 30 años ha habido muchos cambios en los métodos de determinación de la concentración de hGH circulante. Los radioinmunoanálisis (RIA) utilizados inicialmente con anticuerpos policlonales, fueron seguidos por métodos inmunorradiométricos con anticuerpos monoclonales. En la actualidad éstos han sido sustituidos por inmunoanálisis no isotópicos, basados en reacciones enzimáticas, de fluorescencia o quimioluminiscencia, para la detección de la hormona [12, 13]. En los análisis de rutina es muy frecuente el uso de sistemas autoanalizadores (más propios de grandes laboratorios), que en su mayoría realizan ensayos quimioluminiscentes. La sensibilidad de estos métodos normalmente permite detectar niveles de hGH de 0,2 ng/mL o incluso menores [14].

Dada la naturaleza heterogénea de la hGH existe una gran disparidad entre los resultados obtenidos en diferentes ensayos, lo que complica el diagnóstico de desórdenes de la hormona. Además, debido a la gran variedad de anticuerpos utilizados existen numerosos kits comerciales de los que no se conoce que isoformas se reconoce exactamente. El diseño del inmunoensayo y los calibradores utilizados son también una fuente de variabilidad considerable en la medida de la hGH [13]. Aunque la falta de consenso en muchos aspectos metodológicos hace que el diagnóstico de desórdenes de la hormona sea un tema controvertido, sin embargo existe consenso sobre la necesidad de una prueba de estímulo en lugar de la determinación basal de los niveles la misma, debido a la amplia fluctuación a la que estos están sujetos.

Puesto que no existe ninguna prueba bioquímica definitiva para el diagnóstico del déficit o exceso de hGH, los test dinámicos para la medida de niveles de hGH sérica deben acompañarse de la medida de los niveles de IGF-I, que se ha demostrado que es la herramienta más útil en la confirmación diagnóstica. Para el diagnóstico de la deficiencia en la secreción de la hGH la prueba de estímulo más utilizada es el test de tolerancia a la

insulina. En los casos donde no es posible realizar la prueba con insulina, se utiliza glucagón o clonidina para la estimulación de la liberación de la hormona. Estas pruebas pueden indicar que existe deficiencia de hGH en niños cuando los niveles detectados son inferiores a 10 ng/ml. Se considera déficit parcial si la respuesta está entre 5-10 ng/mL y total si es inferior a 5 ng/mL. Para el diagnóstico de deficiencia de hGH en adultos el nivel de corte está establecido en 3 ng/mL. En el caso de gigantismo o acromegalia los criterios diagnósticos son la presencia de unos niveles de hGH, a las dos horas de una sobrecarga oral con glucosa, mayores de 10^3 ng/mL. Considerando el sexo y edad del paciente, los niveles elevados o disminuidos de IGF-1 confirman el diagnóstico de un exceso o un déficit de hGH, respectivamente [12].

5.2. Evaluación de la funcionalidad del PAG mediante ELISA

Para evaluar la funcionalidad del PAG, se llevó a cabo un ensayo ELISA previamente a su uso en el biosensor SPR. Se realizó un inmunoensayo no competitivo de tipo sándwich para la detección de la hormona de crecimiento humana (hGH) utilizando el mAc hGH-25 como anticuerpo (Ac) de captura y el mAc hGH-12 biotinilado como Ac detector. La biotinylación del mAc hGH-12 se llevó a cabo con el reactivo sulfo-NHS-LC-biotina siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el apartado 3.3.1, utilizando la relación molar Ac:biotina 1:50, optimizada previamente en el desarrollo del inmunosensor para la determinación de las isoformas de la hGH (apartado 3.4.3). El objetivo fue comparar el resultado entre la adsorción del mAc hGH-25 a la superficie de la placa y su unión a la misma mediante el acoplamiento al PAG o la proteína A nativa, previamente adsorbidas sobre esta. Para ello, se tapizó una placa de poliestireno mediante la adición de 1 µg/mL de mAc hGH-25, 1 y 30 µg/mL de PAG, y 1 µg/mL de proteína A, todas las muestras preparadas en tampón bicarbonato 0,1 M pH 9. En el siguiente paso se adicionó 1 µg/mL de mAc hGH-25 en los pocillos de PAG y proteína A, que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se prepararon 4 muestras de hGH de 5, 1, 0,5 y 0,1 µg/mL, mediante dilución seriada a partir de una solución madre en PBS con 0,05% de Tween 20 y 0,5% de BSA, y se

añadieron a la placa, excluyendo los pocillos elegidos como control negativo. En la siguiente etapa se cargó en todos los pocillos la solución del mAc hGH-12 biotinilado, en una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, y finalmente se añadió una dilución 1/30000 de avidina-HRP en PBS con 0,5% de BSA para el revelado del ELISA. La actividad de la peroxidasa unida a los pocillos de la placa en este último paso se detectó mediante la adición de una solución de TMB, adquirida comercialmente, que contiene el sustrato de la HRP. La reacción enzimática se paró mediante la adición de una solución de H_2SO_4 3 N, cuando los pocillos que más reaccionaron adquirieron un color relativamente intenso, determinándose la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro. El tiempo de incubación fue de 30 minutos en todas las etapas, que se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto el tapizado de la placa que se realizó durante toda la noche a 4°C, y la incubación del mAc hGH-25 sobre la superficie tapizada con PAG o proteína A, que se realizó durante 1 hora. Después de cada etapa se realizaron 3 lavados sucesivos de la placa con la solución de PBS con 0,05% de Tween 20 y 0,5% de BSA. El volumen de muestra cargado en la placa fue de 100 μL en todos los casos.

5.3. Desarrollo de un método de inmovilización basado en el uso del PAG

El inmunoensayo basado en la inmovilización del anticuerpo mediante el uso del PAG se llevó a cabo en tres etapas secuenciales representadas en el esquema de la Figura 5.2. Primero el PAG se inmovilizó mediante el auto-ensamblaje de su dominio de unión al oro sobre la superficie sensora, inmediatamente después de ser limpiada. La segunda etapa consistió en el acoplamiento del anticuerpo a la superficie, en un único paso, mediante la unión de su región Fc a los dominios de unión a anticuerpo del PAG, los cuales quedan libres tras la inmovilización del mismo. Finalmente se llevó a cabo la detección directa del analito.

Para el desarrollo del método de inmovilización del anticuerpo se optimizaron diversos parámetros, llevando a cabo la inmovilización del PAG tanto en flujo como ex-situ (fuera del sensor). En este último caso se depositó una gota (150 μL) de una solución de PAG sobre la superficie de oro y el chip se mantuvo a temperatura ambiente durante varias horas hasta que se lavó con el buffer de inmovilización seguido de un lavado con agua, y secado bajo flujo de N_2 . Se estudió el efecto del tiempo de inmovilización

ensayando tres periodos de incubación distintos, de 30 minutos, puesto que minimizar el tiempo empleado en el método fue uno de los objetivos principales, y de 4 horas y una noche, basándonos en los tiempos utilizados habitualmente en los ensayos tipo ELISA para cubrir la superficie con un anticuerpo. Tanto en la estrategia ex-situ como en flujo, se estudió la influencia del pH en la inmovilización del PAG sobre la sensibilidad del inmunoensayo. Para ello el PAG fue inmovilizado a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en dos buffers acetato 10 mM de pH 4.5 y 5.5, y en PBS pH 7.4. Seguidamente se inyectó una solución de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo en PBS pH 7,4 sobre la superficie donde se había inmovilizado el PAG. La eficiencia de las distintas funcionalizaciones obtenidas se evaluó mediante la inyección de una solución de hGH a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST pH 7,4. Una vez seleccionado el buffer de inmovilización del PAG, se llevó a cabo la optimización de las concentraciones de PAG y anticuerpo, respectivamente, para lo que se ensayaron los intervalos 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en el primer y segundo caso, respectivamente, y utilizando siempre PBS pH 7,4 en la preparación de la disolución de anticuerpo. La eficiencia de las biofuncionalizaciones obtenidas se evaluaron, al igual que en la optimización del pH de inmovilización del PAG, mediante la inyección de la solución de hGH a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST pH 7,4.

Para la inmovilización en flujo del PAG se estableció un flujo continuo de agua mientras que para el acoplamiento del anticuerpo y detección de la hormona se mantuvo en flujo el mismo buffer utilizado para la preparación de las muestras.

La inmovilización del anticuerpo mediante la estrategia del PAG se comparó con métodos habitualmente empleados para la inmovilización de anticuerpos, como son el método mediante enlace covalente y mediante proteína A. Para ello el anticuerpo fue inmovilizado por unión covalente a la superficie previamente modificada mediante la técnica de monocapas autoensambladas (SAM), y por acoplamiento a la superficie previamente modificada con proteína A, la cual se preparó también mediante inmovilización covalente.

