



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESTUDIO DE UN MÉTODO DE FOTOINMOVILIZACIÓN CON CARACTERÍSTICAS DE QUÍMICA-CLICK PARA EL ANCLAJE EFECTIVO Y ORIENTADO DE ANTICUERPOS SOBRE SOPORTES SÓLIDOS CON FINES DE BIOSENSADO

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: SAMUEL PEPIOL SALOM
TUTORA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL

Curso académico: 2018-2019

VALENCIA, 8 DE JULIO DE 2019

Estudio de un método de fotoinmovilización con características de química-click, para el anclaje efectivo y orientado de anticuerpos sobre soportes sólidos con fines de biosensado

Resumen

Disponer de herramientas de análisis rápidas, sensibles y específicas es una de las demandas de la sociedad actual. Estas herramientas encuentran aplicación no sólo en el campo clínico, sino también en el control de calidad, agroalimentación o control medioambiental, entre otros. Una estrategia muy utilizada para reconocer específicamente el analito es hacer uso de bioreceptores tales como anticuerpos o ácidos nucleicos. Estos ensayos pueden trabajar tanto en formato homogéneo como en heterogéneo.

En los ensayos en formato heterogéneo los analitos son reconocidos por elementos de captura específicos que están inmovilizados en un soporte sólido. Los soportes pueden actuar como transductor o como soporte inerte. De entre todos los tipos de inmovilización de moléculas, la covalente es la más interesante debido a su robustez.

En este trabajo final de grado se plantea la puesta a punto de un nuevo método de anclaje para anticuerpos basado en un tipo de reacciones conocidas como química-click. Para poder realizar este anclaje es necesaria la presencia de enlaces C-F en la superficie sólida. Este tipo de compuestos repelen muy bien la adsorción inespecífica de proteínas y materia orgánica y permiten la unión covalente de los anticuerpos a través de sus tioles libres mediante una reacción fotoinducida de sustitución nucleofílica de los F. Se intentará mejorar y optimizar las condiciones con respecto a las técnicas de anclaje estudiadas, para el uso en biosensado.

Para poder llevar a cabo esta reacción de inmovilización, los anticuerpos necesitan tener grupos tioles libres, por eso se van a reducir anticuerpos de forma selectiva empleando diferentes agentes reductores hasta encontrar el que trabaje de forma óptima. De este modo los tioles que normalmente están formando puentes disulfuro quedarán libres e interaccionarán con la superficie funcionalizada. Para la funcionalización del soporte sólido se han empleado técnicas de derivatización química con organosilanos.

En el trabajo se optimizan las condiciones usando albúmina de suero bovino y su anticuerpo como sistema modelo y posteriormente se aplica a una proteína de interés terapéutico como es la proteína C-reactiva. En este trabajo se ha elegido el formato de micromatriz con marcaje fluorescente ya que tiene una alta capacidad de trabajo y multiplexado.

Palabras clave: inmunoensayo, reacciones química-click, micromatriz, funcionalización de superficies, fotoinmovilización y biosensado.

Abstract

Having fast, sensitive and specific analysis tools is one of the demands of today's society. These tools find application not only in the clinical field, but also in quality control, and agri-food or environmental control, among others. A widely used strategy to specifically recognize the analyte is to make use of bioreceptors such as antibodies or nucleic acids. These tests can work in both homogeneous and heterogeneous formats.

In assays in heterogeneous format, analytes are recognized by specific capture elements that are immobilized on a solid support. The supports can act as a transducer or as an inert support. Among all types of immobilization methods of molecules, the covalent is the most interesting due to its robustness.

In this Bachelor's thesis, the development of a new anchoring method for antibodies based on a type of reactions known as chemical-click is proposed. In order to perform this anchoring, the presence of C-F bonds on the solid surface is necessary. This type of compounds very well repels the non-specific adsorption of proteins and organic matter and allow the covalent binding of the antibodies through their free thiols through a photoinduced reaction of nucleophilic substitution of the F. We will try to improve and to optimize the conditions comparing with the anchoring techniques studied so far, for use in biosensing.

In order to carry out this immobilization reaction, the antibodies need to have free thiol groups, that is why antibodies will be selectively reduced using different reducing agents until finding the one that works optimally. In this way the thiols that are normally forming disulfide bounds will be free and will interact with the functionalized surface. For the functionalization of the solid support, organosilane chemistry techniques have been used.

In this work, conditions are optimized by using bovine serum albumin and its antibody as a model system and subsequently applied to a protein of therapeutic interest such as C-reactive protein. We choose the microarray format with fluorescent marking since it has a high working capacity and multiplexing.

Keywords: immunoassay, click-chemistry reactions, microarray, surface functionalization, photo-immobilization and biosensing.

Alumno: Samuel Pepiol Salom
Valencia 08 de julio de 2019
Tutora: María José Bañuls Polo

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, **María José Bañuls**, por aceptarme en su equipo y por su ayuda, tiempo y dedicación en todo momento.

Quiero dar las gracias también a **Pilar Jiménez** por ser mi guía en el laboratorio, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por su paciencia y simpatía infinitas.

Finalmente, a los compañeros de la carrera y a los de siempre, familia y amigos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. <i>Microarrays</i>	1
1.1 Concepto de <i>microarray</i>	3
1.2 Ventajas y fortalezas del formato	3
2. Clasificación según el tipo de molécula sonda	3
2.1 <i>Microarrays</i> de anticuerpos	4
3. Clasificación según el material que constituye el soporte	5
3.1 Soportes poliméricos	5
3.2 Soportes inorgánicos	6
4. Clasificación según el método de inmovilización	8
4.1 Adsorción	8
4.2 Afinidad	9
4.3 Electrostática	9
4.4 Covalente	9
5. Reacciones química-click	11
6. Obtención y uso de medios anticuerpos (hlgG) para la fabricación del <i>microarray</i>	12
7. Proteína C reactiva	14
OBJETIVOS	17

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos	18
2. Instrumentación y software	18
3. Métodos	19
3.1 Purificación inmunoglobulina G (anti-BSA) mediante columnas de proteína A	19
3.2 Funcionalización superficie de vidrio	19
3.3 Reducción para la obtención de medio anticuerpo como sonda	19
3.4 Caracterización de los medios anticuerpos mediante electroforesis de proteínas	20
3.5 Impresión e inmovilización	21
3.6 Ensayo de reconocimiento de proteína BSA en formato <i>microarray</i>	21

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Resultados de la obtención y caracterización de medio anticuerpo	22
2. Funcionalización de los soportes de vidrio	25
3. Ensayos de reconocimiento de proteína en formato <i>microarray</i>	26

3.1 Optimización de las condiciones con el sistema modelo	
BSA/anti-BSA	26
3.2 Ensayo en proteína C-reactiva humana	27
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Tres categorías de microarrays proteicos. (a) Analíticos, centrados en la detección de proteínas, estas se pueden detectar mediante marcaje directo o usando un segundo anticuerpo en el formato sandwich. (b) Microarrays funcionales tienen aplicaciones en el estudio de las interacciones entre proteínas. (c) los arrays en fase reversa ofrecen un formato diferente mediante la inmovilización de diferentes muestras de lisado celular en el mismo chip. (Basada en Sumandy *et al.*, 2014)2

Figura 2: Vista de una reacción clásica de silano con la superficie7

Figura 3: Esquema del mecanismo de adsorción de proteínas a una superficie sólida (Zu, *et al.* 2003). Al ser una inmovilización aleatoria no todas las proteínas inmovilizadas tienen el sitio activo disponible8

Figura 4: Representación de dos modalidades de *spotting*. a) *contact spotting*, b) *non-contact spotting* (Schena *et al.*, 1998)10

Figura 5: Esquema de las reacciones típicas para reducir anticuerpos. Las enzimas parten los anticuerpos alrededor de los puentes disulfuro y estos fragmentos pueden reaccionar para ser inmovilizados. MEA, DTT y TCEP reducen los puentes disulfuro en ambas regiones: F_c y F_{ab} 13

Figura 6: Representación de la reducción del anticuerpo y generación de grupos tioles libres que interaccionarán con la superficie perfluorada14

Figura 7: Estructura de la proteína C-reactiva humana (CRP) (Protein Data Bank)15

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 8: Esquema de la reducción del anticuerpo empleando TCEP22

Figura 9: Equipo de electroforesis NuPAGE™ Bis-Tris Welcome pack, 4-12%, 12-well Invitrogen™.(THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2018)23

Figura 10: PAGE comparativa entre IgG y h-IgG24

Figura 11: a) ejemplo de medida del WCA de un grupo de chips funcionalizados con PFTS. b) fotografía de la gota de agua en contacto con la superficie de PFTS (Jiménez-Meneses *et al.*, 2018)25

Figura 12: Esquema de los *microarrays* empleados en BSA/anti-BSA. En la primera fila se imprime el anticuerpo completo y en las siguientes, los medios anticuerpos obtenidos con los distintos reductores a concentraciones diferentes26

Figura 13: Gráfica de barras donde se representa en el eje de abscisas la intensidad de fluorescencia frente a distintos reductores a distintas concentraciones	27
Figura 14: fotografías en cámara CCD de los chips irradiados durante 10 minutos a $\lambda = 254$ nm, incubados a distintas concentraciones de CRP	28-29
Figura 15: Fotografía en cámara CCD de chip mantenido en oscuridad (ensayo de adsorción). Incubación con CRP a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	29
Figura 16: Gráficas en las que se representa la intensidad de fluorescencia registrada en el ensayo con CRP a 3, 2, 1, 0,5, 0,1 y 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ irradiando 5 minutos a $\lambda = 254$ nm	30
Figura 17: representación de la intensidad de fluorescencia registrada para cada concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) empleando como sonda el anticuerpo completo anti-CRP	31
Figura 18: representación de la intensidad de fluorescencia registrada para cada concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) empleando como sonda el hIgG en concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	32

ÍNDICE DE TABLAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1: Pesos moleculares aproximados de las inmunoglobulinas G y sus fragmentos	23
--	----

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

Anti-BSA: anticuerpo anti-BSA

Anti-CRP: anticuerpo anti-CRP

ARN: ácido ribonucleico

BSA: albúmina de suero bovino

CRP: proteína C-reactiva

F_{ab}: en el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno

F_c: fragmento cristizable del anticuerpo

H: cadena pesada del anticuerpo

hIgG: media inmunoglobulina G

hsCRP: *highly-sensitive* CRP

IgG: inmunoglobulina G

L: cadena ligera del anticuerpo

MEA: mercaptoetilamina

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: tampón fosfato salino-*Tween*

PFTS: 1H,1H,2H,2H-perfluorodeciltrietoxisilano

S: sulfito de sodio

TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

UV: ultravioleta

WCA: *Water Contact Angle*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.MICROARRAYS

1.1 Concepto de *microarray*

La tecnología del *microarray* se basa en la miniaturización de miles de ensayos en un pequeño soporte. Este concepto se desarrolla a partir del llamado <<*ambient analyte immunoassay*>>, presentado por Roger Ekins en 1989 (Sutandy *et al.*, 2014).

El *microarray* o micromatriz se define como un soporte sobre el cual se anclan numerosas moléculas o fragmentos, generalmente de ADN o proteínas, siguiendo un patrón regular para uso en análisis bioquímico o genético.

Desde sus inicios el concepto evolucionó hasta los *microarrays* de ADN, una tecnología que determina el nivel de expresión de ARNm de miles de genes en paralelo. Pero estos *microarrays* de ADN poseen algunas limitaciones ya que los perfiles de ARNm no siempre están correlacionados con la expresión proteica.

Puesto que las proteínas son la fuerza principal en casi todos los procesos celulares, los *microarrays* de proteínas se desarrollaron como una herramienta de alto rendimiento para superar las limitaciones que presentan los *microarrays* de ADN y para ofrecer una plataforma directa para el análisis de las funciones de las proteínas.

Los inmunoensayos, que fueron los primeros tipos de *microarrays* de proteínas en aparecer, aprovechan el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo para crear un sistema de detección proteica. Y así, trasladar los inmunoensayos a un formato *microarray* de anticuerpos permite disponer de un sistema de detección múltiple y en paralelo utilizando una pequeña cantidad de muestra. Además, esta técnica tiene una alta sensibilidad y reproducibilidad en ensayos cuantitativos, lo que les hace ser muy útiles en el estudio de muestras biológicas complejas.

En términos generales, los *arrays* de proteínas se pueden clasificar en analíticos (o diana), funcionales y de fase reversa, y se muestran esquematizados en la figura 1.

