



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Desarrollo de Técnicas Inmunoquímicas para la Detección de Biomarcadores Cardíacos

Alejandro Hernández Albors



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**Universidad de Barcelona**

**Facultad de Química – Departamento de Ingeniería Química y Química  
Analítica**

Programa de doctorado de Química Analítica y Medio Ambiente

## **Desarrollo de Técnicas Inmunoquímicas para la Detección de Biomarcadores Cardíacos**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona  
presentada por:

**Alejandro Hernández Albors**

Directores:

**Prof. M.- Pilar Marco Colás**

Profesora de Investigación

Dept. de Nanotecnología

Química y Biomolecular

Nb4D group, IQAC-CSIC

**Dr. J.- Pablo Salvador Vico**

Investigador Asociado

Área de Nanomedicina

Nb4D group, CIBER-BBN

Tutor:

**Prof. Mercè Granados Juan**

Profesora titular

Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica

Facultad de Química

Universidad de Barcelona



*Diseño de la portada y contraportada original de,  
Jordi Pérez Carbonell*

[www.jordiperezcarbonell.com](http://www.jordiperezcarbonell.com)



## Agradecimientos

Se cierra una puerta y se abre otra. La memoria aquí recogida describe la parte científica de una tesis doctoral que tuvo sus inicios hace ya 6 años. Durante todo este trayecto no han sido pocas las personas con las que he podido compartir sentimientos que viajan desde la frustración hasta la más profunda felicidad. Resumir en estas líneas las palabras de agradecimiento que tengo hacia estas personas no resulta fácil, diría más, resulta imposible. A pesar de esto, y confiéndome al protocolo bien aceptado y establecido que queda patente en todas las tesis, me dispongo, no por obligación sino por placer y sentimiento de deuda, a dedicar algunas palabras a aquellas personas que, durante todo este recorrido, han tropezado conmigo, han caído y hombro con hombro nos hemos levantado de nuevo para seguir caminado.

- A Pilar y Pablo por ayudarme a crecer científicamente a su lado y depositar en mí la confianza suficiente como para desarrollar este proyecto. Los biomarcadores cardíacos nos han plantado cara, pero somos y seguiremos siendo unos guerreros natos.
- A Francisco que se fue muy pronto quedándome con ganas de absorber todo conocimiento que emanaba de su mente.
- Al Nb4D y al desaparecido AMRg por su calurosa acogida y hacer que me sintiera cómodo desde el primer día. Poder trabajar en lo que te gusta está muy bien, pero hacerlo rodeado de profesionales, buena gente y buen ambiente, es mucho mejor. Gracias.
- Al CAbs. Núria, Ana y también Marta Ruiz, donde aprendí que la forma más sana de enfrentarse a un problema es con sentido del humor. ¡Siempre, con sentido del humor!
- A la Carme y a la Glòria, por su ejemplo de lucha y perseverancia. Hay luz al final del túnel, siempre la hay.

- A la Marta Broto y Ana Sanchis, fuentes inagotables de sabiduría, persistencia y comprensión. Quien la sigue la consigue, ya sea una tesis o un Pokémon.
- A Maese Dra. Vilaplana, que cual Gandalf el Blanco cabalgando Sombragrís, ha guiado mis pasos en cada Western blot. Gracias por su paciencia, su sonrisa perenne y sus cafés, y por haber hecho que este químico sea un poco más biólogo.
- A mi familia y amigos cercanos que, a pesar de carecer de conocimientos científicos profundos, se han esforzado por entender mi trabajo y más aun por intentar explicarlo.
- Sara, que voy a decirte que no sepas. Todas estas páginas resumen parte del camino que decidimos emprender juntos aquí en Barcelona, allá por el 2010. Empezamos dos, ahora somos tres. Esta tesis es tuya, es vuestra.
- Al CiD y toda su gente, compras, administración y personal científico, que ha sido capaz de, mediante un gesto *a priori* insignificante, quitar del camino numerosas piedras incómodas, haciéndolo más transitable.
- Por último, desearía agradecer al programa JAE CSIC por la concesión de beca predoctoral JAE Predoc y al CIBER-BBN, por su contribución en este proyecto.

# ÍNDICE

1	Introducción General y Objetivos .....	1
1.1	Las enfermedades cardiovasculares. contexto global y clínico....	2
1.2	Los biomarcadores cardíacos .....	4
1.3	Diagnóstico en las enfermedades cardiovasculares .....	9
1.3.1	Técnicas de diagnóstico in vivo .....	10
1.3.2	Los biosensores como herramientas de diagnóstico en el ámbito clínico.....	12
1.3.2.1	Técnicas Inmunoquímicas .....	13
1.3.2.2	Anticuerpos .....	13
1.3.2.3	Inmunoensayos .....	14
1.3.2.4	Los Biosensores .....	15
1.3.1	Nuevas aproximaciones de diagnóstico in vitro.....	18
1.3.1.1	Nuevos biomarcadores cardíacos.....	18
1.3.1.2	Nuevas herramientas de diagnóstico y multiplexación.....	21
1.4	Objetivos.....	26
2	Marco de Investigación y Estructura de la Tesis.....	27
2.1	Proyectos de investigación.....	28
2.2	Estructura de la tesis .....	29
3	Lipoproteína (a) .....	31
3.1	introducción.....	32
3.1.1	Estructura de la Lp(a) .....	32
3.1.2	Metabolismo de la Lp(a).....	35
3.1.3	Heterogeneidad, genética y distribución de la Lp(a).....	36

3.1.1 Lp(a) y riesgo cardiovascular .....	39
3.1.2 Técnicas inmunoquímicas para la determinación de Lp(a) .....	41
3.1.3 Objetivos .....	45
3.2 Estrategias para el desarrollo de técnicas de diagnóstico para la Lp(a).....	46
3.2.1 ELISA para la detección y cuantificación de la Lp(a) total .....	50
3.2.2 ELISA para la cuantificación del número de repeticiones del <i>Kringle 4</i> tipo 2 de la Lp(a) .....	51
3.3 Resultados y Discusión .....	51
3.3.1 Producción de anticuerpos policlonales contra la Apolipoproteína B-100.....	52
3.3.2 Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA para la detección y cuantificación de apoB100.....	53
3.3.3 Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA para la detección y cuantificación de Lp(a) en muestras clínicas mediante el uso de anticuerpos comerciales.....	55
3.3.3.1 Determinación de las condiciones de ensayo. Adsorción inespecífica de la Lp(a).....	55
3.3.3.2 Efecto de la concentración de sales y de los agentes bloqu coastes sobre las señales no específicas .....	57
3.3.3.3 Caracterización del inmunoensayo en placa para la Lp(a) .....	60
3.3.3.4 Estudios de especificidad .....	62
3.3.3.5 Evaluación de la robustez del inmunoensayo en presencia de suero humano... ..	62
3.3.3.6 Evaluación de la exactitud del ELISA para la detección de Lp(a) .....	64
3.3.3.7 Análisis de muestras clínicas .....	65
3.3.4 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la cuantificación de los kringles.....	67
3.3.4.1 Estudios dirigidos a conocer la homología entre los diferentes <i>kringles</i> de la apo(a) .....	67

3.3.4.2	Diseño del hapteno para la detección específica del Kringle 4 tipo 1 de la apolipoproteína (a).....	71
3.3.4.3	Selección de haptenos para la detección del Kringle 4 tipo 2 de la apolipoproteína (a) .....	74
3.3.5	Producción de anticuerpos monoclonales contra los Kringle 4 tipo 1 y tipo 2 de la apolipoproteína (a).....	78
3.3.5.1	Preparación de bioconjugados .....	78
3.3.5.2	Generación de anticuerpos policlonales contra los diferentes inmunógenos de la apo(a).....	80
3.3.5.3	Fusión celular. Obtención y selección de hibridomas .....	81
3.3.5.4	Selección de hibridomas. Fases de cribado I-III .....	82
3.3.5.5	Caracterización de los clones seleccionados frente al plasminógeno y la apo(a) .....	85
3.3.5.6	Purificación y evaluación de los anticuerpos monoclonales contra el kringle 4 tipo1 y tipo 2 de la apo(a) .....	86
3.3.6	Desarrollo de una técnica de diagnóstico para la cuantificación de la Lp(a) y del número de repeticiones del kringle k4.2.....	87
3.3.6.1	Desarrollo de una técnica de diagnóstico independiente del polimorfismo asociado a la apo(a) para la detección y cuantificación de la Lp(a).....	88
3.3.6.2	Desarrollo de una técnica de diagnóstico para la cuantificación del número de repeticiones del kringle k4.2 .....	89
3.3.6.3	Evaluación del efecto del material sobre el que se inmovilizan los anticuerpos de captura .....	91
3.3.6.4	Comprobación de la capacidad de captura específica de la Lp(a) por parte de los anticuerpos anti apoB100 .....	93
3.3.6.5	Accesibilidad al reconocimiento de los <i>kringles</i> por parte de los anticuerpos monoclonales anti k4.1 y anti k4.2.....	94
3.3.7	Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales mediante Western blot para la detección de la Lp(a) .....	100
3.3.7.1	Optimización de las condiciones de desnaturalización de la Lp(a) .....	100
3.3.7.2	Evaluación de la inmunodetección de los anticuerpos monoclonales mediante técnicas tipo Dot blot.....	102

3.3.7.3 Evaluación de la inmunodetección de los anticuerpos monoclonales mediante técnicas tipo Western blot.....	103
<b>4 Troponina I Cardíaca.....</b>	<b>113</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>114</b>
4.1.1 Estado del Arte. Precedentes y Objetivos .....	117
4.1.1.1 Inmunoensayos en la literatura.....	117
4.1.1.2 Inmunosensores electroquímicos en la literatura.....	119
4.1.1.3 Inmunoensayos comerciales .....	125
4.1.2 Precedentes.....	128
4.1.3 Objetivos .....	128
<b>4.2 Resultados y Discusión .....</b>	<b>129</b>
4.2.1 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas tipo ELISA para la detección de troponina I cardíaca. Primera aproximación .....	129
4.2.2 El fenómeno de la adsorción inespecífica .....	129
4.2.2.1 Evaluación de diferentes superficies en microplaca .....	131
4.2.2.2 Evaluación de diferentes aditivos sobre la adsorción inespecífica de la cTnI.....	133
4.2.2.3 Evaluación del efecto de la concentración de caseína sobre la adsorción inespecífica de la cTnI.....	135
4.2.2.4 Evaluación de la adsorción inespecífica por parte del complejo ternario de troponina ITC.....	135
4.2.3 Inmunoensayo tipo ELISA Sandwich para la detección de cTnI .....	136
4.2.4 Desarrollo de haptenos y producción de anticuerpos contra péptidos específicos de la troponina. Segunda aproximación. ....	139
4.2.5 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas tipo ELISA para la detección de troponina I cardíaca. Segunda aproximación .....	141
4.2.5.1 Evaluación de la inmunoreactividad de los anticuerpos producidos contra diferentes regiones de la cTnI.....	144
4.2.6 Desarrollo de un inmunosensor amperométrico para la detección de troponina I cardíaca .....	147