En primer lugar se funcionalizaron dos superficies sensoras con una SAM mixta compuesta por MHDA y MOUH en una concentración de 5 μM y 245 μM , respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4. La

inmovilización covalente de la proteína A y el anticuerpo (sobre superficies independientes) se realizó como se describió también en dicho apartado, de manera que tras la activación de la SAM de la superficie se inyectaron las soluciones de proteína A y el anticuerpo a una concentración de 50 µg/mL, para su acoplamiento a la monocapa a través de sus grupos amino. Después se inyectó una solución de HCl 0,1 M para eliminar cualquier unión no específica, tras lo que se realizó un paso de bloqueo, con etanolamina 1M a pH 8.5, de los posibles grupos de la SAM sin reaccionar que permanecieran activados. La inmovilización de la proteína A se ensayó en los buffers acetato pH 4,5 y PBS pH 7,4, y la unión covalente del anticuerpo se realizó en PBS pH 7,4. El acoplamiento del anticuerpo a la superficie modificada con proteína A se realizó en PBS pH 7,4, a 50 µg/mL, utilizando un flujo continuo del mismo buffer. Finalmente se cambió a un flujo continuo de PBST pH 7,4 y se inyectó una solución de 1 µg/mL de hGH en este buffer para evaluar la eficiencia de los dos métodos empleados en la inmovilización del mAc hGH-12.

5.4. Eficiencia del PAG en un inmunoensayo ELISA

Los valores de absorbancia que se obtuvieron en el ELISA se muestran en la Tabla 4.1. Estos valores fueron mucho mayores en los pocillos tapizados con prot A y PAG, que en aquellos donde el anticuerpo anti-hGH-25 se absorbió directamente sobre la placa. Como se puede observar en el ensayo realizado adsorbiendo el anticuerpo directamente sobre la placa, todos los valores de absorbancia obtenidos quedaron dentro del intervalo de adsorbancia en el que esta se relaciona linealmente con la concentración de hGH (0,2-0,8), excepto en la detección de la concentración más alta. Sin embargo en el ensayo realizado cubriendo la placa con la proteína A o el PAG, todas las concentraciones de hormona utilizadas dieron lugar a valores de absorbancia superiores a este intervalo, lo que significa que la unión de la hGH al mAc hGH-25 fue mucho mayor cuando el anticuerpo se unió a la superficie mediante estas proteínas. Así pues, el resultado del ELISA indica que el uso del PAG, al igual que la proteína A, para la inmovilización del anticuerpo, mejora considerablemente la sensibilidad del inmunoensayo. Además estos resultados sugieren que la capacidad de unión a

anticuerpos del PAG es equiparable a la de la proteína A, a pesar de que la diferencia en el número de dominios de unión presentes en ambas proteínas, dota a la proteína A de mayor potencial de unión a anticuerpos. De esta manera se confirmó la eficiencia del PAG en la inmovilización orientada de anticuerpos.

Tabla 5.1. Evaluación de la eficiencia del PAG para la inmovilización orientada de anticuerpos mediante el método ELISA.

hGH ($\mu\text{g/mL}$)	PAG 30 $\mu\text{g/mL}$ (D.O.)	PAG 1 $\mu\text{g/mL}$ (D.O.)	hGH 25 1 $\mu\text{g/mL}$ (D.O.)	prot A 1 $\mu\text{g/mL}$ (D.O.)
0	0,051	0,049	0,046	0,052
5	2,6851	2,6632	1,7745	2,7215
1	2,4871	2,2383	0,7899	2,3315
0,5	2,366	2,1974	0,5659	2,1687
0,1	2,3858	2,0482	0,4053	2,0464
0,05	1,8998	1,8256	0,1091	1,7186

5.5. Optimización del método de inmovilización con el sistema modelo BSA/anti-BSA

Una vez comprobada la funcionalidad del PAG, se procedió al desarrollo de un protocolo de inmovilización de anticuerpos basado en el uso de esta proteína, para el desarrollo de inmunoensayos directos en biosensores SPR. En un principio se escogió el par antígeno/anticuerpo BSA/anti-BSA como sistema modelo con la finalidad de abaratar costes, y todos los pasos del inmunoensayo se realizaron en flujo, para reducir el tiempo empleado en los experimentos. Los resultados se evaluaron en función del nivel de señal de acoplamiento de anticuerpo que condujo a la mayor sensibilidad del inmunoensayo.

En experimentos preliminares se comprobó que la inmovilización de la proteína no resulta afectada por la fuerza iónica hasta alcanzar un valor de 150 mM, a partir del cual el aumento de la misma disminuye el nivel de inmovilización del PAG. Por este motivo el primer parámetro a optimizar fue el pH del buffer de inmovilización de la proteína, dentro del intervalo de fuerza iónica que no limita el ensamblaje de la misma.

Se eligieron dos pH alejados aproximadamente una unidad del valor de pI del PAG, pH 7,4 y 5,5, y un valor de pH de 4,5, considerablemente inferior a su pI, dotando al mismo de carga negativa en el primer caso, y positiva en el segundo y tercer caso. El resultado del inmunoensayo realizado variando el pH del buffer de inmovilización se muestra en la Figura 4.3. La mayor respuesta SPR en el ensamblaje del PAG se observó con el buffer de inmovilización de pH 4,5. El uso de los otros buffers, especialmente el de pH 7,4, redujo considerablemente la señal de inmovilización del PAG (Figura 5.3.a). La posterior unión del mAc anti-BSA a las distintas superficies de PAG siguió la misma tendencia que la inmovilización de este, observándose mayor acoplamiento del mAc anti-BSA a la superficie de PAG preparada con acetato pH 4,5, mientras que la menor señal se obtuvo cuando el PAG había sido inmovilizado a pH 7,4. Así mismo, el mayor nivel de detección de BSA se obtuvo con la superficie en la que el PAG se inmovilizó a pH 4,5 seguida de la obtenida con el buffer de pH 5,5 y por último la obtenida a pH 7,4.

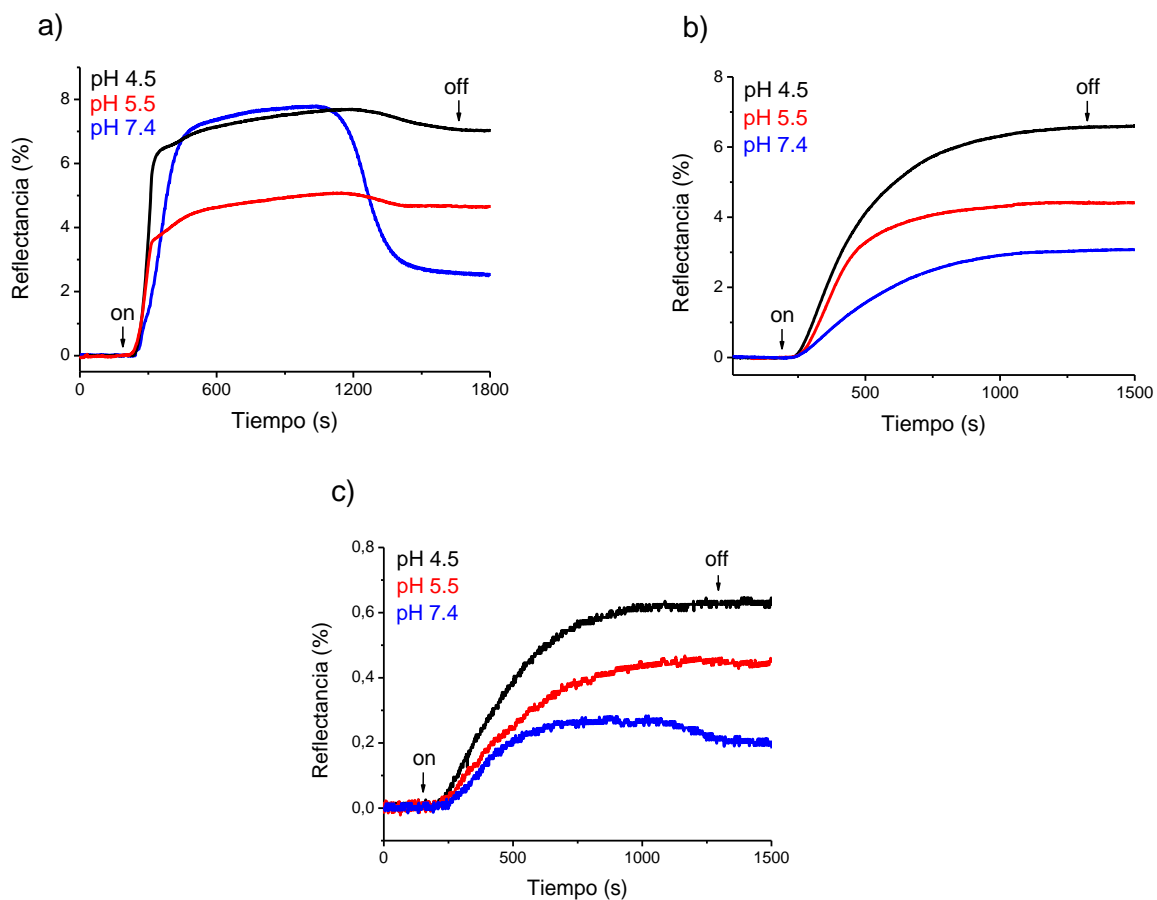


Figura 5.3. Influencia del pH de inmovilización del PAG en el rendimiento del inmunoensayo para la detección de BSA: A) Inmovilización del PAG, (b) acoplamiento del mAc anti-BSA y (c)

unión del BSA.