Como ya se ha comentado, el modelo más representativo de los *microarrays* proteicos analíticos es el *array* de anticuerpos. En este formato, se inmovilizan anticuerpos de captura específicos sobre el soporte sólido y las proteínas diana son detectadas tras la captura del anticuerpo, bien usando marcaje directo o mediante un formato sándwich, empleando anticuerpos de detección marcados. En este trabajo el estudio se realizará empleando este tipo de *array*.

La construcción de los *microarrays* funcionales se basa en el uso de proteínas purificadas individuales que permiten el estudio de varias de sus propiedades bioquímicas como la actividad de acoplamiento, ya sea proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-lípido o proteína-fármaco, y relaciones enzima-sustrato mediante varios tipos de reacciones bioquímicas.

Empleando el formato contrario de los *microarrays* de proteínas, los *microarrays* en fase reversa expanden las aplicaciones de esta tecnología. Los *microarrays* de proteínas en fase reversa inmovilizan en el soporte lisados celulares o suero y se identifican las proteínas de interés mediante reconocimiento con un anticuerpo específico. Se usan mayoritariamente en ensayos clínicos, especialmente en el campo del estudio del cáncer así como en el estudio de biomarcadores.

En la figura 1 se muestra un esquema de estas tres categorías (Sutandy *et al.*, 2014).

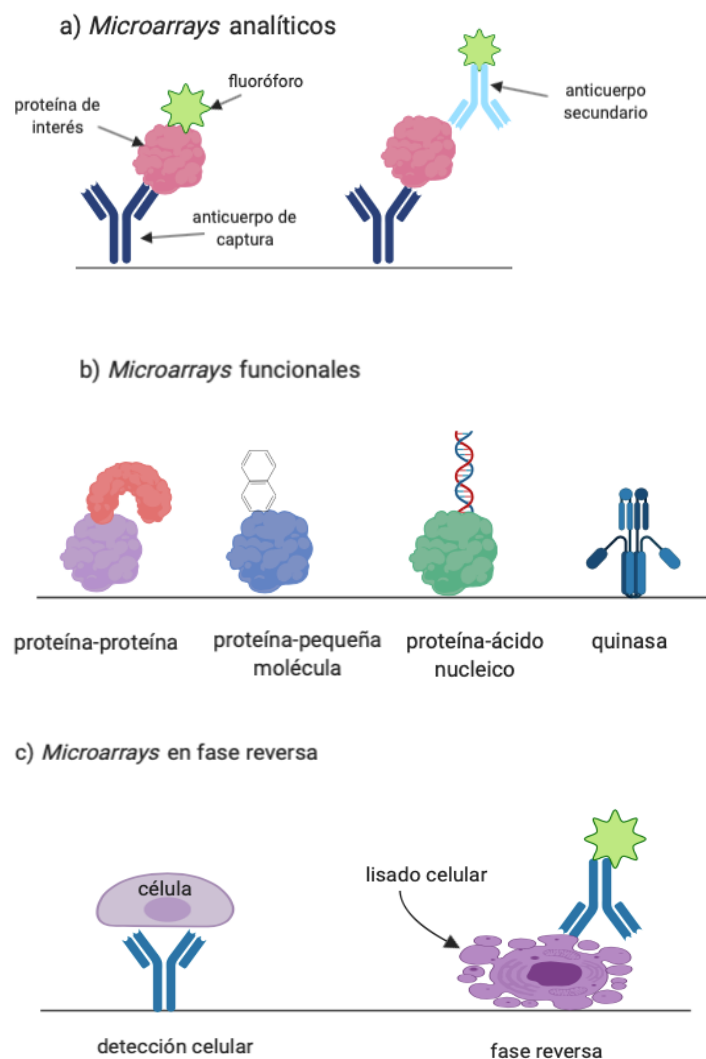


Figura 1: Tres categorías de microarrays proteicos. (a) Analíticos, centrados en la detección de proteínas, estas se pueden detectar mediante marcaje directo o usando un segundo anticuerpo en el formato sandwich. (b) Microarrays funcionales tienen aplicaciones en el estudio de las interacciones entre proteínas. (c) los arrays en fase reversa ofrecen un formato diferente mediante la inmovilización de diferentes muestras de lisado celular en el mismo chip. (Basada en Sumandy *et al.*, 2014)

Los *microarrays* se postulan como una de las herramientas más potentes para afrontar los desafíos en diagnóstico clínico, que requieren la obtención masiva de información en poco tiempo y al menor coste posible (Hall *et al.*, 2007)

1.2 Ventajas y fortalezas del formato

Los microchips de proteínas permiten estudiar, identificar y cuantificar las proteínas directamente. Una vez optimizados son capaces de determinar muchas proteínas en un amplio rango de concentraciones.

El multiplexado o la determinación simultánea de varios analitos en un único experimento permite analizar miles de proteínas en un solo chip en el mismo tiempo que un marcador proteico individual analiza un solo tipo. La miniaturización permite que utilizando una pequeña cantidad de muestra y de moléculas sensoras se obtenga información con mayor grado de sensibilidad que otros métodos como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Además los *microarrays* nos aportan información cuantitativa ya que la intensidad de la señal va a ser proporcional a la cantidad de proteína activa. También que sea un método rápido y automatizable supone una ventaja con respecto a otros formatos.

2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL TIPO DE MOLÉCULA SONDA

Basado en el tipo de molécula empleado para la captura del analito, que se denomina molécula sonda, existen diversos tipos de *microarray*.

Los *microarrays* de ADN miden cantidades de ADN o usan ADN como parte del sistema de detección. Existen cuatro tipos diferentes de *microarrays* de ADN: *microarrays* de ADNc, de oligos, de BAC (*bacterial artificial chromosome*) y de SNP (*single nucleotides polymorphisms*) (News Medical Life Sciences, Types of Microarray, 2019).

Los *microarrays* de proteínas actúan como plataforma para la caracterización de un gran número de proteínas de forma paralela, como se ha explicado anteriormente existen tres tipos de *arrays* de proteínas: analíticos, funcionales y en fase reversa. Los primeros *arrays* de proteínas surgieron por la necesidad de estudiar los mecanismos de modificaciones post-traduccionales que llevan a diferencias en células que tienen los mismos niveles de transcripción de determinados genes, las *micromatrices* de proteínas se caracterizan por ser heterogéneas, existiendo gran variedad de tipos para abordar la gran diversidad del proteoma (Hall *et al.*, 2007).

La producción de *arrays* de proteínas se enfrenta a grandes retos como la adquisición y unión estable de las mismas a la superficie. Es un campo prometedor ya que permite la criba de moléculas a gran escala y además reduce la cantidad de reactivos necesarios para el análisis de estas, que finalmente lleva a una reducción de los costes (Angenendt *et al.*, 2003)

Los *microarrays* de péptidos se usan para análisis detallado u optimización de interacciones proteína-proteína y ayudan en el reconocimiento de anticuerpo mediante *screening* de proteomas.

También existen los *microarrays* de tejido, estos son utilizados principalmente en patología. Están formados por varios bloques de tejido de varios donantes embebidos en una única matriz.

Los *microarrays* celulares se utilizan para *screening* de librerías químicas y genómicas y para investigar el microambiente celular.

En el ámbito del descubrimiento de fármacos se usan las micromatrices para hacer cribado de compuestos químicos con actividad farmacológica, esta tecnología tiene la capacidad de identificar y evaluar pequeñas moléculas con alta capacidad de trabajo, lo que le hace más útil que otras tecnologías utilizadas en la industria farmacéutica. En el desarrollo de fármacos también se utilizan los *microarrays* de fenotipo, estos miden cuantitativamente miles de fenotipos celulares de forma simultánea, también son usados en genómica funcional y pruebas toxicológicas.

Finalmente, los *arrays* de carbohidratos o *glycoarrays* se utilizan en cribado de proteomas, también son útiles para determinar el valor de la constante de afinidad de unión de proteínas y en la automatización del proceso de síntesis de glicanos sobre soporte sólido. (News Medical Life Sciences, Types of Microarray, 2019)

2.1 *Microarrays* de anticuerpos

Los *microarrays* basados en anticuerpos son una herramienta que permite generar perfiles de expresión de conjuntos de proteínas en muestras complejas, así como retratos en alta resolución de proteomas completos de forma rápida y detallada. Los *micro* y *nanoarrays* se pueden imprimir con varios anticuerpos para diferentes especificidades.

Este tipo de micromatrices permiten el multiplexado y la realización de ensayos ultrasensibles para diferentes analitos en un único experimento y además empleando pequeñas cantidades de la muestra. Las imágenes generadas de los *arrays* se pueden interpretar para estudiar perfiles de expresión o mapas que revelan la composición de la muestra. Esto convierte a los *microarrays* de anticuerpos en una herramienta muy potente en proteómica para el estudio de enfermedades proteómicas, descubrimiento de biomarcadores, diagnóstico de enfermedades y estratificación de pacientes. (Wingren *et al.*, 2019)

El potencial de los *microarrays* de anticuerpos se ve reflejado en áreas como la investigación en cáncer, la caracterización de los anticuerpos propios o de rutas de señalización.

Por ejemplo, Lin *et al.* realizaron un estudio de caracterización de la secreción de citocinas para cuantificar citocinas humanas, quimiocinas, factores de crecimiento y angiogénicos así como proteasas en células con y sin receptor de estrógenos.

En la investigación de la respuesta de anticuerpos antivirales en ensayos de la vacuna con el virus de la inmunodeficiencia en simios y humanos SHIV, Neuman de Vegvar *et al.* desarrollaron un modelo para humanos creando *microarrays* de antígenos con 430 proteínas y péptidos diferentes que cubrían todo el proteoma del SHIV e identificaron ocho epítomos

inmunodominantes. Por otro lado, Xu *et al.* estudiaron factores reguladores de la apoptosis de células neurales infectadas por macrófagos también mediante el uso de *arrays* de anticuerpos (Phillip Angenendt, 2005).

Este tipo de *arrays* tienen muchas aplicaciones en la investigación en cáncer. Los métodos se han demostrado en varios tipos de muestra como suero, plasma, sobrenadantes de cultivos celulares, lisados de tejidos y muestras de tumores. Las aplicaciones en la investigación del cáncer incluyen la caracterización de proteínas para identificar biomarcadores candidatos, caracterizar rutas de señalización y medir los cambios en las modificaciones o niveles de expresión de proteínas relacionadas con el cáncer. (Biran B.Haab, 2005)

En este trabajo se ha estudiado la inmunodetección de dos proteínas, primeramente la BSA (Albúmina de suero Bovino), que se ha empleado como sistema modelo para la optimización de los procesos de reducción selectiva, anclaje y bioreconocimiento, y finalmente la proteína C-reactiva humana, como ejemplo de biomarcador de interés clínico. El hecho de que existan anticuerpos anti-BSA y anti-CRP disponibles en casas comerciales presenta una ventaja para el estudio de la interacción con las proteínas.

3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MATERIAL QUE CONSTITUYE EL SOPORTE

3.1 Soportes poliméricos

Aunque la mayoría de los soportes en formato *microarray* son de naturaleza inorgánica, existe también interés en desarrollar micromatrices con soportes poliméricos que posean un alto ratio de intensidad de señal frente al fondo. Los soportes de naturaleza polimérica han sido utilizados en detección de ácidos nucleicos. Por ejemplo, ensayos para la detección de patógenos microbianos que se basan en la detección de su material genético mediante hibridación de ADN en una micromatriz. Para ello se han creado superficies de plástico compuestas por materiales como PMMA [*poly(methylmethacrylate)*]-VSUVT o Zeonor 1060R, que presentan ciertas mejoras con respecto a las superficies de plástico empleadas con anterioridad. (Zhao *et al.*, 2018)

Los sistemas microfluídicos de plástico son un tipo de tecnología prometedora para la miniaturización y la producción en masa de instrumental médico de diagnóstico. Este tipo de instrumental se puede usar para reemplazar o implementar nuevos ensayos para la detección específica de ácidos nucleicos, proteínas o anticuerpos. (Zhao *et al.*, 2018).

Por otra parte, otro tipo de soporte polimérico interesante en formato micromatriz son los discos compactos. Los discos estándares incorporados en ordenadores personales pueden ser usados como dispositivos ópticos de lectura compactos y asequibles. La tecnología de CD derivada de la industria audiovisual ha sido usada para desarrollar aplicaciones analíticas en el área de la salud, medioambiente, seguridad alimentaria y control de calidad por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este TFG (Morais *et al.*, 2016).