4.2.6.1	Estudio de la adsorción inespecífica de la cTnI sobre las partículas magnéticas .....	148
4.2.6.2	Optimización del inmunosensor amperométrico para la detección de cTnI.....	149
4.2.7	Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico para la detección de troponina I cardíaca .....	154
4.2.7.1	Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en nanopartículas de CdS.....	156
4.2.7.2	Síntesis de nanopartículas de CdS .....	156
4.2.7.3	Biofuncionalización de las nanopartículas de CdS con en anticuerpo pAb221.....	158
4.2.7.4	Optimización de la concentración de los diferentes bioconjugados MP-pAb220 y CdSNP-pAb221 .....	159
4.2.7.5	Evaluación de diferentes tipos de partículas magnéticas sobre la adsorción inespecífica del bioconjugado CdSNP-pAb221 .....	160
4.2.7.6	Efecto del tipo de SAM en la preparación de las nanopartículas de CdS sobre la adsorción inespecífica .....	161
4.2.8	Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en quantum dots de CdSe/ZnS .....	164
4.2.8.1	Optimización de la digestión de las nanopartículas de CdSe/ZnS..	165
4.2.8.2	Biofuncionalización de las nanopartículas de CdSe/ZnS .....	166
4.2.8.3	Caracterización electroquímica de los bioconjugados QD-Sav y QD-pAb221.....	167
4.2.8.4	Estudio sobre la capacidad de carga de los QDs .....	169
4.2.8.5	Curva de calibración para la determinación de cTnI .....	170
4.2.9	Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en bioconjugados de QdotStrep comerciales.....	174
4.2.9.1	Optimización de la liberación de iones Cd <sup>2+</sup> .....	176
4.2.9.2	Optimización del potencial de reducción .....	177
4.2.9.3	Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos.....	178
4.2.9.4	Establecimiento de la curva de calibrado para la detección de cTnI.....	180

5	Conclusiones .....	183
6	Materiales y Métodos .....	187
6.1	Tampones.....	188
6.2	Equipos.....	188
6.3	Procedimientos Generales .....	189
6.4	Preparación de Inmunorreactivos .....	190
6.4.1	Preparación de inmunógenos y antígenos de tapizado .....	190
6.4.2	Producción de anticuerpos policlonales.....	191
6.4.3	Producción de anticuerpos monoclonales .....	193
6.4.4	Protocolo de biotinyilación de anticuerpos. Evaluación y caracterización.....	195
6.4.5	Protocolo de biofuncionalización de partículas magnéticas con anticuerpos. Evaluación y caracterización.....	197
6.4.6	Protocolo de síntesis de nanopartículas de CdS .....	201
6.4.7	Protocolo de biofuncionalización de nanopartículas metálicas de CdS y Quantum Dots. Evaluación y caracterización. ....	204
6.5	Bioensayo en microplaca para la determinación de estreptavidina.....	206
6.6	Inmunoensayos .....	207
6.6.1	Ensayos de titración .....	207
6.6.2	Ensayos de selección de hibridomas .....	207
6.6.3	Inmunoensayo ELISA tipo sándwich para la cuantificación de anticuerpos monoclonales.....	208
6.6.4	Inmunoensayo ELISA tipo Sándwich .....	209
6.6.5	Magneto ELISA en formato Sandwich .....	213
6.6.6	Inmunoensayo tipo Dot Blot .....	214
6.6.7	Electroforesis SDS-PAGE en gel de gradiente 4-15%.....	216
6.6.8	Inmunoensayo tipo Western blot .....	218

6.7	Inmunosensores electroquímicos .....	220
6.7.1	Inmunosensor amperométrico .....	220
6.7.2	Inmunosensor voltamperométrico .....	222
7	Bibliografía .....	231
8	Acrónimos y Abreviaciones.....	247



# **1 Introducción General y Objetivos**

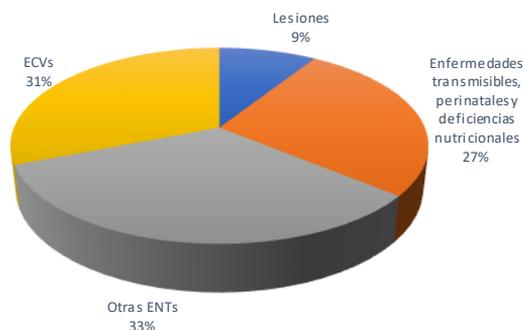
---

## 1.1 Las Enfermedades Cardiovasculares. Contexto Global y Clínico

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son un grupo de patologías del corazón y de los vasos sanguíneos, en las cuales se incluyen:

- **Cardiopatía coronaria**, en la que se ven afectados los diferentes vasos sanguíneos del corazón. Esta enfermedad también se conoce por arteriopatía coronaria.
- **Enfermedad cerebrovascular**, en la que se ven afectados los diferentes vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro.
- **Enfermedad vascular periférica**, en la que se ven afectados el conjunto de vasos sanguíneos responsables de la administración de sangre y oxígeno a las extremidades como brazos y piernas.
- **Enfermedad arterial coronaria**, es el tipo más común de enfermedad coronaria y se debe principalmente a un estrechamiento de las arterias y vasos sanguíneos por la formación de ateromas, principalmente por acumulación de colesterol.
- **Insuficiencia cardíaca**, condición bajo la cual el corazón es incapaz de bombear la cantidad de sangre que el cuerpo necesita.
- **Cardiopatía reumática**, donde tanto el corazón como las diferentes válvulas cardíacas se ven afectadas por efecto de una infección no tratada y causada por streptococco.
- **Cardiopatía congénita**, causada por malformaciones en la estructura del corazón desde el nacimiento.

Las ECVs consituyen a día de hoy la principal causa de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo (Figura 1.1). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 17.5 millones de personas murieron debido a este tipo de patologías en el año 2012. De estas muertes, se calcula que aproximadamente 7.4 millones se debieron a cardiopatías coronarias, y 6.7 millores a accidentes cerebrovasculares.



**Figura 1.1.** Distribución de las mayores causas de muerte a nivel global. Adaptado de Mendis *et al.* *Global Atlas on Cardiovascular Disease. Prevention and Control.* WHO. ENT: Enfermedades No Transmisibles.

De entre todas las regiones, son los países de rentas bajas y medias donde más de un 80% de defunciones son causadas por las ECV, afectando de igual manera a mujeres y hombres.

A nivel local, las ECVs son también la primera causa de muerte, tanto en hombres como en mujeres. Datos referentes al pasado año 2014 proporcionados por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI) indican que las dos principales causas de muerte en ambos sexos fueron las enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebrovasculares<sup>2</sup>. Los datos predictivos en cuanto a la evolución de las ECVs no son esperanzadores. Se estima que de aquí al año 2030, alrededor de 23.6 millones de personas morirán por alguna enfermedad cardiovascular.

La principal causa y más común en los infartos tanto de corazón como los cerebrovasculares<sup>3</sup> es la aterosclerosis, que progresa a lo largo de los años, de modo que cuando aparecen los primeros síntomas, generalmente a mediana edad, suele encontrarse en una fase avanzada. Las causas más importantes que fomentan la aparición de placas de ateroma son principalmente, una mala dieta, el sedentarismo, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Los efectos de los factores de riesgo comportamentales pueden ponerse de manifiesto en las personas de diferente forma como, hipertensión arterial, hiperglucemia, hiperlipidemia y sobrepeso u obesidad<sup>4</sup>. En el mismo informe publicado por el MSSSI el pasado 2016, puede encontrarse como las enfermedades de salud crónicas que afectan a un mayor número de población

son la hipertensión arterial en primer lugar, y el colesterol alto en tercer lugar. Problemas de salud estrechamente relacionados con la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Se demuestra de esta forma como las ECVs ocasionan elevada morbilidad, por lo que su importancia sociosanitaria, en términos de necesidad de utilización de recursos clínicos y terapéuticos costosos y de limitada disponibilidad, junto con la socioeconómica, ya que causa incapacidades transitorias en determinados casos permanentes, es notable. Con todo el impacto que generan las ECVs en diferentes ámbitos, se hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías, capaces de realizar un diagnóstico rápido y fiable, y que complementen a las técnicas ya establecidas en el diagnóstico de este tipo de patologías, garantizando de esta forma la correcta estratificación del riesgo asociado a los pacientes. En este aspecto, la introducción de biomarcadores como variables biológicas que nos proporcionan información útil sobre el estado del paciente y la evolución de la enfermedad se ha hecho notoria en la práctica clínica habitual, mejorando tanto el pronóstico de los pacientes como la certeza en el diagnóstico.

## **1.2 Los biomarcadores cardíacos**

Al inicio de los años 60, empezaron a utilizarse determinados biomarcadores como la aspartato transaminasa (AST), la lactato deshidrogenasa (LDH) o la creatinina kinasa plásmica (CK), para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares. No obstante, la mayor parte de estos biomarcadores mostraban perfiles de concentración muy elevados aun cuando no había rastro de alguna cardiopatía, debido a otro tipo de afecciones como enfermedades hepáticas o bien musculares, poniendo de manifiesto que la especificidad en ese momento, era un punto crucial para el diagnóstico de ECVs. En la década de los 80, la detección de biomarcadores cardíacos se vió revolucionada gracias al desarrollo de nuevas técnicas de detección, como los inmunoensayos. De esta forma, mediante la producción de anticuerpos específicos, se fue capaz de detectar isoformas cardioespecíficas de algunos biomarcadores. A pesar de esto, seguía existiendo cierta inespecificidad, puesto que el incremento en las concentraciones de alguno de estos biomarcadores seguía ocurriendo sin la

necesidad de pasar por una enfermedad de origen cardiovascular. Este hecho puso de manifiesto la necesidad de buscar nuevos biomarcadores cardíacos con unas características específicas.