Aunque el mecanismo por el que la secuencia GBP se une al oro no se conoce con exactitud, los resultados sugieren que hay una conformación del PAG que maximiza esta unión y que está favorecida a pH 4,5. Además hay una fuerte correlación entre la respuesta SPR a la inmovilización del PAG y las señales obtenidas en las subsiguientes uniones del mAc anti-BSA (Figura 5.3.b) y el BSA (Figura 5.3.c). La drástica reducción del rendimiento del inmunoensayo cuando el PAG es inmovilizado a pH 7,4, podría tener dos explicaciones. Por un lado, los resultados sugieren que a este pH el PAG pierde la conformación estructural que aumenta su afinidad a la superficie de oro. Por otro lado, también podría deberse a una baja atracción del PAG por la superficie cuando este adquiere carga positiva. Puesto que los resultados obtenidos indican que la mayor sensibilidad en la detección de BSA se consiguió con el buffer acetato pH 4,5, este fue seleccionado como el buffer óptimo para la inmovilización del PAG.

Las siguientes condiciones del inmunoensayo que se optimizaron fueron las concentraciones del PAG y del mAc anti-BSA. Para ello el PAG se inmovilizó a las concentraciones de 1, 5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y para el acoplamiento del mAc anti-BSA se utilizaron soluciones de 5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo en PBS pH 7,4. La figura 5.4.a muestra la respuesta SPR en la inmovilización del PAG. Como se esperaba, la disminución de la concentración del PAG de 50 a 1 $\mu\text{g/mL}$ resultó en una considerable reducción de la señal de inmovilización, aunque de 50 a 20 $\mu\text{g/mL}$ el cambio no fue tan significativo, lo que indica que a 20 $\mu\text{g/mL}$ tiene lugar la saturación de la superficie por la molécula del PAG. De forma similar ocurrió con la variación de la concentración de mAc anti-BSA, de manera que el uso de 50 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo dio lugar a señales de acoplamiento al PAG muy parecidas, mientras que la menor concentración ensayada, 5 $\mu\text{g/mL}$, resultó en una señal mucho menor (Figura 5.4.b). Esta falta de respuesta del SPR al aumento de la concentración de anti-BSA por encima de 20 $\mu\text{g/mL}$ indica que esta es la concentración saturante del mismo, en la que todos los posibles sitios de unión a la superficie de PAG quedan ocupados por el anticuerpo.

La Figura 5.4.c muestra las señales obtenidas en la detección de BSA. Los valores medios de estas señales y correspondientes desviaciones estándar, ordenados en función a la concentración creciente de PAG fueron: $0,025 \pm 0,0031$, $0,14 \pm 0,0108$, $0,157 \pm 0,0207$ y $0,152 \pm 0,0149$ cuando el mAc anti-BSA fue inmovilizado a $5 \mu\text{g/mL}$, $0,143 \pm 0,014$, $0,555 \pm 0,0369$, $0,573 \pm 0,1092$ y $0,59 \pm 0,0967$ en el caso del uso de $20 \mu\text{g/mL}$ de anticuerpo, y $0,168 \pm 0,013$, $0,605 \pm 0,0495$, $0,589 \pm 0,101$ y $0,632 \pm 0,13$ cuando se utilizó a $50 \mu\text{g/mL}$. Como se observa, al igual que en la respuesta SPR en la inmovilización de mAc anti-BSA, el uso de $5 \mu\text{g/mL}$ del mismo y $1 \mu\text{g/mL}$ de PAG redujo drásticamente la señal de unión del BSA obtenida empleando el resto de concentraciones de ambas moléculas.

Los resultados demuestran que a diferencia del pH de inmovilización del PAG, su concentración no afectó substancialmente la sensibilidad del inmunoensayo puesto que, incrementos en un orden de magnitud (de 5 a $50 \mu\text{g/mL}$) no condujeron a un cambio significativo en la señal de inmovilización del mAc anti-BSA y detección de BSA. El leve incremento de la respuesta para la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie de PAG, preparada a concentraciones superiores a $5 \mu\text{g/mL}$, sugiere que la saturación de esta por el mAc anti-BSA tiene lugar al alcanzar esta concentración y no a $20 \mu\text{g/mL}$, concentración de PAG que satura la superficie sensora. Teniendo en cuenta el gran tamaño del anticuerpo (150 kDa) frente al de la molécula de PAG ($19,77 \text{ kDa}$), la falta de correlación entre la cantidad de PAG inmovilizado y el correspondiente acoplamiento del mAc anti-BSA podría explicarse por un notable impedimento estérico entre las moléculas de anticuerpo durante su inmovilización que dificultara su unión al PAG. Además cuando el inmunoensayo se llevó cabo utilizando concentraciones de 20 o $50 \mu\text{g/mL}$ de PAG, se produjo un importante aumento de la variabilidad de los resultados, lo que sugiere que el incremento de la concentración de PAG por encima de $5 \mu\text{g/mL}$ podría promover la formación de multicapas.

Por otro lado, los resultados muestran una gran correlación entre las señales SPR obtenidas para la inmovilización del mAc anti-BSA y la correspondiente unión del BSA, cuando el PAG es inmovilizado a una concentración entre 5 y $50 \mu\text{g/mL}$, lo que indica que en este intervalo se consigue una orientación adecuada del anticuerpo sobre la superficie, lo que facilita la posterior unión del BSA. Sin embargo, esta correlación fue

muy inferior cuando se inmovilizó 1 $\mu\text{g/mL}$ de PAG, observándose menor señal de BSA de lo esperado según la respuesta observada en los otros casos. Este resultado indica que a esta concentración de PAG parte del mAc anti-BSA inmovilizado no resulta accesible al BSA, lo que sugiere la existencia de anticuerpo con una orientación al azar que disminuye su capacidad de unión al antígeno, debido probablemente a una fisisorción del mismo debido a un cubrimiento insuficiente de la superficie con PAG.

Finalmente, las concentraciones más bajas de PAG y anti-BSA con las que se consiguió la mayor sensibilidad y reproducibilidad en el inmunoensayo, 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, fueron las seleccionadas para el desarrollo del método.

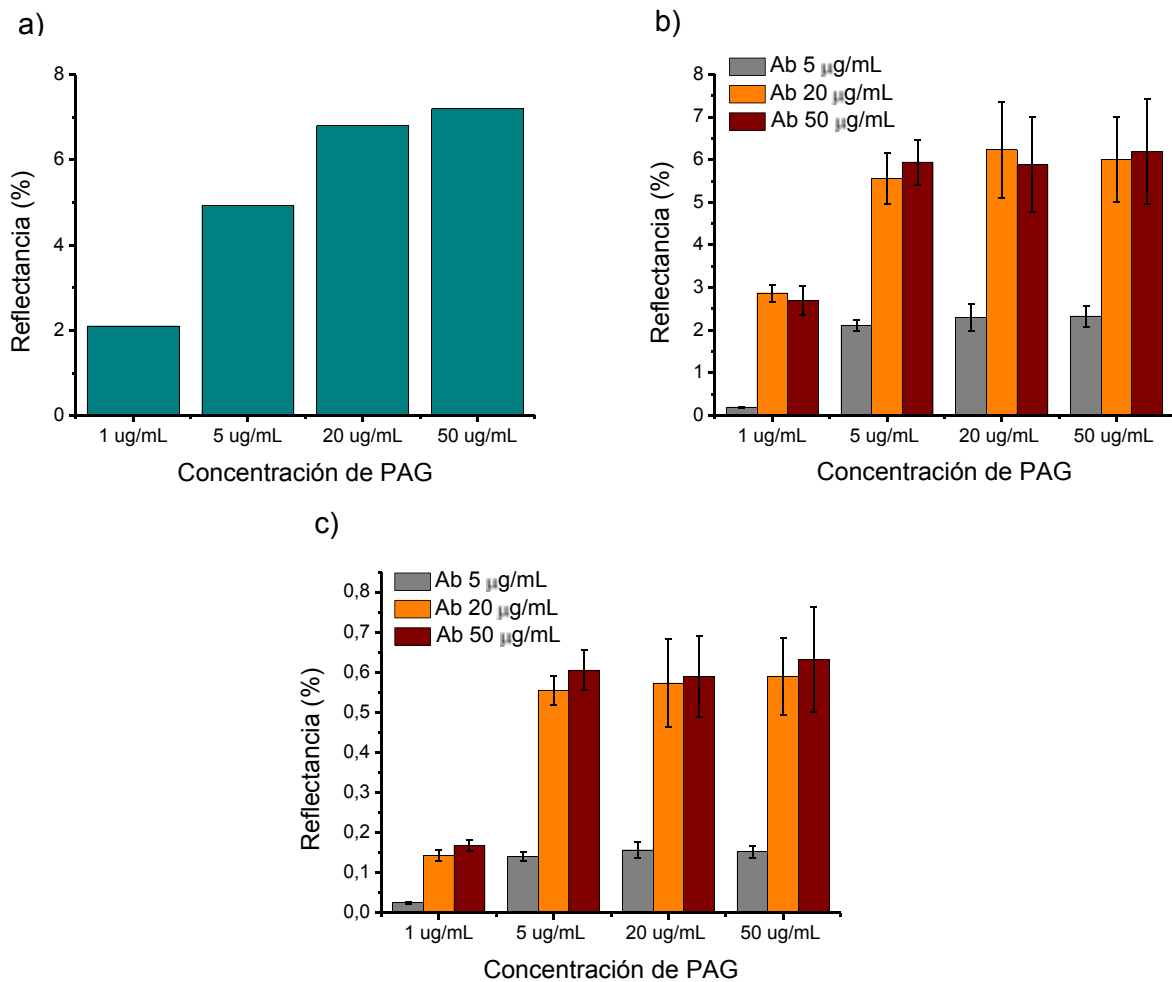


Figura 5.4. Evaluación de las concentraciones óptimas de PAG y anticuerpo. Los gráficos representan los valores medios de los datos de SPR ($\pm\text{SD}$) obtenidas con cuatro réplicas de cada medida. A) Inmovilización del PAG, (b) acoplamiento del mAc anti-BSA y (c) detección de BSA.