Los discos Blu-Ray proporcionan también una superficie adecuada para crear *microarrays* de alta densidad. En estos casos el disco se utiliza como plataforma de ensayo y como detector se emplea un lector de CD convencional (Sancho-Fornes *et al.*, 2019).

Los *microarrays* poliméricos son utilizados también en estudios de adhesión celular. Los polímeros son esenciales en el campo de los biomateriales y son utilizados en multitud de aplicaciones. El mecanismo de anclaje de células en cultivo a superficies poliméricas está muy estudiado y es ampliamente aceptado que, en los primeros estadíos, en este proceso existe la adsorción de proteínas de la matriz extracelular en la superficie del polímero, las células interactúan de forma indirecta con el polímero a través de las proteínas adsorbidas que controlan gran variedad de procesos celulares como adhesión, crecimiento y diferenciación. Los métodos tradicionales de síntesis, identificación y testeo de nuevos polímeros son lentos por lo que en los últimos años se han desarrollado métodos de síntesis automatizada y en paralelo de polímeros (Tourniaire *et al.*, 2006).

3.2 Soportes Inorgánicos

Dentro de los materiales inorgánicos, los basados en silicio se utilizan ampliamente como plataformas de biosensado por sus propiedades favorables como la posibilidad de ser funcionalizados químicamente de forma fácil y versátil mediante la química de los organosilanos, su biocompatibilidad y, en el caso del vidrio, su coste y sus buenas propiedades ópticas, como transparencia y baja autofluorescencia, además de la posibilidad de ser producidos en masa, hacen que sea un material óptimo para ser usado como plataforma para la creación de micromatrices (Escorihuela *et al.*, 2014). Por eso, se ha escogido como soporte en este trabajo.

Para poder llevar a cabo el anclaje de la molécula sonda específica se requiere una modificación química de la superficie inorgánica. El proceso de modificación se denomina funcionalización de la superficie.

Así, la funcionalización en soportes sólidos se basa en la interacción del soporte con un compuesto que va a proporcionar enlaces químicos que permitirán la posterior interacción con la molécula sonda. Estos tipos de reactivos de funcionalización son mayoritariamente organosilanos. El papel del organosilano es clave, pero también se ha de tener en cuenta la densidad de grupos hidroxilo libres que haya en la superficie con los que tiene que condensar el organosilano para quedarse fijado en la superficie de forma adecuada (Dietrich, *et al.* 2015), es por ello que se va a realizar una previa activación del soporte mediante irradiación.

En el caso de soportes en base silicio como el vidrio, la funcionalización de las superficies se lleva a cabo mayoritariamente mediante la interacción covalente entre los organosilanos empleados y los grupos silanol de la superficie.

Esta reacción es una condensación entre los grupos siloxanos del organosilano y los grupos hidroxilo presentes en la superficie del vidrio que se han generado tras la activación mediante radiación UV. Como se ha indicado antes, es muy importante la densidad de grupos OH en la superficie para que se genere una capa orgánica de calidad adecuada. (Rong *et al.* 2008)

Los alquilsilanos (silanos) han sido usados para funcionalizar una gran variedad de superficies, incluyendo óxidos de silicio, aluminio y titanio. Se usan actualmente en multitud de aplicaciones incluso a escala industrial. Los silanos reaccionan con las superficies a través de los grupos hidroxilo para formar un enlace fuerte que incluye enlace covalente y fuerzas de Van der Waals. (ETH Zürich, Surface Science and Technology)

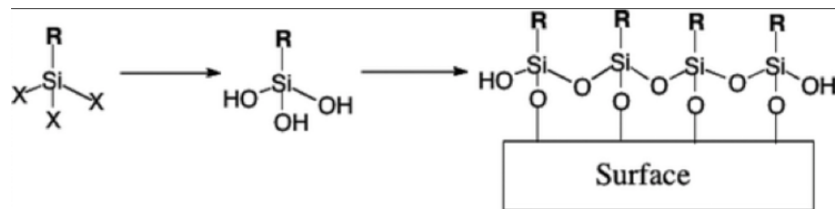


Figura 2: Vista de una reacción clásica de silano con la superficie.

Las moléculas del silano empleado en cada caso van a interactuar de forma bidireccional, al tener dos grupos reactivos, habrá una terminación que servirá de unión al soporte y otra que va a interactuar con la molécula sonda de interés.

En este trabajo se ha empleado 1H,1H,2H,2H-perfluorodiecil-trietoxisilano, un organosilano con enlaces C-F que reaccionarán con los medios anticuerpos que servirán como sonda.

Las proteínas son muy difíciles de inmovilizar covalentemente manteniendo su bioactividad, debido a su complejidad estructural y a la presencia de varios grupos activos.

Previamente a la silanización se realiza un proceso de activación del soporte para aumentar el número de grupos hidroxilos en la superficie, que son los que reaccionarán con el organosilano. Esta activación se puede realizar de diferentes maneras, como tratamiento con solución piraña, con mezcla crómica o utilizando otro tipo de aproximaciones como tratamiento por plasma de oxígeno o con ozono.

Los mejores procedimientos de activación son aquellos que no alteran la topología de las superficies y que eliminan por completo las contaminaciones para exponer una alta densidad de grupos hidroxilo al electrolito. En la literatura hay descritos una gran variedad de protocolos para activación mediante el uso de limpiadores de superficie de ozono. (Han *et al.*, 2006)

En nuestro caso, para tratar el material, primeramente, se van a generar radicales hidroxilo libres en la superficie mediante la irradiación con luz ultravioleta en un limpiador de superficies de ozono (UVOH-cleaner) y posteriormente, mediante el uso de un organosilano adecuado, se va a dotar a la superficie de los enlaces C-F que van a permitir en anclaje covalente de la molécula sonda.

4. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN

4.1 Adsorción

La adsorción de proteínas a superficies sólidas ha permitido el desarrollo de diversas aplicaciones biomédicas como biosensores o tests inmunológicos (Vladmir Hlady and Jos Buijs, 1996)

Existen muchos parámetros que van a condicionar la adsorción de proteínas a una superficie sólida.

Los parámetros externos son: temperatura, pH, fuerza iónica y composición del tampón. Estos parámetros serán óptimos cuando estén en condiciones fisiológicas, pero muchos estudios experimentales se llevan a cabo en condiciones arbitrarias.

Las proteínas son biopolímeros complejos que como unidades monoméricas poseen 20 aminoácidos diferentes más posibles cadenas laterales como fosfatos, oligosacáridos o lípidos. Esta gran diversidad de elementos básicos provoca una enorme complejidad estructural y funcional de las proteínas, que hace que no se pueda hipotetizar sobre su comportamiento de adsorción de forma fácil.

La interacción proteína-superficie está influenciada por una parte por las propiedades de la proteína y también por las de la superficie. Existen parámetros de la superficie importantes a tener en cuenta como la polaridad, la energía de superficie y la morfología. (Rabe *et al*, 2011). Si en el caso de los biomateriales lo que se busca es dotar a las superficies de propiedades antiadherentes, cuando se trata de inmovilización se busca justo lo contrario. Entre las ventajas de este tipo de inmovilización destaca su sencillez y la aplicación directa sobre la mayoría de las superficies sin necesidad de modificarlas. Sin embargo, es una inmovilización difícil de controlar, las proteínas se fijan a la superficie de manera aleatoria y no orientada y además el enlace carece de la robustez suficiente para garantizar que no se pierde receptor con los distintos ciclos de lavado. La falta de orientación en la proteína inmovilizada hace que no todas estén bioidisponibles (figura 3).

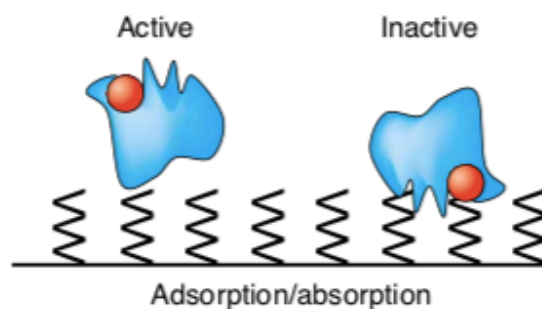


Figura 3: Esquema del mecanismo de adsorción de proteínas a una superficie sólida (Zu, *et al*. 2003). Al ser una inmovilización aleatoria no todas las proteínas inmovilizadas tienen el sitio activo disponible.

4.2 Afinidad

Una estrategia es crear enlaces basados en (bio)afinidad entre el soporte activado y un grupo específico de la secuencia de la proteína. Este método permite controlar la orientación de la biomolécula para evitar la inactivación del enzima y/o el bloqueo del sitio activo (Sassolas *et al.*, 2012). Los casos más habituales es marcar la proteína con una o varias biotinas o bien con una cola de histidinas. Sin embargo, existen aproximaciones en las que la proteína no está marcada, como por ejemplo las estrategias de inmovilización de anticuerpos a través de proteína A, que son empleadas también en estudios de inmunología (Kessler *et al.*, 1975) o proteína G, técnica empleada mayoritariamente en soportes de ADN (Rosi *et al.* 2005)

Se controla la orientación y se mantiene la estructura nativa de la proteína. Es un tipo de interacción reversible, orientada y selectiva que resulta muy versátil. Por otro lado, la necesidad de realizar un marcaje de la proteína a inmovilizar puede complicar su aplicación.

4.3 Electrostática

Se puede llevar a cabo si la superficie del soporte contiene grupos con carga positiva o negativa que enlazan con iones de la carga opuesta presentes en la molécula sonda. Los soportes más empleados para poder llevar a cabo este tipo de interacciones son vidrios y resinas intercambiadoras de tipo estireno-divinilbenceno o con grupos iónicos sustituibles. Uno de los primeros *microarrays* comerciales para ácidos nucleicos utilizaba este tipo de interacción, mediante la modificación del soporte de vidrio con poli-lisina.

Este método de inmovilización se usa sobre todo para oligonucleótidos. El material de la superficie ya sea metálico o dieléctrico y las condiciones electrostáticas de la misma son muy importantes porque van a determinar el rendimiento de la hibridación de moléculas como ácidos nucleicos a la superficie. (Vainrub *et al.* 2002)

4.4 Covalente

El uso del enlace covalente para inmovilizar moléculas supone ventajas con respecto al resto de técnicas. La inmovilización óptima requiere que haya una gran cantidad de anticuerpos activos en la superficie. La inmovilización de anticuerpos mediante simple adsorción física puede causar problemas en la estabilidad, por eso se prefiere el enlace covalente. Este tipo de enlace se consigue derivatizando las superficies como se ha comentado con anterioridad (Das *et al.*, 2010)

La modificación de superficies mediante la unión covalente de monocapas de bioreceptor ha sido muy estudiada. Este tipo de inmovilización se prefiere para evitar problemas de orientación aleatoria, falta de reproducibilidad, largos tiempos de incubación y el riesgo de plegamiento o desorción cuando de adsorbe el receptor.

Algunas de las estrategias que se han utilizado para la inmovilización covalente en superficies serían por ejemplo el uso de organosilanos con grupos NH_2 como el APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) o ATPMS (3-aminopropyltrimethoxysilane). Por otro lado, también se emplean glididoxi organosilanos, la química de los grupos epoxi es una alternativa para la inmovilización de biomoléculas debido a su estabilidad en medio acuoso y su reactividad con varios nucleófilos. Las superficies se cubren mediante una interacción de tipo covalente con GOPTS (3-glycidoxypropyltrimethoxysilane) que se puede emplear para anclar covalentemente anticuerpos y oligonucleótidos a través de sus grupos con carácter nucleofílico, principalmente aminas primarias.

Los organosilanos con grupos carboxilo han sido también muy utilizados para la conjugación con moléculas que contienen grupos amina, así como los organosilanos conteniendo un grupo isocianato que reacciona con las aminas primarias de la sonda bioreceptora dando lugar a un enlace tiourea. (Bañuls *et al.*, 2013)

Dentro de las uniones covalentes, en este trabajo resultan de especial interés las reacciones de fotoinmovilización.

Las reacciones de fotoinmovilización utilizan la luz para generar especies más reactivas por la formación de radicales libres que según su naturaleza van a dar lugar a un tipo de reacción distinto. Esto permite inmovilizar de forma covalente varios tipos de moléculas orgánicas y células en un chip (Ito, 2006).

En este trabajo se emplea una lámpara ultravioleta que irradia a una longitud de onda de 254 nm, mediante la cual se consigue catalizar la unión de determinados fragmentos de anticuerpo a la superficie haciendo uso de una reacción de química click, que será comentada en detalle más adelante.