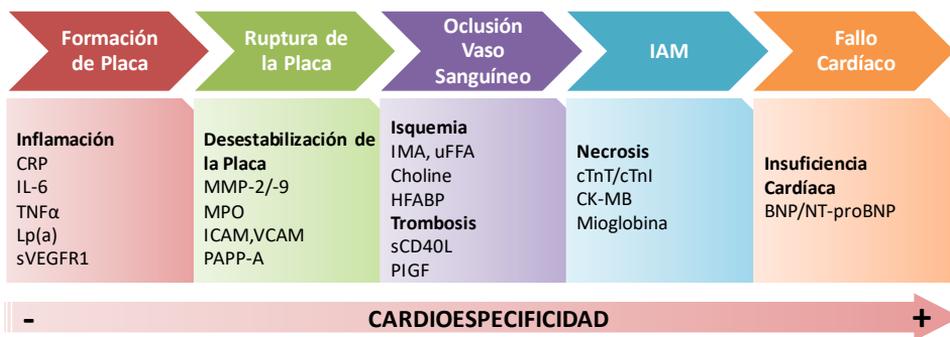
Tal y como se ha comentado anteriormente, alrededor de la mitad de las muertes causadas por ECVs son debidas a enfermedades coronarias. Este tipo de cardiopatías se deben principalmente al desarrollo de placa de ateroma (aterosclerosis) y finalmente infarto de miocardio e incluso infarto cerebral. La aterosclerosis es un proceso inflamatorio que afecta a los diferentes vasos sanguíneos que conforman el sistema cardiovascular. Cuando la capa interna del endotelio se expone a elevadas concentraciones durante largos períodos de tiempo, de lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportadoras de elevadas concentraciones de colesterol, y a otro tipo de sustancias, el endotelio se hace permeable tanto a los linfocitos como a los monocitos, de tal forma que este tipo de células pueden migrar hacia capas más profundas de los vasos sanguíneos. Tras una serie de diferentes reacciones, las partículas tipo LDL se ven atraídas hacia las paredes del endotelio. Estas partículas son engullidas por los monocitos, que a su vez se transforman en macrófagos o *foam cells*, término utilizado en inglés. Estas células del músculo liso son capaces de migrar desde las partes más externas del endotelio, hasta capas más profundas de los vasos sanguíneos, concretamente hasta la capa media, de tal forma que con el tiempo se acaba formando una capa de músculo liso y colágeno. Al mismo tiempo, los macrófagos responsables de el inicio de este fenómeno, mueren, dando lugar a material necrótico que se ve envuelto de la capa de colágeno, originando de esta forma una lesión en el vaso sanguíneo denominada placa de ateroma (Figura 1.2).

Este tipo de lesiones provoca la acumulación de células y lípidos de tal forma que con el tiempo, se forma una protuberancia que va estrechando el vaso sanguíneo y consecuentemente, dificultando el paso de la sangre y la correcta oxigenación de los diferentes órganos del cuerpo. Cuando el proceso de formación de placa no se detiene, la capa de colágeno que contiene toda la masa necrótica junto con los lípidos y otras sustancias, se presta de tal modo que puede fisurarse y llegar a romperse. Con la rotura de la placa, los restos de lípidos y diferentes sustancias se liberan al lecho del vaso sanguíneo, y la herida queda expuesta a agentes trombogénicos, formándose un trombo que impide el paso de la sangre, dando lugar a un infarto cerebrovascular o de miocardio y consecuentemente, necrosis del tejido cardíaco.



**Figura 1.2.** Esquema de las diferentes etapas por las que pasa la formación de la placa de arteroma hasta su ruptura y el consecuente infarto de miocardio. Figura adaptada de *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27:15-26.

Durante todo el proceso descrito anteriormente a través del cual transcurre la enfermedad cardiovascular, se agrupan una serie de biomarcadores, característicos de cada etapa, cuya detección precoz puede facilitar el diagnóstico y pronóstico del paciente (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Esquema donde se representan las diferentes etapas por las que ocurre el infarto agudo de miocardio (IAM). En cada una de ellas se agrupan una serie de biomarcadores cardíacos específicos característicos de cada estado de la enfermedad.

Para que una biomolécula sea considerada un compuesto diana en la detección y prevención de enfermedades cardiovasculares y por lo tanto, sea un buen biomarcador cardíaco, debe presentar las siguientes características<sup>5-6</sup>,

- **Alta especificidad y sensibilidad clínica.** De tal forma que solo estén presentes en el caso de existir alguna cardiopatía, y no por cualquier otra enfermedad.
- **Liberación rápida al torrente sanguíneo.** Que su presencia en sangre pueda ser detectada poco tiempo después de ocurrir el episodio cardiovascular. De tal forma que permita realizar un diagnóstico precoz.
- Capacidad de permanecer **estables durante largo período de tiempo** en el torrente sanguíneo de tal forma que permitan ser detectables en una ventana más o menos amplia de tiempo, y así poder realizar un seguimiento del estado del paciente a lo largo del tiempo.
- Que permitan ser detectados mediante técnicas de **bajo coste económico** y de forma cuantitativa.

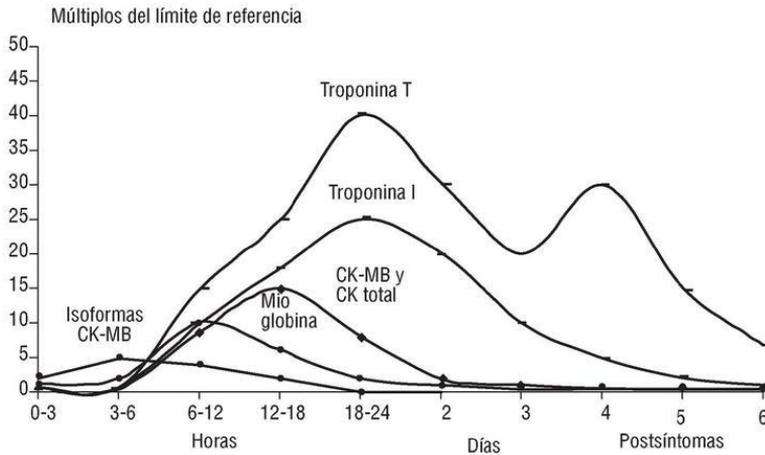
Desafortunadamente, hoy en día no existe ningún elemento que sea capaz de cumplir todas estas características. No obstante, sí que existen ciertas biomoléculas capaces de cumplir una gran parte de los requisitos descritos anteriormente, considerándose biomarcadores cardíacos y siendo los de uso más extendido en el mundo clínico. Parte de éstos se recogen en la Tabla 1.1.

.Los métodos actuales para la confirmación del síndrome coronario agudo (SCA) incluyen el análisis de estos biomarcadores en sangre. Estos análisis se emplean junto con el correspondiente examen del electrocardiograma (ECG), proporcionando información valiosa a la hora de determinar la existencia de isquemia miocárdica y llegando a estimar la extensión de la lesión del miocardio. Cada biomarcador tiene un perfil temporal propio<sup>7</sup>. Algunos como la mioglobina o la CK-MB, pueden presentar niveles elevados en la fase inicial y volver al nivel basal transcurrido un día tras el inicio del episodio, mientras que otros, como es el caso de la troponina I y T, aumentan su concentración de manera más gradual en la sangre, pudiendo llegar a ser detectables aun transcurridos varios días tras el inicio del episodio cardiovascular (Figura 1.4).

**Tabla 1.1.** Tabla resumen donde se recogen diferentes biomarcadores de relevancia clínica junto con sus principales propiedades.

Biomarcador	Etapa ECVs	Niveles recomendados (ng mL <sup>-1</sup> )	Cardioespecificidad	Incremento inicial (h)	Máxima concentración (h)	Recuperación nivel basal (días)
<b>CRP</b>	Inflamación	RB:10 <sup>3</sup> RM:3x10 <sup>3</sup> RA: 3-15x10 <sup>3</sup>	++	4-6	12-24	3-4
<b>Mioglobina</b>	IAM temprano	70-200	+	1-3	6-12	1-2
<b>CK-MB</b>	IAM temprano	10	++	4-6	12-24	3-4
<b>cTnl</b>	IAM	0.01-0.1	+++	4-6	12-24	6-8
<b>cTnT</b>	IAM	0.05-0.1	+++	4-6	12-24	7-10
<b>BNP</b>	SCA, FC	-	+++	NCC	NCC	NCC
<b>NT-proBNP</b>	SCA,FC	0.25-2	+++	NCC	NCC	NCC
<b>HFABP</b>	IAM temprano	10	+	1.3-3	6	0.5-1

ECV: Enfermedad cardiovascular; IAM: Infarto agudo de miocardio; SCA: Síndrome coronario agudo; FC: Fallo cardíaco; RB: Riesgo bajo; RM; Riesgo medio; RA: Riesgo alto; NCC: No existe consenso clínico; PCR: Proteína C reactiva; CK-MB: Creatinaquinasa MB; cTn: troponina cardíaca; BNP: Péptido natriurético B; NT: N-terminal; HFABP: de las siglas en inglés Heart Fatty Acid Binding Protein. Cardioespecificidad: +++: Alta, ++: Media, +: Baja.