5.6. Inmunoensayo SPR basado en el uso del PAG para la detección de hGH

El método del PAG para la inmovilización de anticuerpos se aplicó para la detección directa de la hGH. El inmunoensayo se llevó a cabo empleando el mAc hGH-12, que se inmovilizó sobre la superficie mediante su acoplamiento al PAG siguiendo el protocolo desarrollado para la detección de BSA. Una vez preparada la monocapa de mAc hGH-12 se procedió a la detección de 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en PBST pH 7,4. Para evaluar la especificidad del sensor se utilizó la hormona Luteinizante (hLH), otra hormona de origen pituitario, con la que se había trabajado en anteriores inmunoensayos con este biosensor, cuyos niveles séricos se elevan notablemente cuando se alcanza el periodo de pubertad. Esta hormona fue inyectada en este mismo buffer a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ sobre la superficie de mAc hGH-12.

Teniendo en cuenta que la unión del PAG al anticuerpo es del mismo tipo que la que se establece entre este y la proteína G, como se explicó en el Capítulo X para esta proteína, el uso de cualquier solución de regeneración que rompa la interacción Ag-Ac afectaría a la unión PAG-Ac, ya que la estabilidad de ambas depende del mismo tipo de fuerzas. El uso de una reacción de *crosslinking*, que impida la ruptura de la unión entre PAG y el anticuerpo durante el proceso de regeneración, es la única estrategia que permitiría reutilizar la superficie. Sin embargo, el posible efecto negativo del *crosslinker* sobre la funcionalidad de la proteína orientadora, podría ser especialmente negativo en el caso de PAG, puesto que además de afectar su capacidad de unión a anticuerpos, podría comprometer su afinidad por la superficie de oro. A diferencia del método de inmovilización de anticuerpos vía proteína G, en el que esta se encuentra inmovilizada de forma covalente a la SAM de la superficie, de forma que la reacción de entrecruzamiento no puede afectar a la unión de la proteína a la misma, en el método del PAG la propia proteína receptora se autoensambla sobre la superficie sensora, de forma que la densidad de la monocapa de anticuerpo podría disminuir debido a una desestabilización de la unión del PAG a la superficie. Por lo tanto, debido a la posibilidad de que se establezcan enlaces covalentes entre aminoácidos de la estructura del PAG implicados en esta unión, no se consideró llevar a cabo un procedimiento de *crosslinking* en este trabajo, por lo que

no se reutilizó la superficie biofuncionalizada con anticuerpos. Las distintas medidas de las hormonas se realizaron sobre el mismo chip utilizando siempre distintas celdas de medida, o bien, sobre chips preparados de forma independientes. Como se muestra en el sensorgrama de la Figura 5.5, se observó una clara respuesta dosis-dependiente en la detección de hGH, sin embargo, la inyección de LH no produjo ninguna señal, lo que demostró la especificidad del inmunosensor. Sin embargo, considerando los niveles fisiológicos de hGH en suero, que se encuentran en un intervalo entre 1 y 100 ng/mL, las señales producidas por la unión de la hormona al anticuerpo, $0,428 \pm 0,032$ y $0,166 \pm 0,013$, en la inyección de $10^3 \mu\text{g/mL}$ y 500 ng/mL , respectivamente, indicaban la necesidad de mejorar la sensibilidad del inmunoensayo.

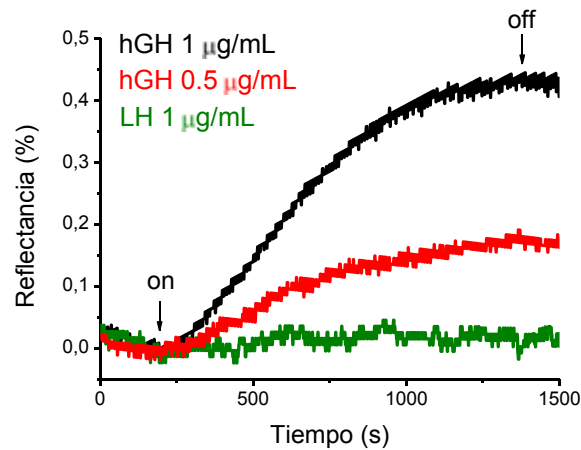


Figura 5.5. Detección de la hGH con un inmunosensor preparado mediante la técnica del PAG. La inmunoreacción con la hormona LH se utilizó como control negativo.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del inmunoensayo se estudió el efecto del ensamblaje ex-situ del PAG a la superficie sensora. De esta manera se aseguraba un tiempo suficiente para el cubrimiento de esta con la proteína, lo que quizás no se consiguió aumentando la concentración de la misma cuando se inmoviliza el flujo. La modificación del protocolo de biofuncionalización previamente empleado consistió en la incubación de la solución de $5 \mu\text{g/mL}$ de PAG en acetato pH 4,5, sobre el chip sensor durante toda la noche (14-16h). Tras colocar en el dispositivo el chip sensor

funcionalizado con el PAG, y establecer un flujo continuo de PBS pH 7,4, se inyectó una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de mAc hGH-12 en este buffer. Sin embargo, no se observó señal de inmovilización alguna. Este resultado, aparentemente discordante con los resultados obtenidos con la estrategia de ensamblaje del PAG en flujo, podría deberse a un deterioro de la proteína de fusión debido a su exposición durante un periodo de tiempo prolongado (14-16 h) a un pH bajo. Para prevenir la posible alteración de la función de unión al oro del PAG se redujo el tiempo de incubación a 4h. Aunque esta reducción mejoró el resultado, la señal de acoplamiento del mAc hGH-12 al PAG fue menor que la obtenida con la inmovilización del PAG en flujo. Con la intención de conseguir una mayor unión de anticuerpo, se probó a incubar el PAG durante el mismo tiempo en una solución de PBS pH 7,4 en lugar de acetato pH 4,5. Como se observa en la Figura 5.6 este aumento de pH llevó a un claro aumento de la señal de acoplamiento de mAc hGH-12. Esta aparente contradicción entre los resultados obtenidos con la estrategia de inmovilización del PAG ex-situ y en flujo podría explicarse si, como se discutió en el apartado 5.5, la poca afinidad del PAG por el oro a pH 7,4 observada con el método en flujo, se debiera a un posible efecto electrostático, teniendo en cuenta que el PAG adquiere carga negativa a pH 7,4, frente a la carga positiva que presenta a pH 4,5. Aunque esta influencia de la carga eléctrica del PAG sobre su inmovilización sea crítica en el ensamblaje en flujo de la proteína, puede no ser relevante en la estrategia ex-situ en la que se mantiene la solución de PAG en contacto con la superficie entre 14 y 16 h (*over night*).

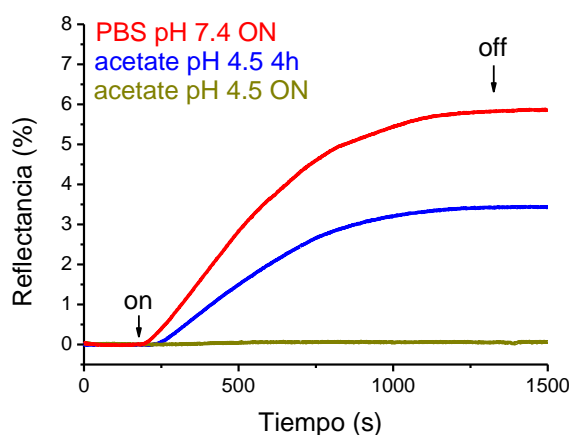


Figura 5.6. Acoplamiento del mAc hGH-12 a las superficies de PAG preparadas mediante su inmovilización ex-situ empleando distintos buffers.