Para la inmovilización de la sonda también hay que tener en cuenta la forma en que se imprime la disolución que contiene la molécula sonda. Básicamente, se usan dos tipos de estrategia, *pin spotting* y *microstamping*.

El *pin spotting* consiste en la dispensación de las disoluciones en microgotas para que las sondas se anclen en un spot de la superficie. En cambio, el *microstamping* transfiere la disolución mediante contacto empleando elastómeros.

En este trabajo la técnica empleada para imprimir es *pin spotting* sin contacto.

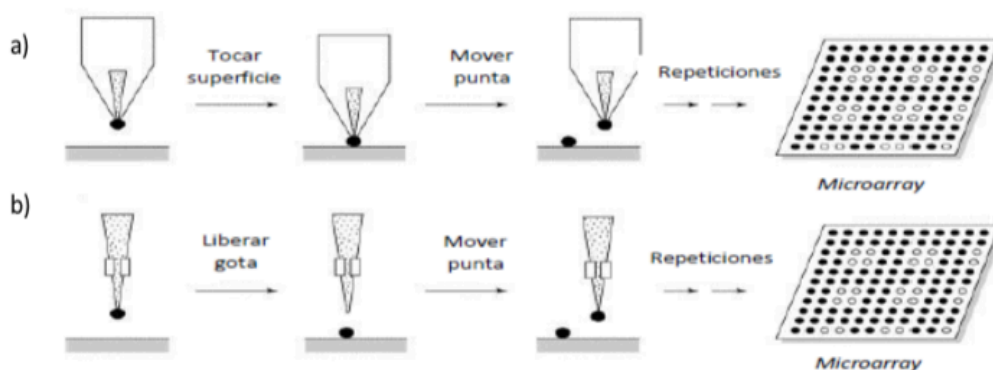


Figura 4: Representación de dos modalidades de *spotting*. a) *contact spotting*, b) *non-contact spotting* (Schena *et al.*, 1998)

5. REACCIONES QUÍMICA-CLICK

El término de química click fue acuñado por primera vez por Sharpless y colaboradores en 2001 (Angewandte Chemie International Edition, 2001). Lo definieron como un conjunto de reacciones, que ya eran conocidas, y que presentaban una serie de características comunes muy interesantes para ser utilizadas como un conjunto de bloques selectivos y modulares que trabajan bien en aplicaciones a pequeña y gran escala.

Los criterios que ha de cumplir un proceso para ser útil en este contexto son los siguientes: la reacción ha de ser modular, de alto rendimiento y amplia en alcance, generar solo derivados inofensivos que se puedan eliminar mediante métodos no cromatográficos, y ser estereoespecífica (pero no necesariamente enantioselectiva). Las características del proceso incluyen condiciones de reacción simples (idealmente el proceso ha de ser insensible a oxígeno y agua), agentes iniciales disponibles ya preparados, la no utilización de solvente, o de uno que sea benigno (como el agua) o fácil de eliminar, y un aislamiento simple del producto. Si se requiere purificación, ha de ser mediante métodos no cromatográficos como destilación o cristalización y los productos deben ser estables en condiciones fisiológicas.

Las reacciones click adquieren sus características porque tienen una alta energía termodinámica de activación que suele ser mayor de 20 kcal mol^{-1} . Los procesos se completan de forma rápida y tienden a ser muy selectivos para un único producto.

Entre las reacciones catalogadas como de química click incluyen los siguientes tipos de transformaciones químicas:

- Cicloadiciones de compuestos insaturados y transformaciones del tipo Diels-Alder.
- Sustitución nucleofílica
- Química del carbonilo de tipo no-aldol
- Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono, así como adiciones de Michael de reactivos Nu-H. (Hartmuth *et al.*, 2001)

La reacción de acoplamiento tiol-eno (TEC) cumple con todos los requisitos de una reacción click. Es muy efectiva, trabaja en altos rendimientos y no genera productos secundarios. La reacción TEC es normalmente inducida por radiación UV, que genera un radical de tipo tiol que reacciona con un doble enlace carbono-carbono y que resulta en un tioéter. Esta reacción es tolerante a gran cantidad de grupos funcionales y es ortogonal, también se puede llevar a cabo en medio acuoso, lo que le permite ser usada para biomoléculas.

Todas estas características hacen de la reacción TEC una metodología muy interesante para la inmovilización covalente de biomoléculas en formato *microarray* para su uso como biosensores. Liu *et al.* han empleado la reacción TEC para una estrategia de bioconjugación mediante nanopartículas coloidales. Han demostrado la aplicabilidad con compuestos orgánicos tiolafos, aptámeros y enzimas (HRP) pero no en anticuerpos.

Otro tipo de reacción con características química-click es la *Thiol-yne coupling* (TYC), con aplicaciones en polimerización para crear materiales sintéticos (Lowe *et al.*, 2010). Esta reacción también está estudiada para la impresión fotoquímica en superficies de vidrio

(Wendeln *et al.*, 2010) y también ha sido aplicada con éxito en nuestro grupo de investigación para la fabricación de *microarrays* de ácidos nucleicos (Escorihuela *et al.*, 2014).

En previos estudios de nuestro grupo de investigación, la inmovilización de ácidos nucleicos mediante las reacciones TEC y TYC ha sido estudiada (Bañuls *et al.*, 2017)

La inmovilización de inmunoglobulinas G es clave en el desarrollo de dispositivos de sensado para detectar analitos como proteínas o fármacos, la reacción TEC se ha estudiado también para crear micromatrices de anticuerpos usando medios anticuerpos como molécula de captura (Alonso *et al.*, 2018).

En este trabajo se va a explorar un nuevo tipo de reacción con características de química-click. Vamos a utilizar una superficie perfluorada que dispondrá de enlaces C-F que reaccionarán con el grupo tiol del medio anticuerpo.

Para ello nos hemos basado en los resultados previos del grupo de investigación (Jiménez-Meneses *et al.*, 2018) que empleaba esta nueva técnica de biofuncionalización para generar *microarrays* ácidos nucleicos. En este estudio se demuestra por primera vez la reacción mediante enlace covalente fluor-tiol directamente sobre una superficie perfluorada. Este método permite a las sondas unirse a un grupo tiol para ser ancladas al enlace C-F de superficies muy hidrofóbicas de forma rápida y limpia.

Esta nueva superficie favorece la aproximación selectiva de la solución solo en el punto donde la sonda está anclada ya que es la zona más hidrofílica de la superficie. Este hecho minimiza la señal de fondo y las uniones no específicas. (Jiménez-Meneses *et al.*, 2018). Para la funcionalización se usa concretamente el organosilano 1H,1H,2H,2H-perflorodeciltrietoxisilano (PFTS).

Debido a los buenos resultados que dio este tipo de superficies en el estudio para el anclaje de ácidos nucleicos, en este trabajo se decidió emplear la misma técnica para funcionalizar la superficie, pero en este caso estudiar su aplicabilidad y prestaciones en la inmovilización de anticuerpos.

6. OBTENCIÓN Y USO DE MEDIOS ANTICUERPOS (hIgG) PARA LA FABRICACIÓN DEL MICROARRAY

Los anticuerpos son comúnmente utilizados como moléculas de reconocimiento en biosensado y para ello tienen que ser inmovilizados en la superficie del sensor.

Constan de dos cadenas de aminoácidos pesadas y dos ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro de residuos del aminoácido cisteína. La reducción de dichos puentes disulfuro divide al anticuerpo en dos partes iguales (half IgG, hIgG), cada una con grupos tiol libres.

La inmovilización de anticuerpos reducidos (hIgG) ayuda a conseguir una mejor orientación de las regiones que interaccionan con el antígeno F_{ab} ya que los grupos tiol estarán lejos de estas regiones F_{ab} , esta orientación adecuada va a mejorar la sensibilidad del dispositivo.

Existen diversos métodos para reducir anticuerpos. Tradicionalmente se han usado enzimas como pepsina o papaína. Se ha demostrado que otros agentes reductores como MEA (2-mercaptoetanol), DTT (ditiotreitól) o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) reducen los puentes disulfuro tanto en las regiones F_c como F_{ab} .

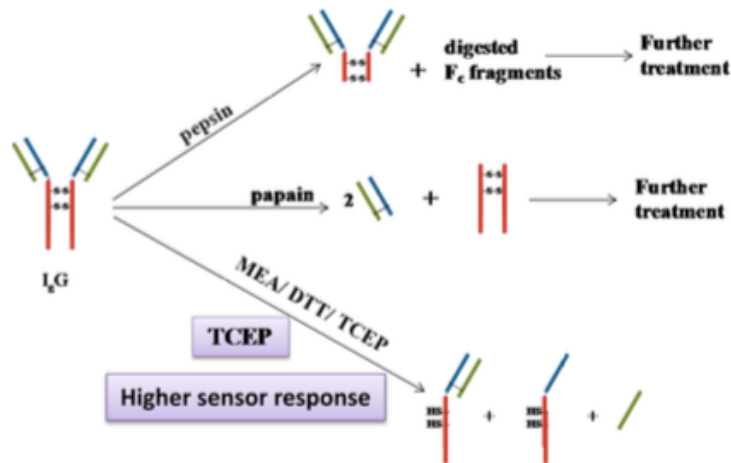


Figura 5: Esquema de las reacciones típicas para reducir anticuerpos. Las enzimas parten los anticuerpos alrededor de los puentes disulfuro y estos fragmentos pueden reaccionar para ser inmovilizados. MEA, DTT y TCEP reducen los puentes disulfuro en ambas regiones: F_c y F_{ab} .

En este trabajo se plantea una reducción selectiva de los anticuerpos mediante la reducción de los puentes disulfuro de la región bisagra. De este modo se van a generar grupos tiol libres que van a permitir la reacción de inmovilización de los medios anticuerpos al interaccionar estos grupos tioles con la superficie perfluorada de este modo, como se ha explicado anteriormente, se espera mejorar la sensibilidad y selectividad con respecto a las inmovilizaciones de anticuerpos completos.

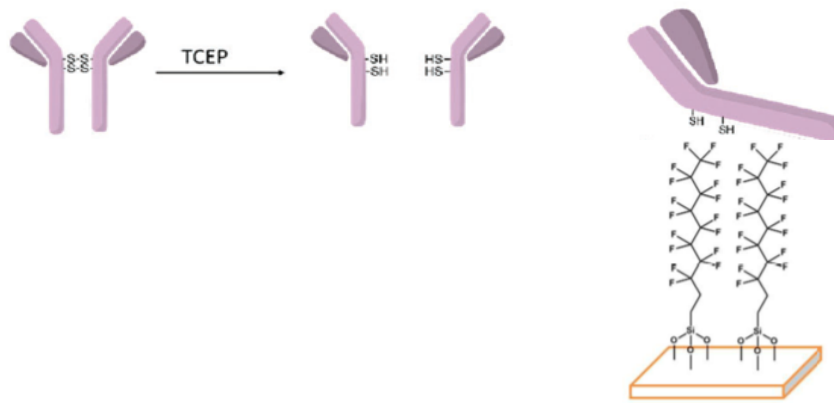


Figura 6: Representación de la reducción del anticuerpo y generación de grupos tioles libres que interactuarán con la superficie perfluorada.

Las inmunoglobulinas (IgG) se han de reducir de forma selectiva en su región bisagra para así obtener sus dos mitades (hIgG), para ello se necesita un agente reductor apropiado.

Se ha demostrado que empleando agentes reductores como la mercaptoetilamina (MEA) ocurre una sobre-reducción y se rompen puentes disulfuro adicionales entre las cadenas ligeras y pesadas, lo que conlleva a una pérdida de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo. En este trabajo se elige probar tres distintos reductores para encontrar el que ofrece mejores prestaciones, concretamente se prueban TCEP, MEA y S (Na_2SO_3).

En previos estudios se ha demostrado que el agente TCEP presenta ciertas ventajas (Alonso *et al.*, 2018). Este reductor no contiene tioles libres en su estructura, lo que hace que sea incapaz de interferir ni alterar la estructura de los madios anticuerpos, así como tampoco puede competir por los sitios de unión a la superficie del chip (Sharma, *et al.* 2013)

7.PROTEÍNA C-REACTIVA

La proteína C-reactiva (o CRP) es una proteína plasmática circulante que es producida por el hígado y que sus niveles aumentan durante la fase aguda de la inflamación.

La CRP consiste en una estructura cíclica pentamérica con una masa molecular de 125 kD. Está codificada en el cromosoma 1 y no está glicosilada.