**Figura 1.4.** Evolución temporal de los marcadores cardíacos de necrosis postinfarto de miocardio. Adaptado con permiso de Rev Esp Cardiol 2003;56(7):703-20

### 1.3 Diagnóstico en las enfermedades cardiovasculares

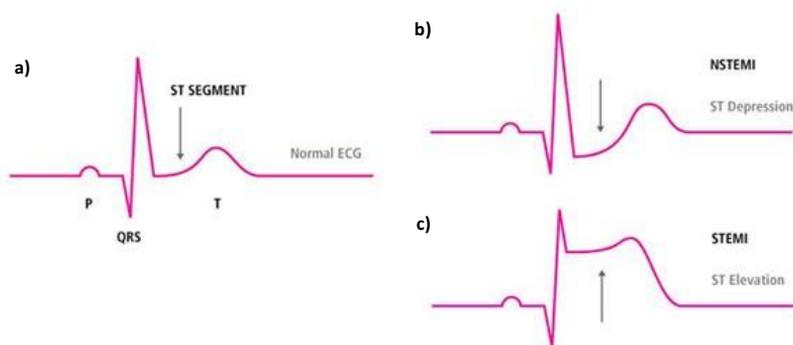
Actualmente, la estratificación y diagnóstico de pacientes que llegan al departamento de emergencias con síntomas relacionados en principio con el desarrollo de afecciones cardíacas, como el dolor de pecho, sigue siendo un reto. Los clínicos deben de ser capaces de distinguir entre aquellos pacientes que requieran de una atención urgente porque presentan problemas como el SCA, y entre aquellos que presentan evidencias de afecciones mucho más leves y que no requieren de futura admisión.

Una de las principales razones por las que el paciente acude al departamento de emergencias, es el dolor de pecho e isquemia de miocardio. El dolor agudo de pecho es uno de los procesos iniciales de la enfermedad cardiovascular en el que el paciente puede incluso mostrar signos de mejoría de forma substancial. No obstante, existe un peligro subyacente que no debe ser pasado por alto, el infarto de miocardio (IM). De hecho, cabe la posibilidad de obviar un infarto de miocardio por diferentes motivos. Por ejemplo, un error en la interpretación de los electrocardiogramas que puede traducirse en un fallo a la hora de diagnosticar correctamente entre un 23 y un 40% de los IMs<sup>8-11</sup>. Otros aspectos que pueden estar relacionados con un error de diagnóstico es la experiencia del clínico y las cardiopatías atípicas de difícil diagnóstico que es posible encontrar.

Por todos estos motivos, resulta crítico la estandarización del protocolo de evaluación de todos los pacientes, en especial aquellos que inicialmente pueden presentar un riesgo bajo pero que finalmente presentan SCA. Con el fin de llegar a un consenso y alcanzar esta meta, a lo largo de estas dos últimas décadas se han investigado y establecido diferentes modalidades de diagnóstico que incluyen nuevos biomarcadores cardíacos, establecimiento del riesgo cardiovascular, pruebas de estrés y técnicas de imagen no invasivas.

### 1.3.1 Técnicas de diagnóstico *in vivo*

El procedimiento establecido a la hora de evaluar un paciente que se presenta en el departamento de emergencias con síntomas evidentes y relacionados con algún tipo de cardiopatía incluye, comprobación del historial médico, examen físico del individuo y la realización de un electrocardiograma (ECG). Cuando un paciente se presenta en el departamento de emergencias, la primera prueba a la que se le somete es a la realización de un ECG, ya que se trata de la técnica más fácil, sencilla y más importante para realizar una rápida estratificación del riesgo cardiovascular. Las directrices actuales apuntan a que es aconsejable realizar una ECG entre los 10 primeros minutos desde la llegada del paciente<sup>12</sup>. La presencia de una elevación en el segmento ST hace susceptible al paciente de someterlo a una reperfusión coronaria. Por el contrario, una depresión en el segmento ST es un claro indicador de riesgo de padecer un infarto de miocardio y de complicaciones por la aparición de posible isquemia<sup>13-14</sup> ( ).



**Figura 1.5.** Representación de un a) ECG normal frente a dos perfiles de ECG b) depresión del segmento ST y c) elevación del segmento ST, relacionados con algún episodio cardiovascular. Imagen adaptada de *Bayer Schering Pharma AG 2008*.

A pesar de la importancia de la técnica, el ECG presenta varias limitaciones, como una baja sensibilidad en el diagnóstico de SCA, especialmente en el caso de angina inestable. También se ha encontrado que alrededor de un 5-10% de los pacientes que se presentan con infarto de miocardio, presentan perfiles normales en us ECG<sup>15-16</sup>.

Por otro lado, el historial clínico del paciente sigue siendo crítico a la hora de realizar una primera valoración del individuo. Dado que en determinadas ocasiones es difícil encontrar evidencias objetivas de SCA en algunos pacientes, el historial clínico se utiliza para relizar un primer paso de estratificación del paciente, clasificándolo en función de su historia y sintomatología, en el grupo de elevado riesgo o el de riesgo bajo, determinando de esta forma el tipo de exámenes y pruebas al que será sometido. En algunas ocasiones, los pacientes no describen la sensación que tienen como dolor, sino más bien como molestia o incomodidad. Las características de este tipo de molestia y la presencia de síntomas asociados, junto con la presencia en el historial de haber padecido episodios similares, son herramientas muy útiles para la estratificación del riesgo<sup>17</sup>. Por ejemplo, síntomas como náusea y vómitos están asociados con un riesgo creciente de IAM<sup>18-19</sup>.

Finalmente, el paciente se clasifica dentro de 4 categorías: (1) aquellos pacientes que presentan evidencias en la elevación del segmento ST; (2) aquellos pacientes que aun sin haber mostrado ninguna variación en el segmento ST del ECG, tienen algún tipo de antecedente en su historial médico o bien poseen un elevado riesgo debido al perfil del ECG; (3) pacientes que no tienen evidencias objetivas de SCA, pero que si que tienen síntomas que obligan a su evaluación; y (4) aquellos pacientes que no presentan evidencia ninguna de padecer alguna cardiopatía considerando los resultados y los síntomas. Es en determinados casos como en los pacientes clasificados como categoría (2) y (3), en los que se propone ser sometidos a diferentes exámenes con el fin de afinar el diagnóstico.

En determinadas ocasiones, es posible que el médico crea conveniente realizar un diagnóstico adicional del paciente mediante el uso de determinadas técnicas que permiten confirmar la localización y la extensión de la lesión del miocardio. Estas técnicas son la angiografía coronaria, que permite visualizar la existencia de obstrucciones en las arterias coronarias, la gammagrafía de perfusión cardíaca, para identificar si existe déficit de flujo coronario en reposo y también

durante las pruebas de inducción farmacológica. Técnicas de imagen no invasiva como la ecocardiografía, que permite determinar la función general del ventrículo izquierdo y evaluar regiones del miocardio que presentan alguna disfunción, o la resonancia magnética nuclear y la tomografía de emisión de positrones, cuya principal ventaja reside en la obtención de imágenes de la zona afectada para así establecer de forma más segura un diagnóstico y las correspondientes directrices a seguir.

### **1.3.2 Los biosensores como herramientas de diagnóstico en el ámbito clínico**

Actualmente, para el sistema sanitario la admisión de pacientes en el departamento de emergencias, cuya probabilidad de desarrollar y sufrir un síndrome coronario agudo (SCA) sea bajo, implica un coste muy elevado. Del mismo modo, se sabe que alrededor de un 2-5% de las negligencias médicas están asociadas con la alta inapropiada y prematura del paciente<sup>20</sup>. Junto con estos hechos, son varios los factores que ponen de manifiesto la necesidad de definir de forma precisa y unequivoca los protocolos de actuación frente a casos de urgencia cardiovascular. Actualmente, estos protocolos de admisión del paciente se ponen en marcha cuando éste llega a la unidad de urgencias con un dolor agudo en el pecho. Inicialmente se realiza una valoración del paciente mediante el estudio del historial clínico y un examen físico, seguido de un electrocardiograma. Si el segmento ST indica claramente que el paciente ha sufrido un infarto de miocardio, es inmediatamente ingresado y tratado. Por el contrario, si el resultado del ECG no es concluyente, se realiza un test de biomarcadores con el fin de determinar cual es la situación exacta del paciente.

Muchos de los test que se detallan en la sección 1.3.1, se utilizan actualmente para el diagnóstico in vitro de ECVs, están basados en técnicas inmunoquímicas, por lo que en su gran mayoría hacen uso de anticuerpos como elementos de biorreconocimiento.

### 1.3.2.1 Técnicas Inmunoquímicas

Las técnicas inmunoquímicas están basadas en el reconocimiento antígeno (Ag)-(Ab) anticuerpo. Esta interacción reversible y no covalente implica interacciones del tipo puente de hidrógeno, electrostáticas e interacciones tanto hidrofóbicas como de Van der Waals. La afinidad que ofrece este fenómeno de reconocimiento, en algunos casos la constante de afinidad alcanza valores muy altos ( $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ), se ha utilizado para la detección de diferentes tipos de analitos como drogas, fármacos, pesticidas y biomarcadores entre otros, en todos los casos utilizando una cantidad de muestra muy pequeña. Debido a la gran variedad de prestaciones y características analíticas que ofrecen este tipo de técnicas, han sido utilizadas en un amplio rango de aplicaciones, desde el campo clínico pasando por la seguridad alimentaria y el diagnóstico medioambiental.

### 1.3.2.2 Anticuerpos

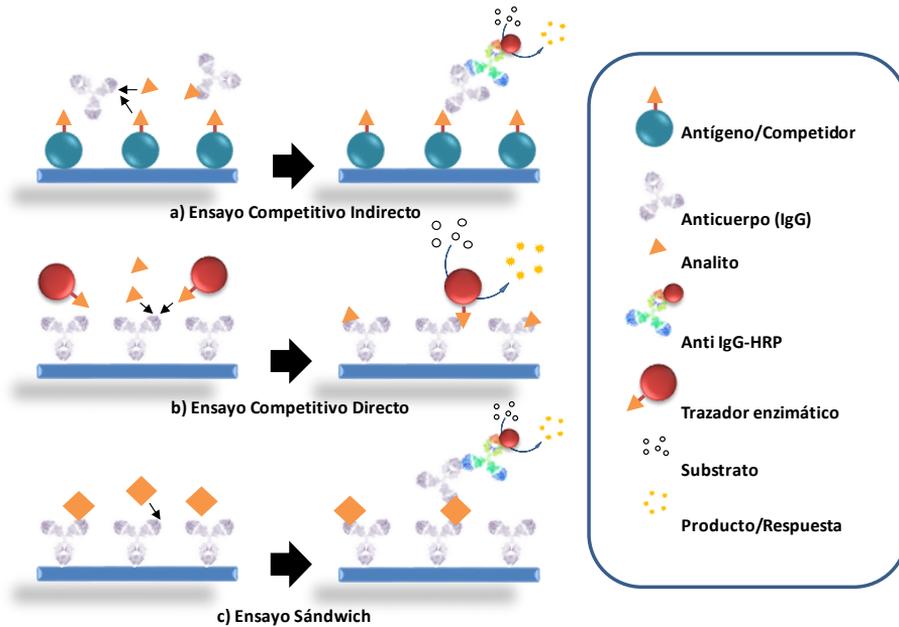
Los anticuerpos son proteínas globulares de la familia de las inmunoglobulinas, producidas por el sistema inmune con el fin de neutralizar agentes extraños. Existen diferentes familias de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), que se diferencian por la carga, dimensiones, morfología, así como por el número y tipo de carbohidratos presentes en su estructura. En el suero de los mamíferos, es la inmunoglobulina IgG la más abundante y también la más utilizada en el desarrollo de técnicas inmunoquímicas. Este tipo de inmunoglobulinas tienen un peso molecular de 150 kDa y unas dimensiones aproximadas de 12x15x5 nm.