Tras seleccionar el PBS pH 7,4 como el buffer óptimo para la inmovilización ex-situ del PAG, se ensayaron otros tiempos de incubación, 4 h y 30 min, con el objeto de conseguir la máxima sensibilidad en el inmunoensayo pero empleando el menor tiempo posible. La inmovilización del PAG durante 4 h dio lugar a resultados muy similares a los obtenidos inmovilizando la proteína durante la noche. Sin embargo, 30 minutos resultó ser un tiempo demasiado corto, puesto que se obtuvieron señales de acoplamiento de mAc hGH-12 y de detección de hGH considerablemente menores que cuando el PAG se incubó por un periodo más prolongado. La Tabla 5.2 muestra los valores medios de los datos SPR y los correspondientes coeficientes de variación (CV). Como se observa, las señales de unión del mAc hGH-12 al PAG y de detección de hGH, en el caso en el que el PAG se inmovilizó durante 30 minutos, no disminuyeron de forma proporcionada, observándose una reducción de señal mucho más drástica en la detección de la hormona. Esta falta de correlación entre la respuesta SPR para la inmovilización del anticuerpo y la de detección de hGH, en comparación con los resultados obtenidos incubando el PAG durante 4h o toda la noche, indica que parte del anticuerpo acoplado a la superficie no presenta una orientación que favorezca la accesibilidad de la hormona. La baja eficiencia de la superficie biofuncionalizada junto con la gran variabilidad observada en los resultados, especialmente de detección de hGH, cuando el tiempo de incubación del PAG empleado es 30 minutos, sugiere que este periodo no es suficiente para que tenga lugar el ensamblaje de la proteína, y que, por tanto, resulta en un pobre recubrimiento de la superficie por el PAG, lo que facilita la fisisorción del anticuerpo. Puesto que 4 h fue el periodo de incubación de la proteína más corto que permitió obtener la mayor sensibilidad en la detección de hGH, este tiempo fue seleccionado como el óptimo para el desarrollo del inmunoensayo. En la Tabla 5.3 se comparan los resultados del inmunoensayo para la detección de hGH realizando la inmovilización del PAG en flujo y ex-situ. Como se observa, la estrategia ex-situ mejora no solo la sensibilidad del inmunoensayo, sino que además reduce considerablemente la variabilidad del mismo. Por lo tanto, el método establecido para la inmovilización de anticuerpos mediante el uso del PAG se basó en el protocolo de ensamblaje ex-situ del mismo.

Tabla 5.2. Estudio del tiempo de inmovilización óptimo para la inmovilización ex-situ del PAG (5 µg/mL). (Los datos de SPR se expresan como porcentaje de reflectancia).

Inmovilización del PAG	Acoplamiento del mAc hGH-12		Detección de 1 µg/mL de hGH	
	Señal SPR	CV	Señal SPR	CV
ON	6,38	3,9	1,7745	2,7215
4 horas	6,65	5,73	0,7899	2,3315
30 minutos	4,5	18,57	0,5659	2,1687

Tabla 5.3. Comparación entre las dos estrategias: Inmovilización en flujo y ex-situ del PAG a 5 µg/mL. Datos (% reflectancia) obtenidos con cuatro réplicas de cada medida.

Inmovilización del PAG	Acoplamiento del mAc hGH-12		Detección de 1 µg/mL de hGH		Detección de 0,5 µg/mL de hGH	
	Señal SPR	CV	Señal SPR	CV	Señal SPR	CV
Ex-situ	6,65	5,73	0,517	4,42	0,22	6,27
En flujo	5,53	10,12	0,428	7,7	0,166	8,34

Finalmente, la eficiencia del método optimizado se evaluó llevando a cabo la detección de hGH en un rango concentración de 125 a 10³ ng/mL. La respuesta SPR se muestra en el sensorgrama de la Figura 5.7.a, donde se puede observar como la señal de unión de la hormona crece a medida que aumenta su concentración. En la Figura 5.7.b se muestra la curva calibrado calculada a partir del valor medio de las señales obtenidas con cada concentración de hormona. Como se observa, la respuesta SPR en el rango de concentración de hGH ensayado fue altamente lineal ($R^2=0.985$), lo que indica que este se encuentra lejos de la concentración saturante de hGH. El límite de detección calculado fue 90 ng/mL, valor que se encuentra dentro del rango fisiológico de la hormona, aunque próximo al límite superior del mismo, considerablemente superior al nivel de corte establecido para el diagnóstico de deficiencia de hGH (10 ng/mL), por lo que el inmunoensayo solo sería útil para diagnosticar aquellas enfermedades causadas por un exceso de la hormona.

Por otro lado, la reproducibilidad del inmunoensayo se estudió mediante la evaluación de la variabilidad utilizando diferentes superficies sensoras. Se midieron

curvas de calibrado con muestras por triplicado en idénticas condiciones experimentales usando tres superficies sensoras preparadas en diferentes tiempos. Los valores medios de coeficientes de variación calculados fueron menores de 7%, lo que muestra la alta reproducibilidad del inmunoensayo.

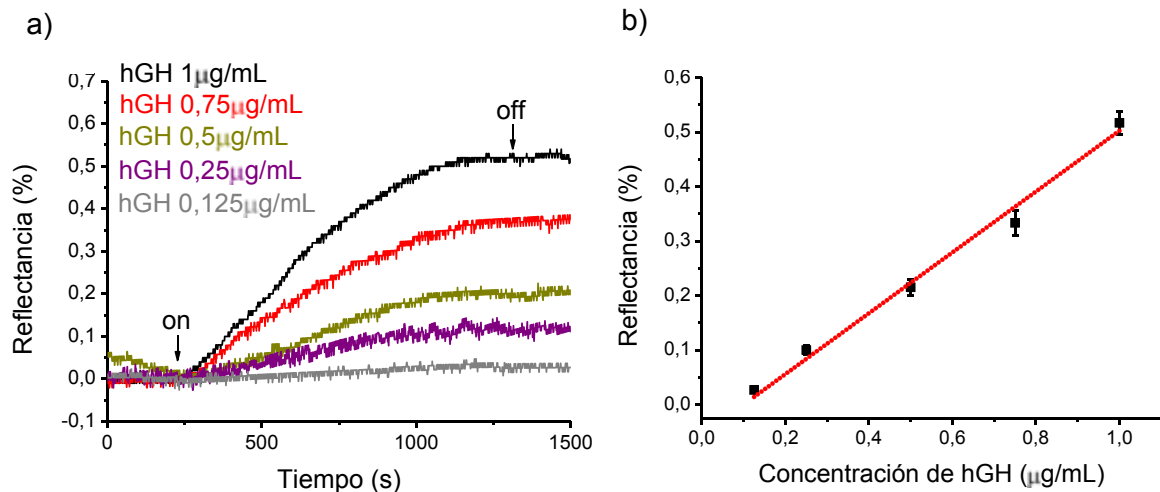


Figura 5.7. Detección de hGH con el método de biofuncionalización óptimizado del PAG: A) Sensorgrama correspondiente a la unión de 1 hGH en el intervalo de concentración 0,125-1 µg/mL y (b) correspondiente curva de calibrado (con el valor promedio de cuatro réplicas de cada medida).

5.7. Comparación del uso del PAG con métodos convencionales de inmovilización de anticuerpos

El método del PAG desarrollado para la inmovilización de anticuerpos se comparó con los métodos comúnmente más utilizados para este fin. Para ello el inmunoensayo de la hGH también se realizó llevando a cabo la inmovilización del mAc hGH-12 mediante el método covalente convencional y mediante el uso de la proteína A nativa. Las biofuncionalizaciones con los anticuerpos se prepararon como se describe en el apartado 5.3. En la Tabla 4.4 se comparan los resultados obtenidos con estos dos métodos y el del PAG para la inmovilización del mAc hGH-12.

Tabla 5.4. Comparación de la eficiencia de los distintos de métodos de inmovilización empleados.

Método de Inmovilización	Acoplamiento del mAc hGH-12 a 20 µg/mL (% Reflectancia)		Detección de 1 µg/mL de hGH (% Reflectancia)	
	Señal de SPR	CV (%)	Señal de SPR	CV (%)
PAG	6,65	5,73	0,517	4,42
Proteína A (PBS)	2,94	1,35	0,21	1,55
Proteína A (acetato)	1,9	2,12	0,089	1,8
Método covalente	3	9,54	0,033	14,1

La señal de acoplamiento del anticuerpo fue mayor cuando este se inmovilizó covalentemente que cuando se unió a la proteína A inmovilizada en la superficie, sin embargo, el anticuerpo unido a esta dio lugar a una señal de detección de hGH considerablemente mayor. La eficiencia de la superficie preparada con la proteína A varió en función del buffer utilizado, PBS pH 7,4 o acetato pH 4,5, en la inmovilización de la misma, de manera que la mayor capacidad de unión al mAc hGH-12 se observó en la superficie preparada con PBS pH 7,4, donde la señal de detección de hGH fue aproximadamente el doble de la obtenida cuando la superficie se preparó con acetato pH 4,5. Teniendo en cuenta que la señal de inmovilización de proteína A fue mayor en este último caso, se esperaba mayor respuesta con esta superficie que con la preparada en PBS. Este resultado indica que la inmovilización de la proteína A en este último buffer proporciona un mayor número de dominios de unión a anticuerpo accesibles para la posterior inmovilización del mismo. Esta mayor disponibilidad de sitios de unión al mAc hGH-12 sugiere que en condiciones de pH superior al pI de la proteína A (pI=5), intervienen menos residuos aminoacídicos de esta en su unión a la SAM de la superficie que cuando la interacción ocurre a pH inferior a su pI, aumentando así el número de dominios de unión al anticuerpo libres. Por otro lado, la respuesta extremadamente baja de la superficie preparada mediante la inmovilización covalente del anticuerpo, con la que paradójicamente se observó la mayor señal de acoplamiento del mismo, indica que el anticuerpo no presenta la orientación apropiada para la unión de la hormona. Este resultado demuestra que la inmovilización al azar del anticuerpo, en la que no se controla la orientación del mismo, disminuye considerablemente la eficiencia del inmunoensayo.