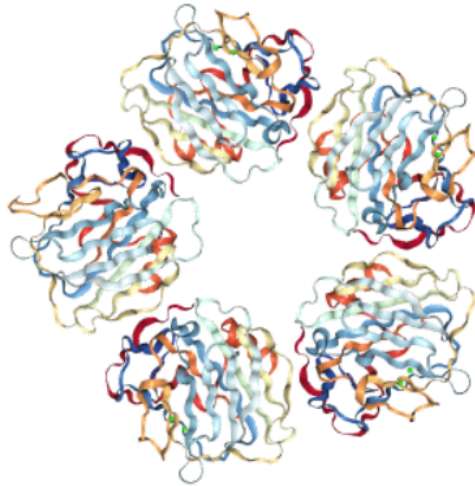


Figura 7: Estructura de la proteína C-reactiva humana (CRP) (Protein Data Bank).

La CRP tiene un papel fundamental en la respuesta inmunológica ya que su papel fisiológico es unirse a la fosfocolina que se expresa en células dañadas y en algunas bacterias para activar el sistema del complemento mediante la vía independiente de anticuerpo.

Cuando se activa el complemento, éste opsoniza las células dianas para fagocitosis y mata directamente patógenos mediante inserciones del complejo de ataque de la membrana (CAM) al interior de las membranas celulares, pero el CAM se inserta también dentro de sus células huésped causando un proceso de autodestrucción.

Durante la fase aguda de la inflamación, los niveles de CRP en el plasma se pueden ver aumentados hasta 10.000 veces. Estas características hacen que la proteína C-reactiva sea considerada un biomarcador de interés para estudiar la inflamación.

Existe una correlación entre los altos niveles de marcadores de inflamación como la CRP y el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas. En estudios se ha comprobado que en pacientes que han tenido problemas cardiovasculares, los niveles de estos marcadores son más elevados, concluyendo que los marcadores de inflamación son predictores importantes de eventos cardiovasculares. La CRP junto con otros marcadores inflamatorios tienen valor predictivo en personas con angina inestables o síndromes coronarios agudos. Hs-CRP es el predictor más fuerte de riesgo de futuros problemas cardiovasculares. (Ridker *et al.*, 2000)

La CRP está implicada también en la respuesta inmunitaria innata del cerebro. Esta respuesta inmunitaria, aunque su principal función sea proteger al huésped, puede ser destructiva para los tejidos cuando no está bien dirigida, la CRP como proteína iniciadora del complemento

puede ser un importante iniciador de la respuesta inflamatoria autodestructiva, por ello es considerada de interés terapéutico para el estudio de enfermedades como el Alzheimer (Yasojima *et al.*, 2000)

En este TFG se ha planteado la puesta a punto de un *microarray* para la detección de CRP. El proceso de optimización de los distintos parámetros se ha realizado empleando el sistema modelo *bovine serum albumin* (BSA) - antiBSA ya que es un sistema muy estudiado del que se pueden encontrar numerosos datos y el grupo de investigación tiene mucha experiencia trabajando con él.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este Trabajo de Fin de Grado se plantea a la puesta a punto de un sistema de fotoinmovilización para anclar medios anticuerpos de forma orientada y efectiva a un soporte sólido de vidrio, y su aplicación a una proteína de interés clínico para fines de biosensado.

Para llegar al objetivo final del trabajo, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- 1 Reducción de las inmunoglobulinas G para obtener los medios anticuerpos (hIgG).
- 2 Funcionalización de la superficie de vidrio con enlaces C-F que permitan el anclaje de los medios anticuerpos ella través de sus tioles libres.
- 3 Análisis de la capacidad de bioreconocimiento de los fragmentos de anticuerpo inmovilizados.
- 4 Análisis de los datos obtenidos y aplicación para el reconocimiento de CRP.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

El trietoxivinilsilano, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), la albúmina de suero bovino (BSA), la proteína C-reactiva humana (CRP) y el anticuerpo policlonal contra BSA producido en conejo (IgG α BSA) se adquirieron de Sigma Aldrich.

El anticuerpo monoclonal contra la proteína C-reactiva humana (IgG α CRP) y el kit NuPAGE™ Bis-Tris, 4-12% para la electroforesis SDS fueron adquiridos de ThermoFisher Scientific, así como el NuPAGE LDS (4X), agente reductor NuPAGE (10X), tampón de electroforesis MES-SDS NuPAGE MES, patrón de pesos moleculares pretintado PageRuler Plus, de 10 a 250 kDa.

El tolueno y 2-propanol se obtuvieron de Scharlau.

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

Los filtros de ultracentrífuga de 50 kDa se obtuvieron de la casa *Merck Millipore*.

El agua Milli-Q con una resistividad de 18 m Ω se utilizó para preparar disoluciones acuosas.

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

2. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Los portaobjetos y cubreobjetos de vidrio se obtuvieron de la casa Labbox (Barcelona, España).

La activación de la superficie se llevó a cabo empleando el instrumento UV-Ozone Cleaning System de la casa comercial FHR (Ottendorf, Ockrilla, Alemania), con emisión a $\lambda = 254$ nm.

Los *microarrays* se imprimieron mediante un sistema dispensador de bajos volúmenes sin contacto de Biodot (Irvine, CA, USA), modelo AD1500.

Las medidas de los ángulos de contacto se tomaron con el instrumento Attension Theta Lite (Biolin Scientific) y las imágenes se procesaron con el programa OneAttension (versión 3.1; Biolin Scientific).

La detección de fluorescencia se llevó a cabo mediante un lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera (SFR) que usa LEDs para iluminar y una cámara CCD para detectar (Mira *et al.*, 2004).

El tratado de la imagen del *microarray* y la cuantificación se realizaron usando el paquete informático GenePix Pro v6.0.1.27.

3. MÉTODOS

3.1 Purificación inmunoglobulina G (anti-BSA) mediante columnas de proteína A

Partimos de suero inmunológico que contiene anticuerpos policlonales de tipo IgG anti-BSA. Se quiere trabajar con los anticuerpos purificados para así evitar contaminaciones que puedan interferir en nuestro experimento. Por ello se procede a purificar el suero. La purificación se realizó en una bomba peristáltica mediante columnas de afinidad de proteína A.

Cuando se incubaba el anticuerpo en la columna, este interactúa con la proteína A y se queda anclado a la columna. Posteriormente se pasa por la columna glicina, que al tener el pH ácido rompe esta interacción y permite recuperar los anticuerpos. Posteriormente se aplica PBS para eliminar lo sobrante del suero.

Posteriormente se procedió a centrifugar para eliminar la glicina y cambiar los anticuerpos purificados a medio con PBS.

3.2 Funcionalización superficie de vidrio

Los chips se obtuvieron a partir del corte de un portaobjetos de vidrio utilizando un bolígrafo con punta de wolframio.

La activación de los chips se llevó a cabo mediante 7 minutos de irradiación en un limpiador de superficies de ozono, UVOH-cleaner, a una longitud de onda de $\lambda = 254$ nm y potencia 50 mW/cm².

Después se mantuvieron durante 1 hora y 30 minutos en agitación y a Temperatura ambiente sumergidos en una disolución de 1H,1H,2H,2H-Perfluorodieciltrietoxisilano al 2% en tolueno. Transcurrido este tiempo se realiza un breve lavado con tolueno, se secan con aire comprimido y se procede con la etapa de curado en la estufa durante 1 hora a 100 °C.

Finalmente se caracteriza la superficie midiendo el ángulo de contacto con agua (WCA) para confirmar la presencia de F en la superficie.

3.3 Reducción para la obtención de medio anticuerpo como sonda

Los medios anticuerpos (hIgG) que van a actuar como sonda de captura en el *microarray* se van a obtener mediante la reducción selectiva de los puentes disulfuro de la región bisagra de los anticuerpos previamente purificados.

La reducción se llevó a cabo empleando distintos agentes reductores en diferentes concentraciones:

Na₂SO₃ (S), a concentraciones de 800 y 1200 mM

MEA a 80 y 120 mM

TCEP dilución 1:100

S y MEA se mantienen en tampón TRIS-EDTA

TCEP en TA.

Cuando pasan los determinados tiempos de reacción se centrifuga mediante filtros de centrífuga de 50 KDa, para obtener el medio anticuerpo. Las etapas en la centrífuga son:

- Pre-equilibrado y activación de la columna con 500 mL del tampón ya sea acetato o tris. (12300 rpm, 5 min, 8°C).
- Filtrado de 50 µL de hlgG y 450 µL de tampón (12300 rpm, 5 minutos, 8 °C)
- Dos lavados con 450 µL de tampón (12300 rpm, 5 minutos, 8 °C)
- Recuperación de la muestra mediante centrifugación con la columna invertida (3400 rpm, 2 minutos, 17 °C)

Los medios anticuerpos purificados se cuantificaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop.

3.4 Caracterización de los medios anticuerpos mediante electroforesis de proteínas

Las IgG anti-BSA y los medios anticuerpos obtenidos según el reductor se utilizaron para llevar a cabo una electroforesis con un gel NuPAGE, 4-12%, Bis-Tris en condiciones no reductoras.

Para ello se emplearon disoluciones que contienen 5 µg de la proteína de interés.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- 10 µL de muestra: los IgG en tampón PBS y los hlgG en tampón acetato (pH= 4,5).
- 7.5 µL de agua Mili-Q
- 2.5 µL de LDS

Las muestras se dejan a 37 °C durante 10 minutos en un termobloque.

El tampón de electroforesis se preparó diluyendo 25 mL del tampón comercial 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 20X con agua destilada hasta 500 mL.

Los geles están ya preparados.

Se cargaron los 20 µL totales de las muestras junto con 7 µL de patrón de pesos moleculares.

Para la correcta separación de los componentes, se aplicó una potencia de 200V durante unos 30 minutos.

Cuando haya transcurrido el tiempo necesario se extrae el gel usando una espátula y se corta la parte del peine de los pocillos.

Para la tinción del gel, se deposita en inmersión con 100 mL de Azul Coomassie y se deja en agitación durante una hora.

Para poder visualizar bien el gel se llevó a cabo la destinción mediante 3 lavados de 15 minutos en agitación con una mezcla metanol y ácido acético.

3.5 Impresión e inmovilización

El primer paso es la preparación de las disoluciones que se van a imprimir. Se cargan en una placa de 384 pocillos.

Las muestras se van a diluir con tampón PBS 1X.

Para imprimir los medios anticuerpos se utiliza un equipo de impresión sin contacto Biodot, a una humedad relativa del 90%.

Se selecciona el programa en función del ensayo que se vaya a realizar y se usa una plantilla diseñada para imprimir 8 chips rectangulares.

En cada fila del chip se imprime la muestra a una determinada concentración.

Una vez el *microarray* se imprime sobre el chip, se deja a temperatura ambiente para que las gotas sean secadas.

El siguiente paso es la irradiación de los chips mediante una lámpara UV de 6 mW/cm² de potencia, a una $\lambda = 254$ nm durante 5 minutos para que tenga lugar la reacción de acoplamiento y finalmente se realizó un lavado de 10 minutos con PBS-T seguido de otro con agua destilada durante 5 minutos para eliminar el exceso de sonda que no se ha anclado.

3.6 Ensayo de reconocimiento de proteína BSA en formato *microarray*

Una vez la sonda ha sido inmovilizada en los chips, se realiza el inmunoensayo. En este caso va a ser en formato directo.

Se van a preparar disoluciones de BSA a 1 ppm partiendo de BSA previamente marcada diluyendo en PBS-T (Tween 0.05%).

Se añaden 20 μ L de la disolución de BSA sobre cada chip y se cubren con un cubreobjetos para asegurar la extensión de la gota. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Cuando han pasado los 30 minutos se retira el cubreobjetos y se realiza un lavado con PBS-T durante 5 minutos en agitación.

Los chips se visualizan empleando un lector de fluorescencia equipado con cámara CCD de fabricación casera (Mira *et al.*, 2004). El análisis se realizó con el programa GenePix Pro v6.0.1.26.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEDIO ANTICUERPO

El primer paso para conseguir los objetivos planteados en este TFG es reducir los anticuerpos enteros y así obtener los hlgG que van a actuar como sonda de captura en nuestro inmunoensayo. Se van a reducir los anticuerpos selectivamente en la región bisagra generando fragmentos separados, de este modo los grupos tiol van a quedar libres y accesibles para que interaccionen con la superficie perfluorada que hemos funcionalizado previamente.