En principio es posible obtener anticuerpos contra cualquier tipo de molécula. No obstante, mientras que aquellas moléculas de mayor tamaño, son capaces de generar una respuesta inmune por ellas mismas, disparando la producción de anticuerpos, en el caso de moléculas más pequeñas ( $\text{MW} < 1000 \text{ Da}$ ), este fenómeno no tiene lugar. Por este motivo se hace necesario el diseño y síntesis de un compuesto de estructura semejante pero no idéntica al antígeno llamada hapteno, para tras su conjugación a una biomacromolécula, ser capaz de generar respuesta inmune y así activar la producción de anticuerpos<sup>21</sup>.

### 1.3.2.3 Inmunoensayos

Los inmunoensayos (IA, del inglés *Immunoassay*) están basados en la cuantificación de la interacción Ag-Ab a través de diferentes etiquetas o marcadores, que pueden ser desde radioisótopos (radioinmunoensayos, RIA), moléculas fluorescentes (fluoroimunoensayos, FIA), o bien aquellos que utilizan una amplificación enzimática detectable para cuantificar al interacción antígeno-anticuerpo (inmunoensayo enzimático, EIA), con el fin de generar un tipo de respuesta cuantificable.

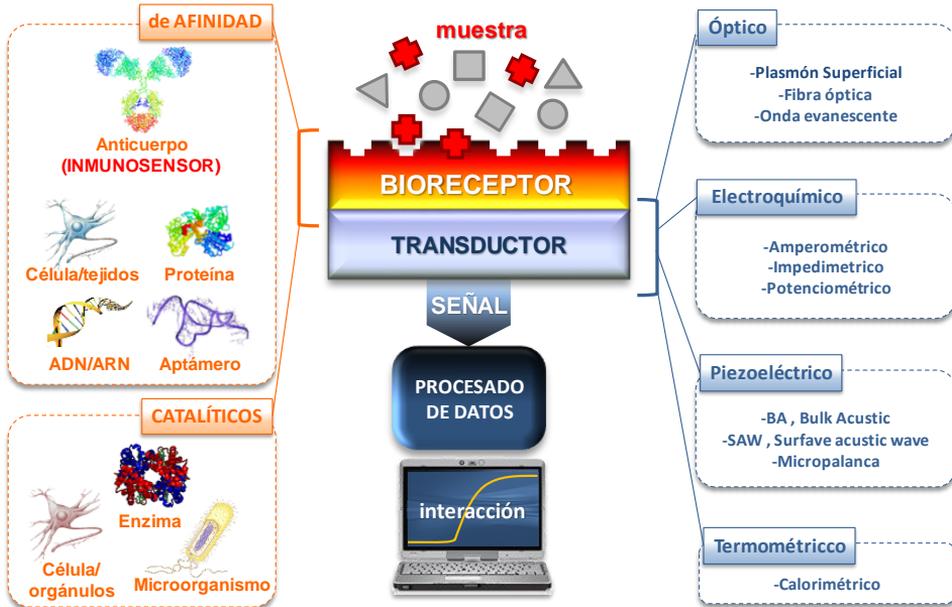
Uno de los IAs más extendidos en cuanto a su uso a nivel mundial y a lo largo de los años es el inmunoensayo conocido como ELISA, de sus siglas en inglés, *Enzyme-linked immunosorbent assay*. Este tipo de inmunoensayo utiliza como soporte sólido una microplaca, donde dependiendo del formato de ensayo escogido, se inmoviliza bien un antígeno de tapizado o competidor, o bien un anticuerpo. Normalmente, dependiendo del analito diana, pueden seleccionarse diferentes tipos de formatos de ensayo ELISA. Si se trata de un analito pequeño, por lo general se desarrolla un ensayo ELISA competitivo indirecto (Figura 1.6, a) o bien directo (Figura 1.6, b). En ambos casos, la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito. Por contra, si el analito diana es una molécula de mayor tamaño, como puede ser una proteína, el formato de ensayo escogido normalmente es el formato sándwich (Figura 1.6, c). En éste, uno de los anticuerpos (anticuerpo de captura) se inmoviliza sobre la superficie de la placa, y tras la fase de captura del analito, se adiciona un segundo anticuerpo (anticuerpo de detección). En este caso, la señal observable es directamente proporcional a la concentración de analito.



**Figura 1.6.** Esquema representativo de los diferentes formatos de ensayo tipo ELISA para la detección tanto de analitos de bajo peso molecular como de pesos moleculares mayores.

### 1.3.2.4 Los Biosensores

Puede definirse un biosensor como aquella herramienta analítica que integra un elemento de bioreconocimiento (bioreceptor), el cual se encuentra integrado en un transductor físico-químico que puede ser óptico, electroquímico, piezoeléctrico, termométrico o magnético, que traduce el evento de bioreconocimiento en una señal medible. En la Figura 1.7, se muestra de forma esquemática las diferentes partes que conforman un biosensor y su funcionamiento. Como consecuencia de la interacción entre el analito y el receptor, se produce un cambio físico-químico en el transductor, que da lugar a una señal cuantificable mediante un sistema electrónico de adquisición, amplificación y procesamiento de datos.



**Figura 1.7.** Esquema donde se muestran las diferentes partes que conforman un biosensor, junto con su clasificación dependiendo del elemento de reconocimiento y el método de transducción seleccionado.

Una de las etapas clave en el desarrollo de un biosensor es la inmovilización del bioreceptor sobre la superficie seleccionada, ya que se tiene que garantizar que tras el paso de inmovilización, el receptor debe seguir siendo biofuncional, biocompatible, estable y homogéneo a lo largo de toda la superficie. Así mismo, la regeneración de esta superficie para su reutilización de forma que se garanticen las mismas prestaciones por parte del bioreceptor, también es en determinados casos, una etapa limitante en el desarrollo de biosensores.

En la Tabla 1.2 se recogen algunos de los biosensores desarrollados para la detección de biomarcadores cardíacos con diferentes transducciones.

**Tabla 1.2.** Diferentes biomarcadores y su detección mediante el uso de diferentes plataformas de biosensado.

Biomarcador	Muestra	Biosensor	Respuesta	Detectabilidad (ng mL <sup>-1</sup> )	Rango Lineal (ng mL <sup>-1</sup> )
TNF- $\alpha$ <sup>22</sup>	Tampón	Óptico	Fluorométrico	-	1-0.0016
CRP <sup>23</sup>	Suero	Óptico	Fluorométrico		10-10 <sup>5</sup>
CRP <sup>24</sup>	Sangre	Óptico	Fluorométrico	20	-
CRP <sup>25</sup>	Suero	Óptico	SPR	10 <sup>3</sup>	2-5x10 <sup>3</sup>
cTnI <sup>26</sup>	Suero	Óptico	ECL	0.002	-
cTnT <sup>27</sup>	Suero	Óptico	SPR	0.01	0.03-6.5
BNP, cTnI, mioglobina, CRP <sup>28</sup>	Suero	Óptico	Fibra óptica	0.1, 7x10 <sup>-3</sup> , 70 y 700	-
Mioglobina <sup>29</sup>	Sangre	Electroquímico	Faradaico, electrodos de Fe serigrafados	5	-
NT-proBNP <sup>30</sup>	Tampón	Electroquímico	Faradáico, nanoestructuras de Au y nanotubos de carbono	0.006	0.02-100
cTnI y CRP <sup>31</sup>	Suero	Electroquímico	Partículas de Au recubiertas de material polimérico	0.01 y 0.5	-
CRP <sup>32</sup>	Suero	Electroquímico	Impedancia	0.001	-
BNP/NT-proBNP <sup>32</sup>	Suero	Electroquímico	Impedancia	10 <sup>-6</sup>	-

ECL: electroquimioluminiscente; SPR: de las siglas en inglés Surface Plasmon Resonance

### **1.3.1 Nuevas aproximaciones de diagnóstico *in vitro***

Cuando hablamos de nuevas aproximaciones para el diagnóstico de las ECVs, podemos hacerlo desde tres puntos de vista diferentes. Primero, el diagnóstico precoz de este tipo de enfermedades mediante el uso de nuevos biomarcadores cardíacos. Segundo, el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico capaces de establecer un valor fiable en un periodo corto de tiempo. Este tipo de dispositivos son los llamados test tipo point-of-care (POC). Y tercero, la capacidad de multiplexación de las nuevas herramientas de diagnóstico, que nos permite obtener una información más extendida del alcance de la ECV analizando diferentes biomarcadores en un solo test.

#### **1.3.1.1 Nuevos biomarcadores cardíacos**

Existen dos aproximaciones posibles a la hora de buscar biomarcadores noveles para el diagnóstico y pronóstico de las ECVs. Una, la clásica, donde se buscan proteínas involucradas en los diferentes procesos por los que cursa la enfermedad cardiovascular. La segunda, mediante el uso de técnicas de alto rendimiento como es la proteómica. Con esta aproximación es posible comparar fluidos o tejidos de un paciente con los de un sujeto sano, y a modo de rastreo, ver qué proteínas se expresan de forma diferente entre ambas muestras. De esta forma, se genera un listado de proteínas potencialmente involucradas en este tipo de enfermedades, entre las cuales se debe de seleccionar aquellas cuya función o propiedades las hacen candidatas potenciales a ser nuevos biomarcadores.