El cálculo de la relación señal hGH: señal mAb hGH-12 para cada método de inmovilización, siguiendo el mismo orden de la Tabla 4.4 (desde el PAG hasta el método covalente), resultó en 0,079, 0,071, 0,047 y 0,01, respectivamente. Este dato es indicativo de la capacidad que presenta el anticuerpo inmovilizado para su unión al antígeno, lo que depende de la orientación adoptada por el primero durante su inmovilización. En este sentido, como se puede observar, el uso del PAG y de la proteína A en PBS, dieron lugar a un resultado muy parecido, de forma que ambos métodos de inmovilización permiten la orientación más eficiente del mAb hGH-12 sobre la superficie (algo más en el caso del PAG). Sin embargo, puesto que con el método del PAG se alcanza mayor densidad de anticuerpo sobre la superficie, este mejora considerablemente el rendimiento del inmunoensayo obtenido cuando el anticuerpo es acoplado a la proteína A inmovilizada en PBS. La pérdida de capacidad de la proteína A para inmovilizar el anticuerpo de forma orientada, cuando el anclaje de esta a la superficie se lleva a cabo en acetato pH 4,5, podría sugerir que en estas condiciones de pH y fuerza iónica, la orientación de la propia proteína A durante su inmovilización resulta menos favorable que la que adopta al inmovilizarse en PBS pH 7,4, de forma que aunque permita el acoplamiento del anticuerpo, resulta en una menor densidad del mismo capaz de unirse al antígeno. Por otro lado, la relación señal de la señal hGH: señal mAb hGH-12 obtenida inmovilizando el anticuerpo covalentemente, indica, como se comentó anteriormente, que la ausencia de control durante su inmovilización reduce considerablemente el rendimiento del inmunoensayo.

Finalmente, los resultados indican que el uso de la proteína A y el método estándar de inmovilización covalente, para la unión de anticuerpos a la superficie sensora, reducen drásticamente el rendimiento del inmunoensayo conseguido con la estrategia del PAG, la cual da lugar a niveles mucho mayores de detección de analito.

5.8. Conclusiones

El método de inmunoensayo desarrollado en este trabajo demuestra la aplicabilidad de una novedosa proteína de fusión, *PAG (Protein A-Gold binding domain)*, en la fabricación de inmunosensores SPR basados en un formato directo de

detección, en el que la superficie sensora es funcionalizada con el anticuerpo. La proteína presenta en la misma molécula afinidad por el oro y por la región Fc de anticuerpos, lo que la dota de un gran potencial para la inmovilización orientada de anticuerpos en superficies sensoras de SPR, con la ventaja adicional de su simplicidad por involucrar tan sólo un paso de funcionalización.

En primer lugar se llevó a cabo la optimización de las condiciones experimentales con la intención de lograr la máxima eficiencia en el uso del PAG. Una vez optimizado, el método se empleó en la realización de un inmunoensayo para la detección de hGH. El límite de detección alcanzado (90 ng/mL) permite la aplicación del método en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con un exceso de secreción de hormona pero no en la detección de casos de deficiencia de la misma, una situación mucho más frecuente que la anterior. La diferencia entre la sensibilidad alcanzada en este inmunoensayo y el ensayo realizado mediante la inmovilización del anticuerpo via par biotina/estreptavidina, en el que se llegó a detectar de forma directa 5 ng/mL, se debe a la menor cantidad de anticuerpo unido a la superficie mediante el método del PAG. Esta menor capacidad de unión a anticuerpos que presenta la superficie modificada con PAG con respecto a la superficie modificada con estreptavidina está probablemente relacionada con la ausencia de control de la distribución de la proteína receptora en el método del PAG. Sin embargo, aunque la sensibilidad del ensayo debería mejorarse para su aplicación en la detección de la deficiencia de hGH, el método demostró ser mucho más eficiente que las estrategias convencionales de inmovilización de anticuerpos utilizadas en el desarrollo de inmunosensores, basadas en el anclaje a la superficie mediante unión covalente a la SAM o acoplamiento a la proteína A, con las que la respuesta del biosensor para la detección de hGH fue mucho menor. Además, la baja variabilidad de los resultados obtenidos en el inmunoensayo llevado a cabo empleando el método del PAG, demuestra la fiabilidad del mismo. Por otro lado, la estrategia desarrollada en este trabajo permite funcionalizar la superficie sensora de oro de forma muy rápida y simple, sin el requerimiento de ningún proceso químico ni el uso de anticuerpos en su forma no nativa.

Para mejorar la sensibilidad de inmunosensores basados en el método desarrollado en este trabajo, y ampliar así sus posibilidades de aplicación en la práctica

clínica, sería interesante estudiar cómo controlar la distribución del PAG sobre la superficie, y de este modo, prevenir la reducción de la sensibilidad debida al impedimento estérico entre moléculas de anticuerpo durante su inmovilización, así como utilizar un segundo anticuerpo para llevar a cabo un inmunoensayo tipo sándwich con el que se amplifica la señal de detección del analito. Para el primer propósito la molécula de PAG debería inmovilizarse junto a una molécula que carezca de la capacidad de unir anticuerpos, de forma que actúe de molécula espaciadora, al igual que el MUOH en la SAM utilizada cuando la inmovilización del anticuerpo se llevó a cabo mediante el uso del sistema biotina-estreptavidina (apartado 3.4.1). Controlando la relación entre ambas moléculas puede optimizarse la distribución del anticuerpo y, con ello, mejorar la sensibilidad del inmunoensayo. De forma análoga a la formación de cualquier SAM mixta, la molécula funcional y espaciadora deben tener una naturaleza físico-química y tamaño parecidos, levemente mayor al de la molécula funcional. Por este motivo, esta estrategia requeriría el diseño de una molécula parecida al PAG, de menor tamaño, y con dominios de unión a anticuerpos modificados, de forma que no conservaran esta función.

La segunda alternativa para mejorar la sensibilidad del inmunoensayo, requiere disponer de un segundo anticuerpo que presente afinidad por un epítipo distinto del que reconoce el anticuerpo inmovilizado, para utilizarlo en un formato de ensayo tipo sándwich. Además, sería necesario bloquear los posibles sitios de unión al anticuerpo del PAG antes de la inyección del segundo anticuerpo, para evitar así la posible unión de este al PAG, que llevaría a una sobrevaloración de la concentración de analito.

La reutilización de la superficie biofuncionalizada con anticuerpos no ha sido objetivo de este trabajo, que se ha centrado en demostrar la eficacia del PAG como herramienta para conseguir inmovilizar los anticuerpos de forma orientada. Sin embargo, aunque la reutilización de la superficie de anticuerpos resulte un reto poco viable (como se ha discutido anteriormente), podría considerarse el desarrollo de un procedimiento para la reutilización de la superficie de PAG. Este supondría encontrar una solución de regeneración de condiciones tales que permitiera eliminar el enlace entre PAG y anticuerpo sin afectar a la integridad de la molécula de PAG. Sin embargo, esta estrategia

requeriría de un gasto mayor de anticuerpo, que habría de inmovilizarse antes de cada medida de detección de analito.

5.9. Referencias

- [1] Brown S., *Metal-recognition by repeating polypeptides*. Nat. Biotechnol., 1997. **15**:269-272.
- [2] So C.R., Kulp III J.L, Oren E.E., Zareie H., Tamerler C., Evans J.S. and Sarikaya M., *Molecular Recognition and Supramolecular Self-Assembly of a Genetically Engineered Gold Binding Peptide on Au{111}*. American Chemical Society, 2009. **3**(6):1525-1531.
- [3] Vila A., Acres J.M. and Maranas J.K. *Investigating the Specificity of Peptide Adsorption on Gold Using Molecular Dynamics Simulations*. Biomacromolecules, 2009. **10**:2118-2128.
- [4] Braun R., Sarikaya M. and Schulten K., *Genetically Engineered Gold-Binding Polypeptides: Structure Prediction and Molecular Dynamics*. J Biomater Sci Polym Ed., 2002. **13**(7):747-57.
- [5] Tamerler C., Duman M., Oren E.E., Gungormus M., Xiong X., Kacar T., Parviz B.A. and Sarikaya M., *Materials Specificity and Directed Assembly of a Gold-Binding Peptide*. Small, 2006. **2**(11):1372-8.
- [6] Hnilova M., Oren E.E., Seker U.O.S., Wilson B.R., Collino S., Evans J.S., Tamerler C. and Sarikaya M., *Effect of Molecular Conformations on the Adsorption Behavior of Gold-Binding Peptides*. Langmuir, 2008. **24**(21):12440-12445.
- [7] Tamerler C., Oren E.E., Duman M., Venkatasubramanian E. and Sarikaya M., *Adsorption Kinetics of an Engineered Gold Binding Peptide by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and a Quartz Crystal Microbalance*. Langmuir, 2006. **22**(18):7712-18.
- [8] Pinto G., Adan L., Souberbielle J.C., Thalassinos C., Brunelle F. and Brauner R., *Idiopathic growth hormone deficiency: presentation, diagnostic and treatment during childhood*. Ann Endocrinol., 1999. **60**:224-31.
- [9] Cuneo R.C., Judd S., Wallace J.D., Perry-Keene D., Burger H., Lim-Tio S., Strauss B., Stockigt J., Topliss D., Alford F., Hew L., Bode H., Conway A., Handelsman D., Dunn S., Boyages S., Cheung N.W. and Hurley D., *The Australian Multicenter Trial of Growth Hormone (GH) Treatment in GH-Deficient Adults*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998. **83**:107-16.
- [10] Dattani M. and Preece M., *Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment*. Lancet, 2004. **363**(9425):1977-87.
- [11] Delgado-Butrón C., Delgado-Torres L., Delgado-Torres C., Bellido-Postigo E., Beltrán-Castañeda F., Medina-Rivera G. and Farfán-Aspicueta J.C., *Tumores Pituitarios: Adenomas somatotropos (acromegalia)*. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, 2001. **14**(2).