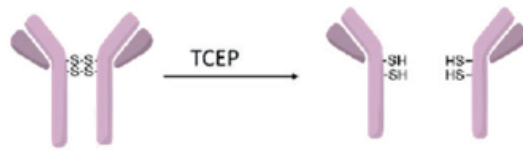


Figura 8: Esquema de la reducción del anticuerpo empleando TCEP.

Para optimizar las condiciones de reducción selectiva en la región bisagra, se prueban distintas condiciones con el sistema modelo elegido. Para ello se usan primeramente anticuerpos anti-BSA policlonales producidos en conejo, purificados previamente mediante columna de afinidad de proteína A. Estos van a ser reducidos empleando diferentes agentes reductores a distintas concentraciones.

Las condiciones seleccionadas para el estudio son Na_2SO_3 (S), a concentraciones de 800 y 1200 mM, MEA a 80 y 120 mM y TCEP en dilución 1:100.

S y MEA se mantienen en tampón TRIS-EDTA mientras que con TCEP se trabaja en tampón acetato.

Empleando estos reductores se espera obtener dos fracciones de cada anticuerpo que contengan cada una una cadena pesada unida a una ligera.

El paso siguiente es purificar los medios anticuerpos mediante filtración empleando filtros de 50 kDa ya que en este punto la masa molecular de los hlgG es aproximadamente de 75 kDa.

Se mide la concentración de los hlgG que se obtiene empleando un espectrofotómetro NanoDrop y se obtuvieron las siguientes concentraciones según los reductores empleados:

- S (800mM): 1,236 mg/mL
- S (1200mM): 1,110 mg/mL
- MEA(80mM): 1,706 mg/mL
- MEA(120mM): 1,172 mg/mL
- TCEP(1:100): 1,224 mg/mL

Se preparan alícuotas de los medios anticuerpos en tampón acetato para evitar la oxidación de los grupos tioles a puente disulfuro y que se forme el anticuerpo completo de nuevo, y se almacenan en el congelador a -20°C .

Posteriormente se procede a analizar y caracterizar los hIgG obtenidos mediante electroforesis SDS-PAGE (dodecilsulfato de sodio-PAGE) en condiciones no desnaturizantes. Se emplea un pack NuPAGE™ Bis-Tris, 4-12% con 12 pocillos de Invitrogen™.

Este equipo contiene geles de poliacrilamida ya fabricados con un ambiente de pH neutro que minimiza las modificaciones de las proteínas y que permite una separación en un amplio rango y en condiciones no desnaturizantes. Estas características hacen que estos geles sean buenos para mantener la integridad de los hIgG.



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

En la electroforesis se cargan 5 µg de proteína (IgG o hIgG) en cada pocillo. Se utiliza esta concentración porque ha sido optimizada en anteriores experimentos del grupo de investigación y da lugar a una mejor calidad en las bandas.

Lo que se espera es ver una banda en 75 kDa que correspondería con la masa molecular de una cadena pesada unida a una ligera.

IgG (H2+L2)	hIgG (H+L)	H	L
150 kDa	75 kDa	50 kDa	25 kDa

Tabla 1: Pesos moleculares aproximados de las inmunoglobulinas G y sus fragmentos.

Tras aplicar sobre el gel un voltaje de 200 V durante 20 minutos, y realizar el proceso de tinción correspondiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante, los geles obtenidos presentaban el siguiente aspecto:

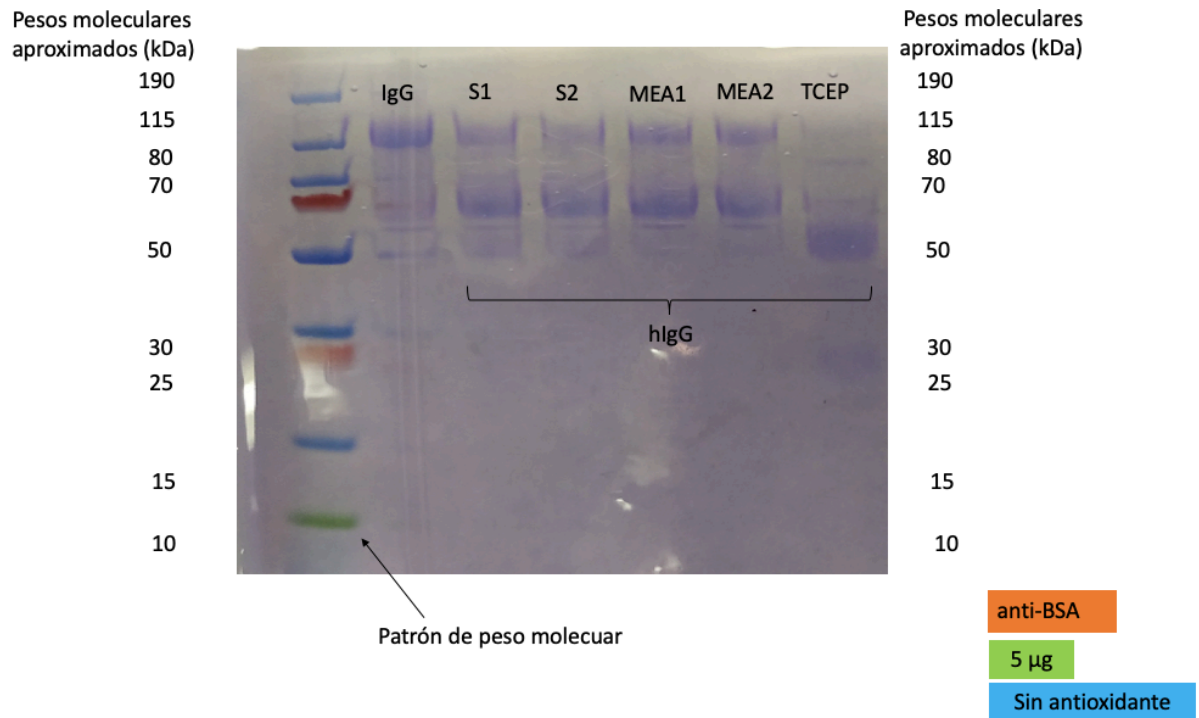


Figura 10: PAGE comparativa entre IgG y h-IgG.

Mediante la electroforesis comprobamos que los anticuerpos han sido reducidos correctamente ya que se observa la banda de 75 kDa.

En el primer carril del gel se carga el anticuerpo completo (IgG). En los carriles dos y tres se van a cargar los hIgG reducidos con Na_2SO_3 en las distintas concentraciones, se representa como S1 el sulfito con menor concentración y S2 el más concentrado, la misma nomenclatura para el MEA. En el último carril se carga el hIgG reducido mediante TCEP.

En este gel comprobamos que los anticuerpos han sido reducidos correctamente ya que se observa la banda de 75 KDa.

En los ensayos con BSA y anti-BSA se van a probar todas las fracciones en la inmovilización para encontrar la óptima y emplearla posteriormente en el ensayo de la CRP.

Tras conseguir los bioreceptores a inmovilizar, se procedió a marcar la proteína BSA con un fluoróforo (indicar cuál) con un kit de marcaje (indicar cual) siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta manera ya disponíamos de los reactivos para realizar los ensayos en formato *microarray* de fluorescencia.

2. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SOPORTES DE VIDRIO

Una vez preparados los bioreactivos se pasó a la preparación de las superficies de ensayo. La funcionalización de las superficies de los chips de vidrio se realiza para proveerlas de enlaces C-F que puedan reaccionar con los grupos tiol libres presentes en la región bisagra de los hIgG y de esta manera queden anclados de forma orientada.

El procedimiento se lleva a cabo cortando un portaobjetos en fragmentos de aproximadamente $2 \times 1 \text{ cm}^2$ empleando para ello un bolígrafo con punta de wolframio.

Para la funcionalización primeramente se activa la superficie irradiando durante 7 minutos en un limpiador de superficies de ozono, UVOH cleaner, $\lambda = 254 \text{ nm}$, (50 mW/cm^2) y posteriormente se dejan los chips sumergidos en la disolución de 1H,1H,2H,2H-Perfluorodieciltrietoxisilano al 2% en tolueno a temperatura ambiente durante 90 minutos, seguidamente se realiza una etapa de lavado con tolueno para eliminar el organosilano que no ha reaccionado y al finalizar este proceso una etapa de curado de 1 hora a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para comprobar que la funcionalización de la superficie se ha llevado a cabo con éxito se midió el ángulo de contacto en agua (WCA) de las mismas.

En un vidrio sin funcionalizar, el WCA esperado está entre los 65 y los 69° . Al ser funcionalizada la superficie, por la presencia de los F, se va a hacer más hidrofóbica, por lo tanto, el ángulo de contacto con el agua debería aumentar con respecto a la superficie de vidrio sin funcionalizar, se esperan ángulos de contacto con valor superior de 90° (figura 11 a))

En todos los chips funcionalizados los ángulos de contacto dieron los valores esperados, lo que nos confirma la reproducibilidad del proceso de funcionalización.

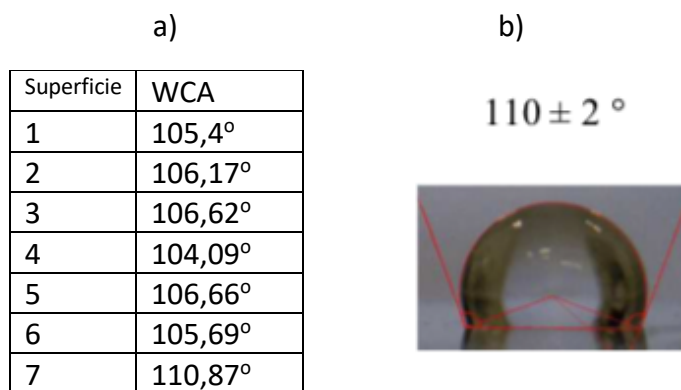


Figura 11: a) ejemplo de medida del WCA de un grupo de chips funcionalizados con PFTS. b) fotografía de la gota de agua en contacto con la superficie de PFTS (Jiménez-Meneses *et al.*, 2018).

3. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNA EN FORMATO *MICROARRAY*

3.1 Optimización de las condiciones con el sistema modelo BSA/anti-BSA

El objetivo de estos ensayos consiste en determinar la concentración óptima de hIgG sonda a inmovilizar, así como los tiempos de irradiación a los que deben someterse las sondas tras ser imprimidas en el chip. También se va a intentar elegir el agente reductor que dé mejores resultados en el bioreconocimiento. Todos estos parámetros deben ser optimizados para obtener una buena densidad de inmovilización y mejorar la sensibilidad de los hIgG en esta nueva superficie de C-F con respecto a las ya estudiadas con anterioridad funcionalizadas con grupos alqueno. Adicionalmente se va a comparar la capacidad de bioreconocimiento de los hIgG inmovilizados con la del anticuerpo entero, puesto que se espera que la mejor orientación que se produce en el hIgG por su manera de anclaje se traduzca en una mejor biodisponibilidad, y por tanto en una mejora en la capacidad de reconocimiento de la proteína en la muestra.

Para ello se van a utilizar diversos chips funcionalizados mediante el procedimiento explicado en apartados anteriores y se va a imprimir empleando un equipo Biodot gotas de 40 nL de las disoluciones de IgG anti-BSA y de hIgG.

Se diseña un *microarray* (figura 12) que contiene en cada fila cuatro réplicas de un tipo de molécula sonda diferente.

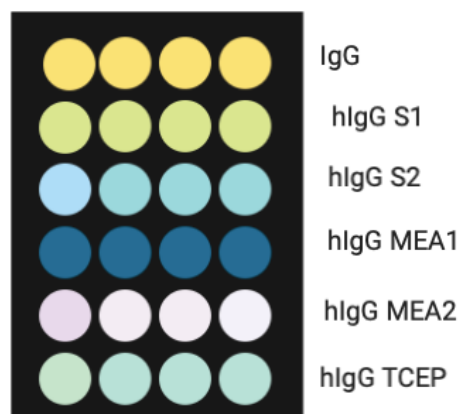


Figura 12: Esquema de los *microarrays* empleados en BSA/anti-BSA. En la primera fila se imprime el anticuerpo completo y en las siguientes, los medios anticuerpos obtenidos con los distintos reductores a concentraciones diferentes.

Se imprimieron concentraciones de 0,1 mg/mL de todos los reactivos y se irradiaron durante 10 minutos en lámparas con distintas λ ($\lambda = 254$ nm y $\lambda = 361$ nm) Posteriormente se

incubaron durante 30 minutos con la proteína BSA marcada con fluoróforo diluida en PBS-T al 10% en suero, y tras lavar los chips se midió la fluorescencia en un lector de fluorescencia de superficies de fabricación casera. Los resultados obtenidos para la irradiación a $\lambda = 254 \text{ nm}$ se muestran en la figura 13.