Son varios los criterios para la aplicación clínica de biomarcadores noveles. El primero de ellos es que la determinación de este nuevo biomarcador debe facilitar el manejo clínico y mejorar el pronóstico de pacientes. En segundo lugar, el marcador debe mejorar la certeza del diagnóstico o la estratificación del riesgo cardiovascular, respecto a lo alcanzado en pruebas y biomarcadores ya existentes. Y por último, el biomarcador analizado, bien en suero o plasma, debe ser lo suficientemente estable para evitar la degradación excesiva tras la obtención de la muestra. De entre la multitud de biomarcadores candidatos

investigados actualmente para las ECVs, son pocos los que llegan a satisfacer estos criterios. A continuación se describen brevemente algunos de ellos.

- **Colina**

La colina es un producto enzimático derivado de la fosfolipasa D. La fosfolipasa D está relacionada con disfunción endotelial y es considerada un marcador de inestabilidad plaquetaria, así como de isquemia miocárdica severa. Estudios recientes demuestran que la colina es capaz de predecir diferentes eventos cardíacos adversos como muerte cardíaca, infarto de miocardio, fallo cardíaco entre otros<sup>33-34</sup>.

- **Factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15)**

El GDF-15 es una citocina secretada por los macrófagos y los cardiomiocitos en respuesta al estrés oxidativo y la inflamación. Diferentes estudios en modelos animales han mostrado como el GDF-15 se produce en el corazón en respuesta a procesos de isquemia, sobrepresión en el miocardio, fallo cardíaco y procesos oxidativos<sup>35</sup>. Diferentes estudios han revelado como pacientes de IAM/SCA han mostrado determinados niveles de GDF-15 en sangre superiores a los grupos de referencia<sup>36</sup>. Aunque los valores de troponina y NT-proBNP por si solos son suficientes como para establecer un pronóstico adecuado, se ha observado como la determinación del GDF-15 junto con estos biomarcadores, facilita la estratificación del riesgo cardiovascular.

- **Copeptina**

La copeptina es el extremo terminal carboxílico de la prohormona vasopresina, se secreta por la neurohipófisis con la arginina-vasopresina. La concentración de copeptina parece reflejar riesgo de muerte en múltiples trastornos médicos, incluido el IAM<sup>37</sup>. Diferentes estudios han mostrado que la precisión en el diagnóstico por detección de troponinas (cTn) se ve mejorada de forma sustancial si se combina con la copeptina<sup>38-39</sup>. Del mismo modo, en combinación con la NT-proBNP se ha observado que mejora la estratificación del riesgo cardiovascular.

- **Adiponectina**

La adiponectina es una hormona sintetizada principalmente por el adipocito, siendo su principal producto proteínico. Promueve la oxidación de los ácidos grasos y reduce la síntesis de glucosa en el hígado y otros tejidos. La ausencia de expresión génica de esta hormona se asocia a resistencia a la insulina e infiltración grasa de los músculos. Múltiples datos experimentales y clínicos publicados en la última década indican que hay una estrecha relación entre esta hormona y los componentes del síndrome metabólico<sup>40</sup>. La concentración plasmática de adiponectina muestra una correlación inversa con el índice de masa corporal y la resistencia a la insulina<sup>41</sup>. Así mismo se ha observado que la concentración de adiponectina en pacientes con IAM y otros eventos derivados del infarto es más baja que la correspondiente a un grupo de referencia. De esta forma se considera que la adiponectina es un factor independiente de riesgo cardiovascular<sup>42</sup>.

- **ST2**

La ST2 soluble (sST2) es uno de los nuevos biomarcadores más importantes en el pronóstico de pacientes con insuficiencia cardíaca. Esta proteína está regulada por los miocitos cardíacos y desempeña un papel importante en los procesos de hipertrofia y fibrosis del miocardio. La ST2 es liberada por las células endoteliales y puede intervenir en el desarrollo de aterosclerosis e hipertensión arterial<sup>43-44</sup>. De este modo, este biomarcador proporciona información valiosa de pronóstico, aunque diferentes a la obtenida por los péptidos natriuréticos BNP/NT-proBNP. No obstante se ha observado como su detección en conjunto con la del BNP/NT-proBNP mejora el valor pronóstico obtenido, de forma aditiva e incluso multiplicadora<sup>45</sup>.

- **Lipoproteína (a)**

La lipoproteína (a) o Lp(a) es una partícula similar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que, a diferencia de éstas, posee una apolipoproteína particular, apolipoproteína (a) o apo(a), unida a la apoB100 mediante un puente disulfuro, que le confiere características propias. Como se verá más adelante, la apo(a) está formada por diferentes subestructuras denominadas *kringle*. Cada individuo

posee un número de repeticiones determinado de uno de estos *kringles*, concretamente del *kringle* 4 tipo 2, marcado genéticamente<sup>1</sup>. Esta iteración se traduce en la existencia de diferentes isoformas de la apo(a), y consecuentemente en que la Lp(a) posea un elevado grado de heterogeneidad entre diferentes individuos, ya que de esta forma, la concentración plásmica de esta lipoproteína también está determinada genéticamente en cada persona<sup>46</sup>. Al igual que la adiponectina, está universalmente reconocido que la Lp(a) constituye un factor independiente de riesgo cardiovascular en el desarrollo de la aterosclerosis. De igual forma, debido a la similitud de la apo(a) con el plasminógeno, directamente relacionada con el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2, también es un factor de riesgo de trombogénesis<sup>47</sup>. La mayoría de los estudios retrospectivos de casos y controles han demostrado que las concentraciones elevadas de Lp(a), sobretodo por encima de 30 mg dL<sup>-1</sup>, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad coronaria prematura.

De esta forma, constituye todo un reto poder desarrollar una herramienta de diagnóstico capaz de determinar, más allá de la concentración plásmica de esta lipoproteína, el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2, mejorando de esta forma el diagnóstico y la estratificación del riesgo cardiovascular<sup>48</sup>.

### 1.3.1.2 Nuevas herramientas de diagnóstico y multiplexación

Dentro de las nuevas herramientas de diagnóstico podemos diferenciar aquellos inmunoensayos de última generación capaces de detectar niveles muy bajos de un determinado biomarcador, como es el caso de los ensayos *high sensitive* existentes para la troponina T cardíaca (cTnT) y la troponina I cardíaca (cTnI), y también los dispositivos conocidos como Point-Of-Care (POC), que como se verá más adelante son capaces de detectar varios biomarcadores en una misma muestra, siendo de esta forma una buena herramienta de multiplexación.

- **Técnicas inmunoanalíticas de alta sensibilidad**

Como ya está establecido dentro del campo clínico, desde el año 2000 se ha recomendado el uso de la troponina cardíaca (cTn) como el biomarcador por excelencia para la evaluación de los pacientes con posible diagnóstico de infarto

agudo de miocardio<sup>49</sup>. No obstante, la mayor parte de los inmunoensayos actuales para medir la troponina cardíaca no permiten detectar algunos valores de cTn ligeramente superiores a la población de referencia establecida. Este inconveniente ha llevado a desarrollar los llamados ensayos de alta sensibilidad (hs-cTn), que permiten detectar concentraciones de cTn entre 5 y 10 veces menores que los métodos convencionales y además con menor imprecisión analítica, lo cual hace que la detección de cambios en los valores de cTn sea más fiable. Además, otras causas de lesión cardíaca actualmente difíciles de detectar se podrán revelar como más frecuentes de lo que hasta ahora se pensaba.

Actualmente el diagnóstico de IAM se basa en la combinación de tres factores; síntomas clínicos, alteraciones electrocardiográficas y un aumento de los valores de un biomarcador. Para el caso de la cTn, los valores de corte recomendados para el diagnóstico de un IAM se establecen en el percentil 99 o el límite superior de referencia (LSR). Dada la importancia que tiene para el diagnóstico, el percentil 99 debe determinarse con la máxima exactitud. No obstante, esta exactitud dependerá de las características de la población de referencia, cuya selección está sujeta a una elevada variabilidad. Por ejemplo, el valor del LSR para una población de avanzada edad aun sin presentar ninguna afección cardíaca, será superior al de una población joven<sup>50</sup>. También, hay que considerar las diferencias entre ambos sexos, ya que los varones presentan valores de hs-Tn superiores a los de las mujeres<sup>51</sup>. Actualmente los clínicos utilizan valores de LSR basados en poblaciones de referencia que no cumplen los requisitos indicados; por consiguiente, es probable que estos valores sean demasiado elevados para un uso clínico, creando discordancia entre los diferentes métodos establecidos<sup>52-54</sup>. Tal y como recomiendan todas las guías clínicas, para la realización de un diagnóstico fiable de IAM es preferible tomar muestras seriadas para la determinación de cTn, con objeto de observar un aumento o disminución de sus valores, que haga sospechar de un síndrome coronario agudo. No obstante, actualmente se carece de una definición clara de lo que constituye un aumento o disminución significativa de las concentraciones de cTn. En este aspecto, dado que los métodos actuales para la detección de cTn permiten cuantificarla en pocos individuos sanos, los ensayos tipo hs-cTn han contribuido a establecer el llamado valor de cambio en la referencia (VCR), por encima del cual se puede estar seguro de que los cambios observados en los niveles de cTn responden a cambios patológicos<sup>53</sup>, siendo capaces de corregir este error.

Con todo esto puede concluirse que el desarrollo de técnicas de alta sensibilidad para la detección de cTn, supone todo un reto. Más allá de los propios problemas involucrados en la inmunodetección de este biomarcador y que se detallan más adelante, existe todo un conjunto de factores como son el establecimiento del percentil 99 o el valor de cambio referencia que ponen de manifiesto como sólo el uso de forma óptima de estos inmunoanálisis posee claras ventajas clínicas en el diagnóstico del IAM.