- [12] Mauri M. y Alfayate R., *Diagnóstico bioquímico de la deficiencia de hormona de crecimiento*. Endocrinol. Nutr., 2007. **54**(4):225-9.
- [13] Popii V. and Baumann G., *Laboratory measurement of growth hormone*. Clin. Chim. Acta., 2004. **350**(1-2):1-16.
- [14] Bidlingmaier M. and Strasburger C.J., *Growth hormone assays: current methodologies and their limitations*. Pituitary, 2007. **10**:115-119.

Conclusiones generales

En este trabajo se han desarrollado distintas estrategias para la inmovilización controlada de anticuerpos sobre la superficie sensora de dispositivos SPR, y la aplicación de estos inmunosensores en la determinación de las hormonas hTSH y hGH, ambas de vital importancia en el desarrollo y crecimiento del individuo, así como en el control de su metabolismo. El objetivo principal ha sido maximizar la eficiencia del proceso de inmovilización del anticuerpo, controlando la orientación y densidad del mismo sobre la superficie, para conseguir que ésta presente una alta funcionalidad, y con ello se consiga un inmunosensor de alto rendimiento. Teniendo en cuenta la inevitable pérdida de funcionalidad del anticuerpo inmovilizado después de varios ciclos de regeneración, y que al igual que numerosos dispositivos médicos, los inmunosensores de un único uso pueden ser deseables en la práctica clínica, la reutilización de un mismo chip no ha sido un objetivo prioritario en este trabajo.

El contenido de esta tesis se ha dividido en tres bloques distintos. En el primero de ellos se ha descrito el desarrollo de un método que presenta un gran potencial en el control de dopaje con hGHr. Haciendo uso del sistema biotina/estreptavina se ha desarrollado una metodología para la inmovilización de un anticuerpo específico para las isoformas 22 y 20K de la hGH. En la superficie sensora obtenida, se ha llevado a cabo un inmunoensayo sándwich empleando dos anticuerpos selectivos para una u otra variante de la hormona, lo que ha permitido la determinación simultánea de estas en suero, uno de los grandes retos en el desarrollo de tests antidoping, que por el momento requieren dos ensayos independientes para calcular la relación entre las isoformas.

La segunda sección del trabajo se ha centrado en el desarrollo de un método novedoso para la inmovilización de anticuerpos, basado en el uso de una proteína de fusión recientemente diseñada. Se ha utilizado el par BSA/antiBSA como sistema modelo para optimizar las condiciones del método, y finalmente, este se ha empleado en un inmunoensayo para la determinación de la hGH de 22 kDa, muy importante en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones del crecimiento.

Se ha demostrado la utilidad de la proteína para conseguir llevar a cabo una inmovilización orientada del anticuerpo, de una manera muy sencilla, y reduciendo al máximo el uso de material y tiempo empleado durante el inmunoensayo. Finalmente, en el tercer bloque se ha desarrollado un inmunosensor para el diagnóstico del Hipotiroidismo Congénito Neonatal. Se han explorado dos vías distintas en la funcionalización de la superficie sensora. Una de las estrategias utilizadas en la inmovilización del anticuerpo anti-hTSH se ha basado en el uso de la metodología empleada en el desarrollo del inmunoensayo para la detección de las isoformas de la hGH, continuando su optimización para mejorar la eficiencia de la misma. Como segunda estrategia se ha desarrollado un método para la inmovilización del anticuerpo basado en el uso de la proteína G.

En conjunto, en este trabajo se han desarrollado tres métodos para la formación de la monocapa bioreceptora de anticuerpo sobre la superficie sensora. En todos ellos se ha llevado a cabo el acoplamiento del anticuerpo a la superficie mediante la interacción de afinidad entre el mismo y una proteína receptora previamente inmovilizada. Estos métodos se han basado en el uso del sistema biotina-estreptavidina, la proteína G y la proteína de fusión PAG. El primero de estos se ha llevado a cabo modificando el anticuerpo con una molécula derivada de la biotina, mientras que en los dos últimos se ha inmovilizado el anticuerpo en su forma nativa. Los métodos de inmovilización basados en el uso del par biotina/estreptavidina y la proteína G han requerido la formación de una SAM sobre la superficie sensora. Para la formación de la SAM se ha utilizado una mezcla de las moléculas MHDA, que ha servido para el anclaje del anticuerpo, y MOUH, que se ha utilizado como molécula espaciadora. En el caso del método del PAG la propia proteína receptora se ha unido a la superficie por autoensamblaje.

En el estudio de las condiciones de inmovilización adecuadas para conseguir maximizar la capacidad de unión de la monocapa de anticuerpos receptores sobre la superficie sensora, a las distintas hormonas, se han optimizado diversos parámetros. Se han utilizado diferentes procedimientos de optimización atendiendo a los requerimientos específicos de cada método. En conjunto se han estudiado las condiciones de los buffers de inmovilización, la composición de la SAM, las concentraciones de proteína receptora y del propio anticuerpo, y el desarrollo de parte del proceso de inmovilización ex-situ o en flujo. La densidad de la proteína receptora, ya sea la estreptavidina, la proteína G o el

PAG, dependiendo del método de inmovilización empleado, se ha mostrado como uno de los parámetros más críticos en todos los procesos. Mediante la variación de la proporción del tiol funcionalizado (MHDA) y separador (MUOH) en la formación de la SAM, se ha logrado controlar la densidad superficial de la estreptavidina y la proteína G. Las monocapas más eficientes se han conseguido utilizando las SAMs con fracciones molares de MHDA de 0,02 y 0,05, respectivamente. En el caso del uso del PAG, la densidad adecuada de la proteína se ha determinado mediante la optimización de su concentración, encontrándose que valores superiores o inferiores a 5 $\mu\text{g/mL}$ de la misma reducen enormemente la eficiencia de la superficie de anticuerpos receptores.

La composición de los buffers de inmovilización se ha revelado como un factor limitante en los métodos basados en el uso de la proteína G y el PAG, puesto que cuando la inmovilización tanto de estas proteínas como el acoplamiento del anticuerpo a las mismas se llevó a cabo en PBS pH 7,4, se observó un claro aumento del rendimiento del inmunosensor obtenido al emplear otras condiciones de pH y fuerza iónica. En el método basado en el uso del par biotina/estreptavidina, debido a que la gran afinidad de la interacción entre estas moléculas permite que la unión de la estreptavidina a la superficie biotinilada, así como la del anticuerpo biotinilado a la estreptavidina, sea estable en un intervalo de pH y fuerza iónica muy amplio, no ha sido necesario optimizar el buffer de inmovilización de ninguna de estas moléculas, utilizándose en ambos casos PBST pH 7,4. En el desarrollo de este método se ha optimizado el proceso de biotinilación de la SAM y del anticuerpo, ajustando el grado de biotinilación de este último y comparando el efecto de distintos derivados de biotina en la modificación de la SAM de la superficie. En este proceso se ha podido comprobar que en la formación de la monocapa de biotina, la introducción de una molécula de carácter hidrofílico como el PEG, entre la molécula de biotina y la SAM, en lugar de una molécula hidrofóbica como una cadena hidrocarbonada, mejora notablemente la eficiencia de la inmovilización del anticuerpo. Este resultado sugiere que los derivados tiolados del PEG podrían sustituir con éxito los alcanotioles comúnmente utilizados en inmunosensores SPR para la formación de la SAM, abriendo así una línea de trabajo muy interesante para mejorar el rendimiento de los mismos.

El método basado en el par biotina/estreptavidina ha demostrado ser el más eficaz para la inmovilización de anticuerpos en biosensores SPR. Con él se han conseguido alcanzar límites de detección de 5 y 12,7 ng/mL en los inmunoensayos directos de la hGH y hTSH, respectivamente. Estos bajos niveles de concentración, determinados en buffer PBST, demuestran que el método desarrollado originalmente en el inmunosensor para la determinación de las isoformas de la hGH, y mejorado en el trabajo con la hTSH, ha dado lugar a monocapas de anticuerpos receptores con una gran capacidad de reconocimiento del analito. Puesto que son pares antígeno-anticuerpo distintos, la diferencia en la afinidad del anticuerpo por su antígeno explicaría que a pesar de haber mejorado el método de inmovilización en el trabajo con la hTSH, no se haya alcanzado la sensibilidad del inmunoensayo de la hGH, que permite detectar esta hormona a niveles fisiológicos. Por otro lado, este método de inmovilización de anticuerpos permite utilizar la superficie sensora en un inmunoensayo tipo sándwich para aumentar la sensibilidad en la detección del analito. En el caso de la hTSH, la optimización del inmunoensayo sándwich ha permitido detectar niveles de hormona en suero de 1,2 ng/mL, por lo que se ha demostrado que el inmunosensor desarrollado tendría utilidad en el diagnóstico de HCN. Por otro lado, el empleo de este método de inmovilización para el desarrollo de una superficie de anticuerpo específica para la detección de las isoformas hGH 22 y 20K, ha permitido, mediante el uso de anticuerpos selectivos para cada una de ellas, detectar ambas isoformas en suero mediante un único inmunoensayo, a niveles de concentración de 0,9 ng/mL, que no solo entra dentro del rango fisiológico de las variantes de la hormona, sino que además en el caso de la 22K, corresponde a los niveles basales de la misma. Aunque la aplicación del método en el análisis anti-doping puede estar limitada por la reducción que experimenten los niveles circulantes de la hGH 20K tras la administración de la hormona, el inmunoensayo permite calcular la relación hGH 22K:hGH 20K, parámetro indicador de dopaje con hGHr.