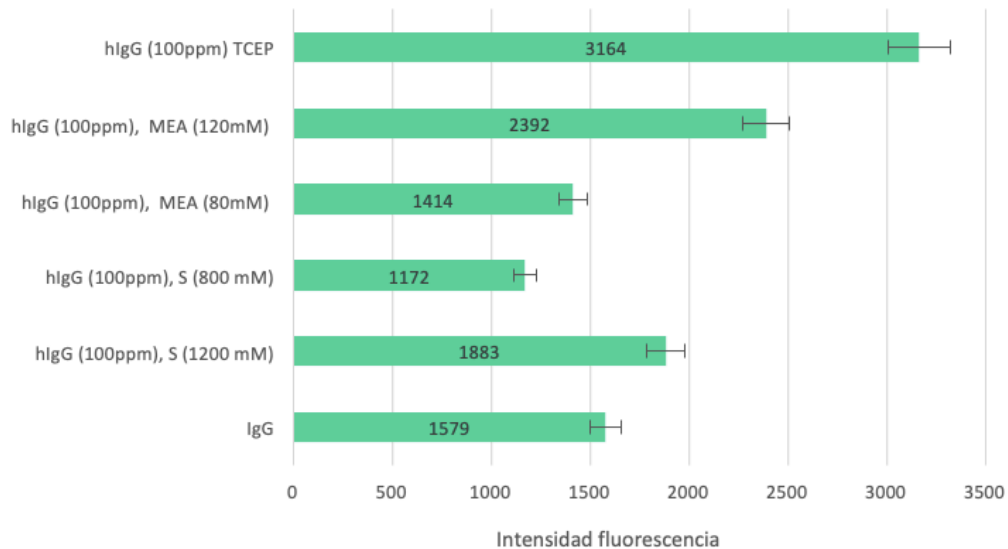


Figura 13: gráfica de barras donde se representa la intensidad de fluorescencia registrada según la sonda (IgG o hIgG) y según el agente reductor empleado a distintas concentraciones.

De esta gráfica se concluye que el agente reductor con el que se obtiene una intensidad de fluorescencia mayor, es el TCEP, se decide emplear dicho agente para reducir los anticuerpos en el ensayo con la proteína C-reactiva.

También se puede observar que empleando los reductores TCEP, MEA (120 mM), y S (1200 mM) se obtienen intensidades de fluorescencia mucho más altas que cuando la sonda es el anticuerpo completo, estos resultados demuestran que el uso de medios anticuerpos aumenta la sensibilidad del sistema, esto se traduce en un resultado reproducible en el posterior ensayo con CRP.

3.2 Ensayo en proteína C-reactiva humana

Una vez decidido el agente reductor que se va a emplear, y optimizadas las condiciones de anclaje se procede a trasladar el protocolo para la realización del ensayo de reconocimiento de proteína C-reactiva.

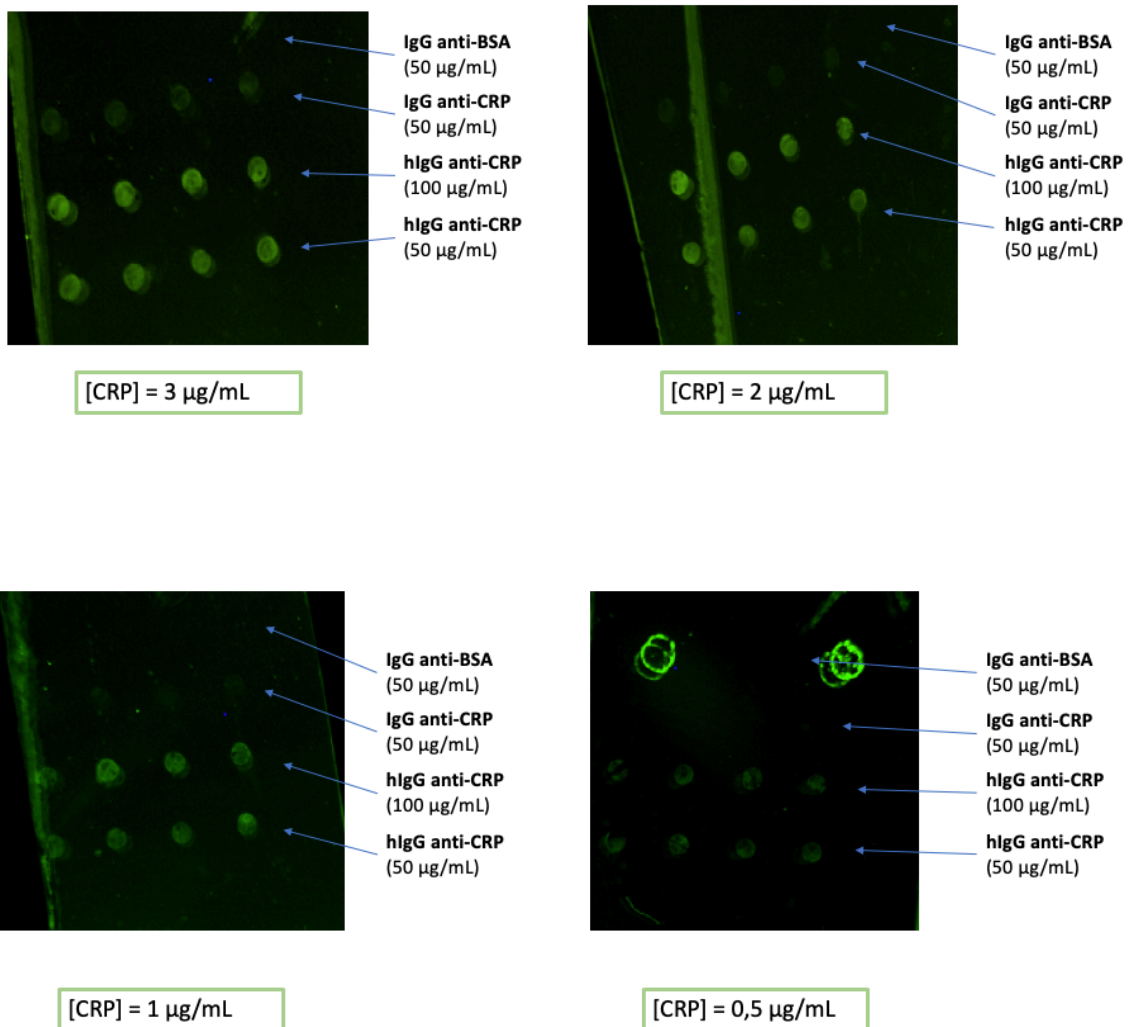
En este ensayo se intenta demostrar la mejora de la sensibilidad de detección de la proteína C-reactiva empleando medios anticuerpos con respecto al uso del anticuerpo completo. Por otro lado, también se quiere demostrar que irradiando el chip se va a conseguir una mayor densidad de inmovilización de los IgG y hIgG comparándolos con los que solamente se quedan

anclados por adsorción química, así como una mejor morfología del punto. Para ello se comparan chips irradiados durante 5 minutos a una $\lambda = 254$ nm con otros mantenidos en oscuridad durante 5 minutos.

También se probaron distintas concentraciones de hIgG anti-CRP, en concreto 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En los soportes se imprimieron: anti-BSA como control negativo, IgG (anti-CRP) y hIgG (anti-CRP).

Tras la impresión, se incubaron los anticuerpos y los medios anticuerpos con la proteína CRP marcada fluorescentemente, a distintas concentraciones para así encontrar también el límite de detección del biochip. Se incubaron con unas concentraciones de CRP de 3, 2, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las imágenes obtenidas se muestran en las figuras 14 y 15.



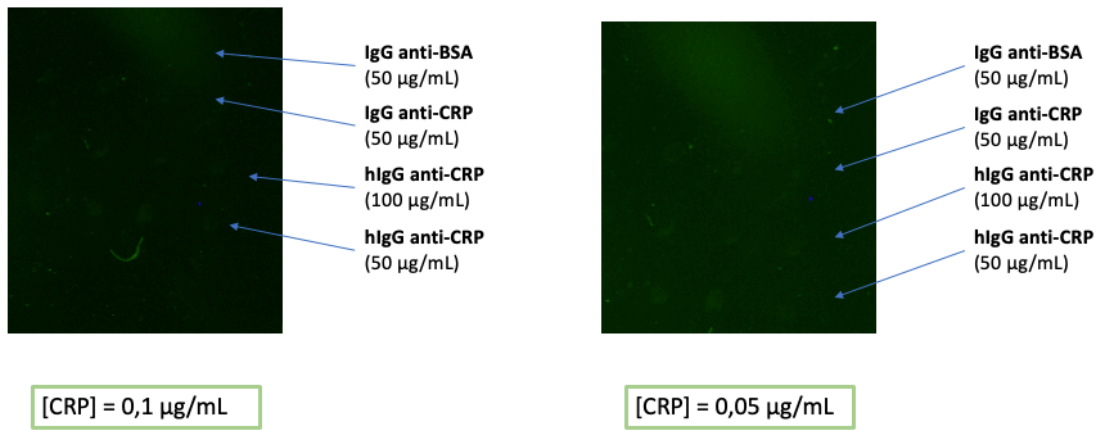


Figura 14: fotografías en cámara CCD de los chips irradiados durante 10 minutos a $\lambda = 254$ nm, incubados a distintas concentraciones de CRP.

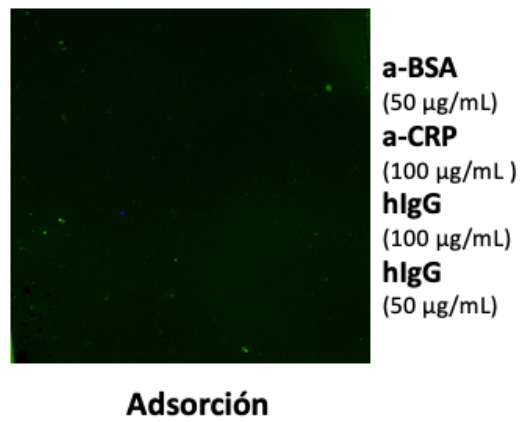


Figura 15: Fotografía en cámara CCD de chip mantenido en oscuridad (ensayo de adsorción). Incubación con CRP a una concentración de 3 µg/mL.



Figura 16: Gráficas en las que se representa la intensidad de fluorescencia registrada en el ensayo con CRP a 3, 2, 1, 0,5, 0,1 y 0,01 µg/mL irradiando 5 minutos a $\lambda = 254$ nm.

De estos resultados se puede concluir que mediante la incubación con CRP a concentraciones de 3, 2, 1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$, los puntos cuya sonda se corresponde a los hIgG emiten más intensidad de fluorescencia que los puntos correspondientes al anticuerpo completo.

Obteniendo estos resultados hemos cumplido con los objetivos propuestos para este trabajo. Al registrarse un mayor nivel de fluorescencia en los *spots* donde se imprimieron hIgG, se demuestra que mediante la reducción selectiva de los anticuerpos se aumenta la sensibilidad y selectividad del sistema. Por otro lado, también comprobamos que el anclaje selectivo y orientado de los medios anticuerpos ha sido llevado a cabo con éxito.

En todos los casos, los puntos correspondientes al control negativo con IgG anti-BSA la fluorescencia registrada es cero, resultado esperado también ya que comprobamos que la CRP nunca se va a unir a un anticuerpo anti-BSA.

En los casos donde la concentración de CRP en la incubación es de 0.1 y 0.05 $\mu\text{g/mL}$, los resultados no se ven de forma tan evidente ya que estamos rozando los límites de detección, pero se observan también los resultados esperados explicados anteriormente.

Por otra parte, en el ensayo de la adsorción observamos que en nuestra superficie no se produce la adsorción de los IgG y los hIgG ya que no obtenemos resultados de fluorescencia, de aquí se concluye que al irradiar los chips con luz UV, las inmunoglobulinas quedan inmovilizadas en el soporte y que sin irradiación no se produce el anclaje.

Se estudió también la relación entre concentración de CRP e intensidad de fluorescencia registrada (figuras 17 y 18).