- **Dispositivos tipo Point-of-Care y multiplexación**

Como ya se ha observado en cada uno de los biomarcadores noveles descritos brevemente, su detección en combinación con los biomarcadores ya establecidos, conlleva la obtención de valores de diagnóstico, pronóstico y estratificación del riesgo, más valiosos. De esta forma se justifica como la multiplexación en los nuevos dispositivos de detección destinados a valorar las ECVs, es recomendable y hasta cierto punto necesaria. Así mismo, la multidetección de diferentes biomarcadores correspondientes a diferentes estados de la enfermedad puede proporcionarnos más información y de mayor calidad a la hora de realizar un diagnóstico/pronóstico más preciso, y así estratificar el riesgo cardiovascular.

Existen diferentes dispositivos tipo POC, los cuales en su gran mayoría son capaces de realizar multidetección de biomarcadores. Si bien es cierto, que gran parte de ellos se centra en la detección de biomarcadores cardíacos característicos de IAM, también son capaces de generar una respuesta en un corto período de tiempo, normalmente inferior a los 30 min. La gran mayoría de estos dispositivos están basados en ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (LFIC), o como se conocen más comunmente, ensayos en tira reactiva. En este caso, el soporte es una membrana de nitrocelulosa a través de la cual migran los diferentes inmunorreactivos por capilaridad. El marcador utilizado por excelencia en este tipo de dispositivos es el oro, de tal forma que los resultados son fácilmente visualizables. No obstante, también existen diferentes tipos de LFIC basados en técnicas de aglutinamiento, partículas de látex o marcadores fluorescentes.

En la Tabla 1.3 se resumen algunos de los dispositivos POC desarrollados y presentes en el mercado para la detección de diferentes biomarcadores utilizando en algunos casos muestra de sangre sin ningún tipo de pretratamiento.

**Tabla 1.3.** Características de algunos de los diferentes dispositivos tipo POC disponibles en el mercado. Adaptado de *Clin Biochem* 39:771 (2006)

Test	Casa Comercial	Biomarcador	Principio	Muestra	tiempo (min)
TROPT	Roche	cTnT	IA, partículas. Cualitativo	Sangre	15
Cardiac STATus	Spectral	Mioglobina (50 ng mL <sup>-1</sup> ), cTnI (1.5 ng mL <sup>-1</sup> ) CK-MB (5 ng mL <sup>-1</sup> )	IA, partículas. Cualitativo	Suero/Plasma/Sangre	15
Stratus CS	Dade Behring	Mioglobina (96-56 ng mL <sup>-1</sup> ), cTnI (0.6 ng mL <sup>-1</sup> ), CK-MB (3.5 ng mL <sup>-1</sup> )	IA, partículas. Cuantitativo	Suero/Plasma/Sangre	13
CARDIAC M-Test, CARDIAC T-Test, CARDIAC proBNP	Roche	Mioglobina, cTnT, Pro-BNP	IA, partículas. Cuantitativo	Sangre	8-12
RAMP Reader	Response Medical	Mioglobina, cTnI, CK-MB	Fluorescencia, cuantitativo	Sangre	10
Triage Cardiac Panel	Biosite	Mioglobina, cTnI, CK-MB, BNP	Fluorescencia, cuantitativo	Plasma/Sangre	10
AlphaDX	First Medical	Mioglobina, cTnI, CK-MB, CK	Fluorescencia, cuantitativo	Suero/Plasma/Sangre	20
i-STAT	Abbott	cTnI	IA en chip, cuantitativo	Sangre	10
Lifelite	ThauMDx	Mioglobina, cTnI, CK-MB	IA en chip, cuantitativo		

IA: Inmunoensayo

## 1.4 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido el de contribuir al desarrollo y mejora de las herramientas de diagnóstico y pronóstico cardiovascular disponibles actualmente. En este aspecto, se han seleccionado dos biomarcadores de etapas muy concretas de la ECV:

- La **Lipoproteína (a)**, característico de etapas iniciales e incipientes de la enfermedad cardiovascular. Para este biomarcador se han planteado el desarrollo de diferentes herramientas de inmunodetección para la cuantificación de la Lipoproteína (a) así como la cuantificación del riesgo determinado por el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2.
- La **troponina I cardíaca**, biomarcador de necrosis miocárdica, etapa ya tardía de la enfermedad, y considerada actualmente el biomarcador por excelencia para las ECVs. En concreto se han abordado diferentes y novedosos métodos de transducción para la detección de este biomarcador con el fin de alcanzar la detectabilidad establecida por las diferentes directrices clínicas.

De esta forma, los objetivos parciales planteados en esta tesis han sido,

- Producción de anticuerpos de alta afinidad contra la troponina I cardíaca
- Desarrollo de un inmunoensayo para la detección de troponina I cardíaca capaz de alcanzar al detectabilidad establecida por las diferentes directrices internacionales
- Producción de anticuerpos para la determinación de Lipoproteína (a) de forma selectiva
- Desarrollo de inmunoensayos para evaluar el riesgo cardíaco de la Lp(a)

## **2 Marco de Investigación y Estructura de la Tesis**

## 2.1 Proyectos de investigación

La tesis doctoral descrita en este manuscrito, se realizó dentro del contexto de dos proyectos,

- 1) **Proyecto Cajal4EU (Chip architectures by joint associated labs for European diagnostics).** *ENIAC (European Nanoelectronics Initiative Advisory Council) Joint Undertaking Action. Subprograma: Nanoelectronics for Health and Wellness. Programa Nacional de Internacionalización de la I+D. Subprograma de Fomento de la Cooperación Científica Internacional (FCCI) Plan E – Tipo ENIAC. ENIAC-120215.*

Este proyecto se encontraba enfocado en el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en nanomateriales electrónicos que permitieran el desarrollo de nuevas plataformas de biosensado que permitieran el diagnóstico in-vitro de un amplio panel de biomarcadores de forma robusta, de fácil manejo y bajo coste. Los principales resultados alcanzados en este proyecto fueron el número de diferentes tecnologías llevadas a cabo, incluyendo la biofuncionalización de materiales, la microfluídica desarrollada, así como los diferentes plataformas de software y hardware destinadas al control y manejo de los dispositivos producidos. Este proyecto se llevó a cabo mediante la estrecha colaboración tanto con usuarios finales de estos dispositivos como con compañías médicas, con el fin de valorar el impacto real de estas tecnologías en la economía y sociedad europea.

- 2) **Proyecto NANOCARDIOCOCO. Nanotecnología para la Cardiología y Pneumococo.** *MICINN, subdirección General de Estrategias de Colaboración Público-Privada IPT-2011-1337-010000.*

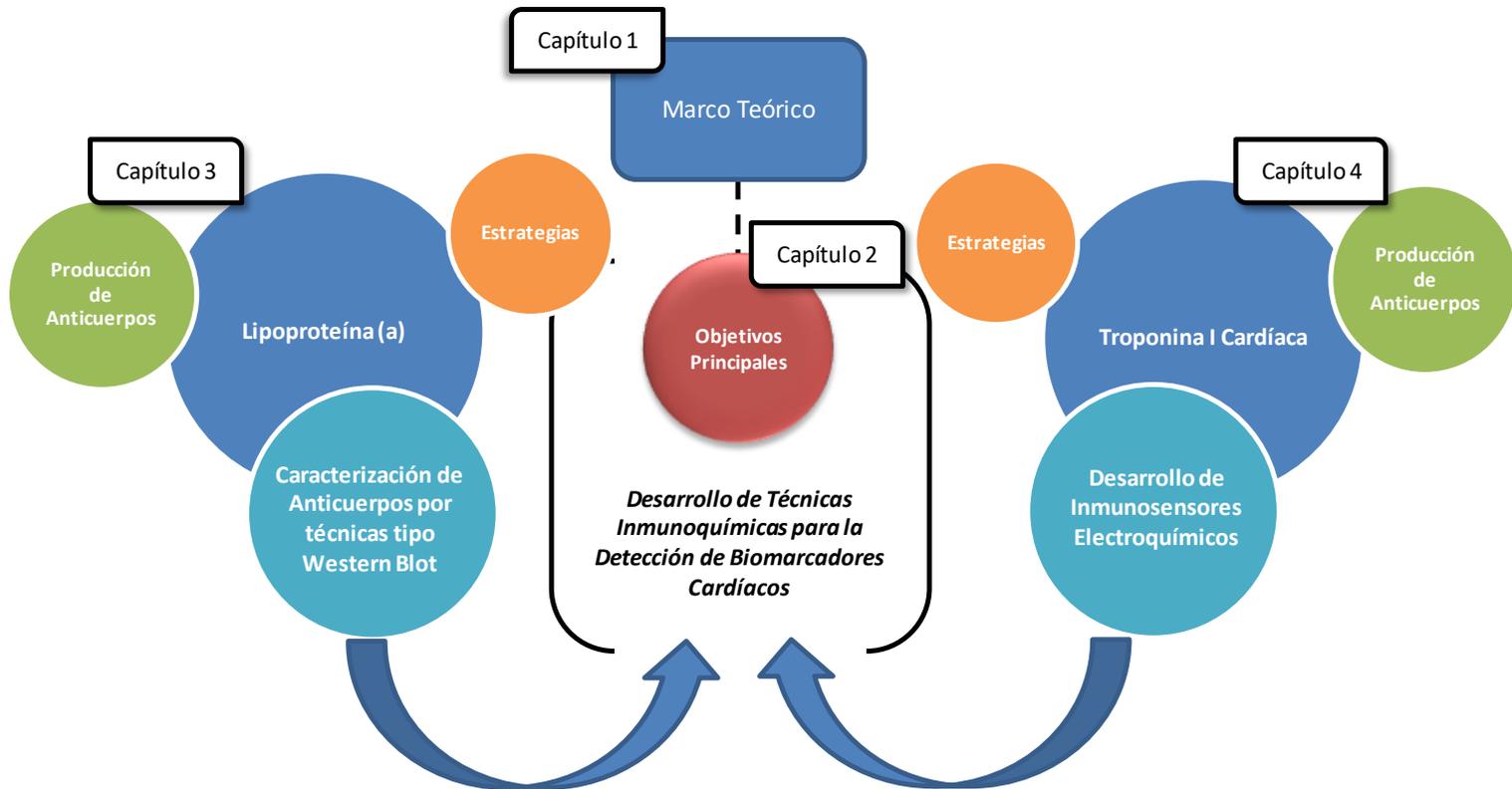
El principal objetivo de este proyecto se centraba en el desarrollo e integración de dos biosensores, uno enfocado al diagnóstico de enfermedades infecciosas, y otro relacionado con enfermedades cardiovasculares. En el caso de enfermedades infecciosas, el proyecto se centraba principalmente en el diagnóstico en tiempo real de este tipo de enfermedades en fases de riesgo avanzado. Para esto se seleccionó el *Staphylococcus pneumoniae* como modelo, ya que se trata de una bacteria que ocasiona diferentes tipos de

enfermedades infecciosas, desde la neumonía hasta la meningitis, otitis o sinusitis entre otras. Para el caso de las enfermedades cardiovasculares, se pretendía desarrollar un dispositivo capaz de detectar determinados biomarcadores predictores en el ámbito del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como es el caso de la Lipoproteína (a).