La superficie receptora de anticuerpo preparada mediante el método de la proteína G ha mostrado una funcionalidad parecida a la obtenida con el método basado en el par biotina/estreptavidina. La sensibilidad alcanzada en el ensayo directo de la hTSH realizado en este último caso, es solo levemente mayor que cuando se ha utilizado la proteína G (16 ng/mL). Sin embargo, con este método el nivel inmovilización de anticuerpo es mucho menor con lo que la capacidad de reconocimiento del antígeno por

molécula de anticuerpo inmovilizada es considerablemente superior, lo que se explica por la pérdida de funcionalidad del anticuerpo biotinilado y por la mayor aleatoriedad en la orientación del mismo durante su inmovilización. El mayor éxito del método basado en el par biotina/estreptavidina radica en que permite que la señal de detección se amplifique mediante un ensayo sándwich, lo que no ha sido posible cuando se ha utilizado la proteína G debido a la imposibilidad de garantizar la especificidad de la señal producida por la unión del segundo anticuerpo. Por este motivo el inmunosensor creado mediante este segundo método no sería de utilidad en el diagnóstico del HCN.

La inmovilización del anticuerpo mediante el uso del PAG ha dado lugar al inmunosensor de menor sensibilidad, no pudiéndose detectar niveles de hGH (22K) en PBST por debajo de 90 ng/mL. Sin embargo, al compararse con el método de inmovilización covalente convencional o el uso de la proteína A en su forma nativa, el método del PAG resulta el más eficaz, aumentando el nivel de detección de la hormona hasta 15 veces en el primer caso, y 2 o 3 veces en el segundo. La relación entre la señal de hGH y de anticuerpo demuestra que el PAG conserva la capacidad de la proteína A de unir el anticuerpo con la orientación apropiada para la posterior interacción con el analito, y por tanto, como se esperaba, que la unión del PAG y el anticuerpo tiene lugar de forma específica. De este modo, el éxito del método del PAG frente al uso de la proteína A se debe a que con el primero se alcanza un nivel de inmovilización de anticuerpo mucho mayor, puesto que al contrario que el proceso de inmovilización de la proteína A, la unión del PAG a la superficie garantiza que los dominios de unión al anticuerpo se dispongan de una forma accesible al mismo.

Debido a que todos los anticuerpos empleados en este trabajo son del tipo IgG₁, por el que presenta mayor afinidad la proteína G que la A, el mayor rendimiento del inmunosensor desarrollado utilizando el método de la proteína G en comparación con el del PAG, es un resultado que se esperaba con bastante probabilidad. El comprobar que este último mejora la sensibilidad que se alcanza cuando se usa la proteína A nativa, demuestra que si se comparan los métodos del PAG y la proteína G, utilizando anticuerpos que presenten la misma afinidad por la proteína A y G, el método del PAG resulta más eficaz. Puesto que la inmovilización del anticuerpo mediante la estrategia de la proteína G o del sistema biotina/estreptavidina dan lugar a superficies inmunosensoras

con una capacidad de unión al analito parecida, el método del PAG podría mejorar también el rendimiento de inmunosensores desarrollados mediante el uso del par biotina/estreptavidina, pese a estar limitado, al igual que el método de la proteína G, a utilizarse solo para inmunonensayos directos. Por lo tanto, en este trabajo se ha demostrado el gran potencial que presenta la proteína de fusión PAG para la inmovilización de anticuerpos en dispositivos SPR.

La fiabilidad de los inmunosensores desarrollados se ha evaluado mediante el estudio de la variabilidad intra- en inter-ensayo, de forma que se han obtenido coeficientes de variación en un intervalo entre 2,7 y 8,2 %, lo que demuestra la excelente reproducibilidad de los métodos empleados.

En resumen en este trabajo se han desarrollado tres métodos de inmovilización de anticuerpos en superficies sensoras de SPR que permiten controlar la densidad y orientación de los mismos, ambos parámetros claves para la fabricación de inmunosensores de alta sensibilidad. Se ha demostrado que el uso cualquiera de estos métodos aumenta considerablemente la sensibilidad de los inmunoensayos realizados mediante la inmovilización covalente del anticuerpo. Por otro lado, según nuestro conocimiento, el trabajo desarrollado en esta tesis es una de las pocas aplicaciones de un biosensor SPR que permite llevar a cabo la determinación directa de un analito en muestras de suero en niveles de concentración de relevancia sin necesidad de dilución o pretratamiento. La metodología que se ha desarrollado permite llevar a cabo la determinación de las hormonas hTSH y hGH de una forma rápida, sencilla y en tiempo real, sin necesidad de utilizar marcadores, usando un volumen reducido de suero de tan sólo 110 μL , y por tanto, puede constituir una valiosa herramienta para el diagnóstico rápido en laboratorios clínicos y en puntos de atención médica (POC).

Líneas de futuro

Tras el desarrollo de este trabajo se han abierto nuevas posibilidades encaminadas a la mejora de la sensibilidad de los inmunosensores y la reutilización de los mismos. Concretamente el método desarrollado para la inmovilización de anticuerpos que hace uso de la proteína de fusión PAG requiere un mayor proceso de optimización para lograr fabricar un inmunosensor de niveles de sensibilidad suficientes para poder aplicarse en el diagnóstico clínico. Con esta intención sería interesante disponer de una molécula análoga a esta proteína que pudiera utilizarse para controlar la densidad de anticuerpo sobre la superficie, lo que permitiría aumentar la sensibilidad del inmunosensor. Con este mismo objetivo podría diseñarse una estrategia que permitiera llevar a cabo un inmunoensayo tipo sándwich con la garantía de que pudiera llevarse una unión específica del anticuerpo de detección. De igual manera el método basado en el uso de la proteína G requeriría de una estrategia análoga para llevar a cabo un ensayo sándwich, cuyo desarrollo presenta las mismas limitaciones que en el caso del método del PAG.

La forma más eficaz de aumentar la sensibilidad alcanzada en los inmunoensayos llevado a cabo en este trabajo sería transferir los métodos desarrollados a otros sistemas plasmónicos de mayor sensibilidad que el SPR, recientemente desarrollados en nuestro grupo, como son los sensores magneto-óptico de resonancia de plasmón superficial (MOSPR), nanodiscos de oro, o bien biosensores basados en otros mecanismos de transducción, como son los sistemas nanofotónicos. Un ejemplo de estos últimos son los interferómetros bimodales, que mejoran notablemente la sensibilidad de los biosensores SPR, aunque al presentar una superficie sensora de silicio en lugar de oro, no sería posible emplear en ellos el método de inmovilización basado en el uso del PAG.

Respecto a la reutilización de los inmunosensores, el trabajo a la realizar debería centrarse en diseñar métodos de regeneración de la superficie de proteína receptora en lugar de la superficie de anticuerpo, puesto que como se ha discutido a lo largo de este trabajo, la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado resulta fácilmente alterada tras el uso de métodos de regeneración. En esta línea de trabajo habría que excluir el método

basado en el uso del par biotina/estreptavidina debido a la irreversibilidad de la unión entre estas moléculas.

Por último, en los últimos tiempos el avance de la biotecnología ha dado lugar a numerosas moléculas diseñadas para su uso como linkers moleculares, abriéndose un gran abanico de posibilidades para el desarrollo de métodos de inmovilización de anticuerpos. Además de estos linkers moleculares, la posibilidad de producir anticuerpos recombinantes permite diseñar métodos de inmovilización cada vez más simples y elegantes.

Publicaciones

- Carrascosa L.G., Treviño J., de Juan-Franco E., Calle A. and Lechuga L.M., “*Real-time SPR biosensing for early clinical diagnostics*”. Proceedings of the 6th IberoamericanCongress on Sensors, IBERSENSOR’2008.
- Elena de Juan-Franco, Antonio Caruz, José R. Pedrajas, Laura M. Lechuga, “*Site-directed antibody immobilization using a protein A-gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing*”, Analyst, 2013; 138:2023-2031.
- Elena de Juan-Franco, Jose Miguel Rodríguez-Frade, Mario Mellado, Laura M. Lechuga, “*Implementation of a SPR immunosensor for the simultaneous detection of 22K and 20K hGH isoforms in human serum samples*” (DOI 10.1016/j.talanta.2013.04.042).