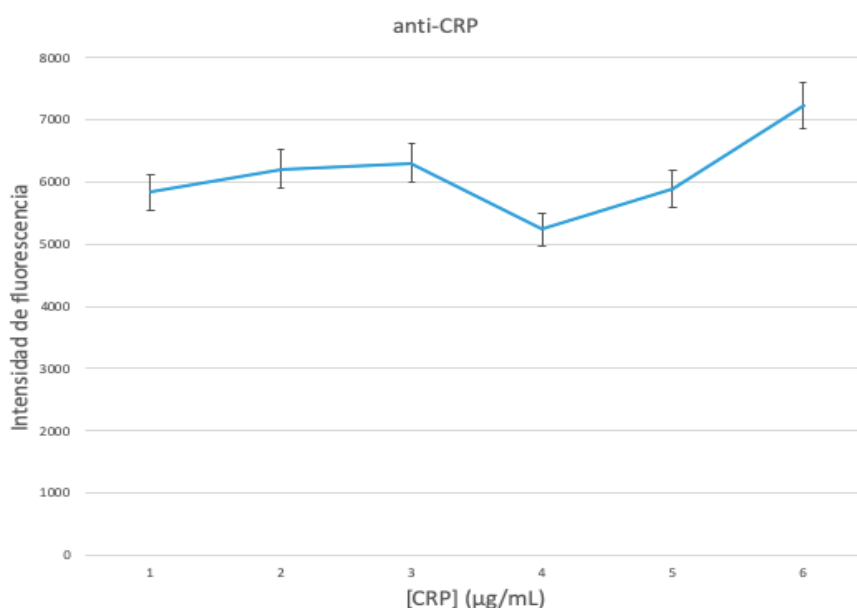


Figura 17: representación de la intensidad de fluorescencia registrada para cada concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) empleando como sonda el anticuerpo completo anti-CRP.

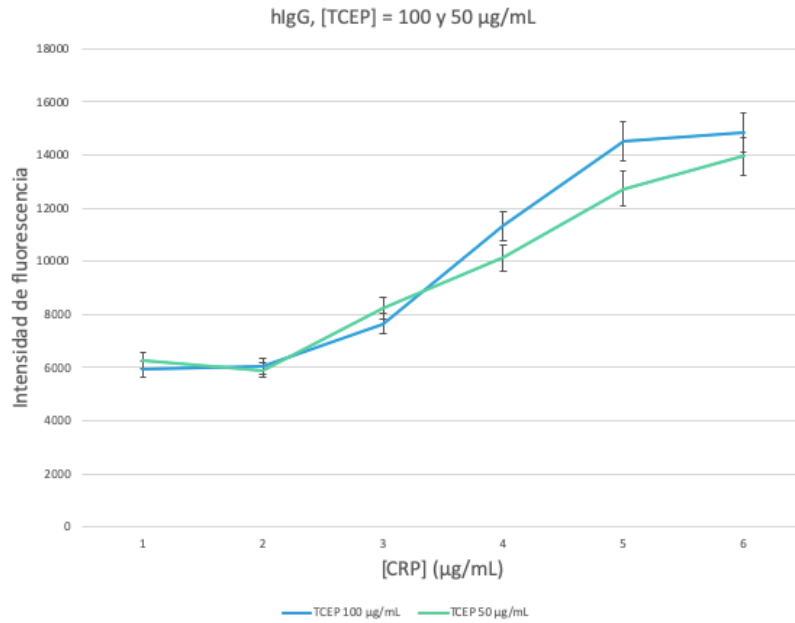


Figura 18: representación de la intensidad de fluorescencia registrada para cada concentración de proteína, empleando como sonda el hIgG en concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En estas gráficas se observa en los chips en los cuales las sondas son hIgGs, aquellos que son incubados con la CRP a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ emiten una señal fluorescente más intensa que 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Se aprecia también que en el rango donde están los valores de interés clínico de la CRP como indicador de riesgo cardíaco (entre 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tenemos una relación más o menos lineal entre concentración e intensidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de fotoinmovilización mediante reacciones de tipo química-click para conseguir el anclaje de medios anticuerpos en un soporte de vidrio funcionalizado y posteriormente realizar un inmunoensayo en formato micromatriz para la detección de proteína C-reactiva mediante detección fluorescente.

En primer lugar se probaron distintos agentes reductores para obtener los hIgG y se caracterizaron por electroforesis comprobando que los anticuerpos habían sido reducidos de forma selectiva con éxito.

A continuación se llevó a cabo la funcionalización de superficies de vidrio empleando PFTS, comprobando mediante el estudio del WCA que fueron funcionalizados correctamente.

Posteriormente se realizó el bioensayo imprimiendo en los chips IgG y hIgG anti-BSA como moléculas sonda e incubando con BSA marcada con un fluoróforo.

En este experimento se demuestra por primera vez en una superficie tratada con PFTS que el uso de hIgG aumenta la sensibilidad del sistema ya que se registra una intensidad de fluorescencia mayor en los spots en los que están imprimidas estas sondas comparando con la fluorescencia que emiten los que contienen IgG.

También se pudo concluir que el agente reductor con el que se obtiene una intensidad de fluorescencia mayor es el TCEP. También se demostró la importancia de la irradiación de los chips con luz UV para catalizar la reacción tiol-F. Con estos resultados reproducibles se procedió a realizar la prueba con la proteína C-reactiva.

En este ensayo las mejores condiciones de inmovilización se obtuvieron irradiando a $\lambda = 254$ nm durante 5 minutos. De esta prueba se concluye que incubando con CRP marcada a concentraciones de 3, 2, 1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$, los puntos cuya sonda se corresponde a los hIgG emiten más intensidad de fluorescencia que los puntos correspondientes al anticuerpo completo. De este modo en el ensayo con CRP queda demostrado también el aumento de sensibilidad empleando medios anticuerpos.

Por último, representando Intensidad de fluorescencia según la concentración de CRP, se comprueba que en los chips en los cuales las sondas son hIgGs, a medida que se aumenta la concentración de CRP, la intensidad de fluorescencia aumenta también, dando lugar a curvas de tipo curvas de saturación.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

ALONSO, R., JIMÉNEZ-MENESES, P., GARCÍA-RUPÉREZ, J., BAÑULS, M. and MAQUIEIRA, Á. (2018). Thiol–ene click chemistry towards easy microarraying of half-antibodies. *Chemical Communications*, 54(48), pp.6144-6147.

ANGENENDT, P.; GLOKLER, J.; SOBEK, J.; LEHRACH, H.; CAHILL, D.J. (2003). Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications. *Journal of Chromatography A*, 1009: 97–104

BAÑULS, M., JIMÉNEZ-MENESES, P., MEYER, A., VASSEUR, J., MORVAN, F., ESCORIHUELA, J., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2017). Improved Performance of DNA Microarray Multiplex Hybridization Using Probes Anchored at Several Points by Thiol–Ene or Thiol–Yne Coupling Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 28(2), pp.496-506.

BAÑULS, M., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2013). Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 777, pp.1-16.

DAS, R., MAJI, S., DAS, S. and ROYCHAUDHURI, C. (2010). Optimization of covalent antibody immobilization on macroporous silicon solid supports. *Applied Surface Science*, 256(20), pp.5867-5875.

DIETRICH, P., STREECK, C., GLAMSCH, S., EHLERT, C., LIPPITZ, A., NUTSCH, A., KULAK, N., BECKHOFF, B. and UNGER, W. (2015). Quantification of Silane Molecules on Oxidized Silicon: Are there Options for a Traceable and Absolute Determination?. *Analytical Chemistry*, 87(19), pp.10117-10124.

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

HALL, D.A.; PTAECK, J.; SYNDER, M. (2007). Protein microarray technology *Mech Ageing Dev.* 128(1): 161–167.

HAN, Y., MAYER, D., OFFENHÄUSSER, A. and INGEBRANDT, S. (2006). Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization. *Thin Solid Films*, 510(1-2), pp.175-180.
Hlady, V. and Buijs, J. (1996). Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(1), pp.72-77.

ITO, Y. (2006). Photoimmobilization for Microarrays. *Biotechnology Progress*, 22(4), pp.924-932.

JIMÉNEZ-MENESES, P., BAÑULS, M., PUCHADES, R. and MAQUIEIRA, Á. (2018). Fluor-thiol Photocoupling Reaction for Developing High Performance Nucleic Acid (NA) Microarrays. *Analytical Chemistry*, 90(19), pp.11224-11231.

KOLB, H., FINN, M. and SHARPLESS, K. (2010). ChemInform Abstract: Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. ChemInform, 32(35), p.no-no.

LOWE, A., HOYLE, C. and BOWMAN, C. (2010). Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. Journal of Materials Chemistry, 20(23), p.4745.

MIRA D, LLORENTE R, MORAIS S, PUCHADES R, MAQUIEIRA A, MARTI J. High-throughput screening of surface-enhanced fluorescence on industrial standard digital recording media; In: Carrano JC, Zukauskas A (eds). International Society for Optics and Photonics, 2004. pp 364–373)

News-Medical.net. (2019). Types of Microarray. Available at: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Types-of-Microarray.aspx> [Accessed 4 Jul. 2019].

PETER B. JAHRLING, J. (2019). Radioimmunoassay for Quantitation of Antibodies to Alphaviruses with Staphylococcal Protein A. [online] PubMed Central (PMC). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275114/> [Accessed 4 Jul. 2019].

PHILLIP ANGENENDT, 2005 Antibody Arrays in Cancer Research Brian B. Haab Molecular & Cellular Proteomics, 4 (4) 377-383;

RIDKER, P., HENNEKENS, C., BURING, J. and RIFAI, N. (2000). C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. New England Journal of Medicine, 342(12), pp.836-843.

RIDKER, P., HENNEKENS, C., BURING, J. and RIFAI, N. (2000). C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. New England Journal of Medicine, 342(12), pp.836-843.

RONG, G.; NAJMAIE A.; SIPE, J.E.; WEISS, S.M. (2008). Nanoscale porous silicon waveguide for label-free DNA sensing. Biosensors and Bioelectronics 23: 1572–1576

ROSI, N. AND MIRKIN, C. (2005). Nanostructures in Biodiagnostics. ChemInform, 36(28).
Sancho-Fornes, G., Peris, E., Giménez-Romero, D., Morais, S. and Maquieira, Á. (2019). Enzyme Inhibition Microassays on Blu-Ray Disks for Drug Discovery. ACS Omega, 4(3), pp.5595-5600.

SASSOLAS, A., BLUM, L. and LECA-BOUVIER, B. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnology Advances, 30(3), pp.489-511.

SHARMA, H. and MUTHARASAN, R. (2013). Half Antibody Fragments Improve Biosensor Sensitivity without Loss of Selectivity. Analytical Chemistry, 85(4), pp.2472-2477.

Surface.mat.ethz.ch. (2019). Understanding Silane Functionalization. Available at: <http://www.surface.mat.ethz.ch/research/surface-functionalization/understanding-silane-functionalization.html> [Accessed 4 Jul. 2019].

SUTANDY, F., QIAN, J., CHEN, C. and ZHU, H. (2013). Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science*, 72(1), pp.27.1.1-27.1.16.

TOURNIAIRE, G., COLLINS, J., CAMPBELL, S., MIZOMOTO, H., OGAWA, S., THABURET, J. and BRADLEY, M. (2006). Polymer microarrays for cellular adhesion. *Chemical Communications*, (20), p.2118.

VAINRUB, A. and MONTGOMERY PETTITT, B. (2003). Surface electrostatic effects in oligonucleotide microarrays: Control and optimization of binding thermodynamics. *Biopolymers*, 68(2), pp.265-270.

WENDELN, C., RINNEN, S., SCHULZ, C., ARLINGHAUS, H. and RAVOO, B. (2010). Photochemical Microcontact Printing by Thiol-Ene and Thiol-Yne Click Chemistry. *Langmuir*, 26(20), pp.15966-15971.

WINGREN, C., BORREBAECK, C. Antibody-Based Microarrays. *Microchip Methods in Diagnosis* (pp 57-84)

YASOJIMA, K., SCHWAB, C., MCGEER, E. and MCGEER, P. (2000). Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 887(1), pp.80-89.

ZHAO, Z., PEYTAVI, R., DIAZ-QUIJADA, G., PICARD, F., HULETSKY, A., LEBLANC, E., FRENETTE, J., BOIVIN, G., VERES, T., DUMOULIN, M. and BERGERON, M. (2008). Plastic Polymers for Efficient DNA Microarray Hybridization: Application to Microbiological Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), pp.3752-3758.

ZHU, H. and SNYDER, M. (2003). Protein chip technology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), pp.55-63.

Zora.uzh.ch, available at: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/44154/1/Rabe1.pdf> [Accessed 4 Jul. 2019].