## **2.2 Estructura de la tesis**

Considerando los objetivos planteados en esta tesis y descritos en la sección 1.4, la estructura de la tesis se divide principalmente en dos bloques que pueden leerse de forma independiente. El primero aborda el desarrollo de un inmunoensayo para la detección de un biomarcador de riesgo cardíaco como la Lp(a) y por otro lado el desarrollo de un inmunosensor para la determinación de un biomarcador bien establecido de IMA como la troponina I.

En el capítulo 3 se aborda todo el trabajo relacionado con la Lp(a), principalmente centrado en la producción y caracterización de anticuerpos específicos para este biomarcador de etapas incipientes de ECV. Debido a que la descripción de cada capítulo se hace de forma lineal, contiene discusiones y conclusiones relacionadas con el trabajo desarrollado, que se han ido extrayendo en cada paso que se ha realizado, y analizando cada resultado obtenido con el fin de plantear de forma coherente el siguiente. En el capítulo 4 se describe todo el trabajo realizado en torno a la inmunodetección de la cTnI y las diferentes estrategias llevadas a cabo con el fin de intentar alcanzar una detectabilidad comparable a la establecida por las Guías Clínicas. En el capítulo 5 pueden encontrarse las aportaciones más importantes que se han alcanzado en cada capítulo, así como un breve resumen de las conclusiones a las que se han llegado en cada caso. Mientras que en capítulo 6 se recoge toda la parte experimental desarrollada en esta tesis, así como los diferentes protocolos seguidos, en el capítulo 7 encontramos la bibliografía en la cual se ha apoyado todo el trabajo desarrollado. Finalmente, en el capítulo 8 encontramos la sección donde se describen todos los acrónimos utilizados en este texto. En la Figura 2.1 se recoge de forma esquemática, un resumen de los diferentes capítulos y secciones que conforman esta tesis.



**Figura 2.1.** Esquema de la tesis donde figuran los dos principales bloques formados por el capítulo 3 y el 4. En cada uno de ellos se remarcan algunas de las diferentes etapas seguidas

### **3 Lipoproteína (a)**

---

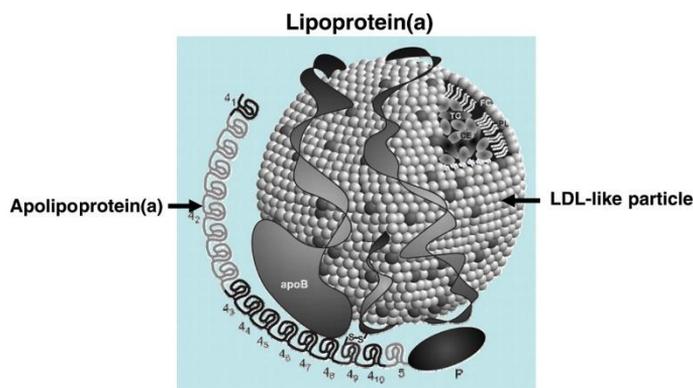
## 3.1 Introducción

La Lipoproteína (a) o Lp(a), fue descubierta en el 1963 por Kåre Berg<sup>55</sup> como consecuencia de la búsqueda de nuevas  $\beta$ -lipoproteínas humanas. Tras inocular la fracción aislada de las  $\beta$ -lipoproteínas humanas a conejos, y tras evaluar la respuesta de los anticuerpos producidos frente a diferentes muestras de plasma humano, aproximadamente un tercio de los individuos presentó un antígeno nuevo, el antígeno (a). Con el paso del tiempo, se vislumbró que este antígeno (a) era la Lp(a). Ensayos posteriores demostraron que la Lp(a) está presente si no en toda, en gran parte de la población y que se expresa en un gran amplio rango de concentraciones, desde menos de 0.1 a más de 200 mg dL<sup>-1</sup>, según diferentes individuos<sup>56-59</sup>.

### 3.1.1 Estructura de la Lp(a)

Desde el punto de vista estructural, la Lp(a) (véase Figura 3.1) es una partícula de la familia de las lipoproteínas, similar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que, a diferencia de éstas, contiene una apolipoproteína llamada apolipoproteína (a), o apo(a), unida mediante un puente disulfuro a la Apolipoproteína B-100 o apoB100<sup>60</sup>.

El estudio tanto estructural como químico-físico de ambos componentes proteicos de la Lp(a), no fue posible llevarlo a cabo hasta que se elucidó que ambas proteínas se encontraban unidas por un puente disulfuro<sup>60-62</sup>. De esta forma, mediante el tratamiento adecuado de la Lp(a) con agentes reductivos y el posterior paso de separación por técnicas de ultracentrifugación o cromatografía de afinidad por heparina, fue posible aislar de forma selectiva la apoB100 de la apo(a)<sup>61, 63</sup>. A partir de entonces han sido muchos los trabajos centrados en el estudio y caracterización de la Lp(a), mediante el análisis profundamente detallado de ambas apolipoproteínas que la conforman, especialmente de la apo(a)<sup>64-66</sup>.



**Figura 3.1.** Esquema donde se representa la Lipoproteína (a), formada por una partícula tipo LDL enlazada covalentemente a través de un puente disulfuro a la apolipoproteína (a). La partícula tipo LDL está constituida por un núcleo lipídico formado por ésteres de colesterol y triglicéridos rodeados de fosfolípidos, colesterol libre y una única molécula de apoB100. Figura extraída de Nordestgaard *et al. European Heart Journal* (2010) 31, 2844–2853.

La apo(a) está codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 6, adyacente al gen responsable del plasminógeno<sup>67</sup>. La síntesis y secreción de la apo(a) presente en el suero, asociada con la apoB100, se realiza en el hígado y de forma independiente a la apoB100. Aunque aun no se ha esclarecido en que sitio tiene lugar el ensamblaje entre ambas proteínas, se ha observado mediante estudios realizados con hepatocitos aislados de mono, que la Lp(a) es segregada por estas células, abriendo el camino a pensar que la unión entre las dos componentes proteicas de la Lp(a) se podría llevar a cabo en los mismos hepatocitos<sup>68</sup>.

Por su parte, la apoB100 presente en la Lp(a), es una proteína con elevado carácter hidrofóbico e idéntica a la apoB que se encuentra en las LDL en lo que respecta al peso molecular, estructura secundaria, composición química y reactividad inmunoquímica. Así lo demuestra Gaubatz *et al.*<sup>69</sup>, donde la única diferencia significativa que encuentra entre la apoB100 y la LDL es el contenido en ácido siálico, siendo ligeramente inferior en el caso de esta última. La apoB100 cuenta con 4536 aminoácidos en su estructura y un peso molecular de 550.000 Da<sup>70</sup>. En el *Copenhagen City Heart Study* (CCHS), estudio realizado con más de 20.000 pacientes con sus inicios en el 1975, cuyo objetivo principal estaba centrado en las enfermedades cardiovasculares, causas y prevención, se llegaron a describir alrededor de 123 variantes genéticas de la apoB100<sup>71</sup>.



Este tipo de estructura denominada *kringle*, está presente en varias proteínas relacionadas con la cascada de coagulación de la sangre, de ahí, el elevado grado de homología en estructura y composición con el plasminógeno<sup>74</sup>, proteína plasmática cuya estructura también se caracteriza por poseer un dominio *kringle*, y que está involucrada en diferentes procesos de coagulación. Del mismo modo que en el plasminógeno, encontramos dos dominios bien diferenciados en la apo(a), un dominio proteasa cuyo grado de homología con el presente en el plasminógeno es de un 85%<sup>75</sup>, y un dominio tipo *kringle*, cuyo grado de homología con el plasminógeno es variable.

El dominio *kringle* de la apo(a) puede separarse en dos subdominios atendiendo a la homología que presentan con el plasminógeno. Un único dominio *kringle* 5, con un 82%<sup>75</sup> de homología con el plasminógeno, y un dominio *kringle* 4 con una homología variable de 61-75%<sup>75</sup>. De este modo, en la apo(a) encontramos diferente número de copias del *kringle* 4, semejantes entre ellas pero no idénticas, y cuya homología entre ellas se encuentra entre un 78 y un 88%<sup>76</sup>. Encontramos una única copia de los *kringles* 4 tipo 1 (k4.1), así como de los *kringles* 4 tipo 3 al 10 (k4.3 - k4.10). No obstante, pueden contemplarse diferente número de copias del *kringle* 4 tipo 2 (k4.2), de 3 a 40 (véase Figura 3.2), siendo causa directa, junto con el grado de glicosilación de la elevada heterología que presenta la apo(a)<sup>77-78</sup>.

### 3.1.2 Metabolismo de la Lp(a)

A pesar de las similitudes existentes entre la Lp(a) y la LDL, hay que destacar que la Lp(a) es metabólicamente distinta al resto de proteínas. A diferencia de la LDL, la Lp(a) no aparece como un subproducto consecuente del metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)<sup>79</sup>. No obstante, sí que está descrito que la Lp(a) puede encontrarse asociada a partículas con elevada carga de triglicéridos, sobre todo en aquellos individuos que presentan hipertriglicemia<sup>80</sup>.

El efecto de diferentes fármacos, así como de determinadas dietas sobre la concentración de LDL y apoB100 en el cuerpo, actúan de diferente forma sobre la Lp(a), llegando a no presentar ningún efecto sobre ella<sup>81</sup>. De hecho, muchos de los fármacos destinados a controlar y reducir los niveles de LDL-colesterol en el organismo, tienen un efecto muy leve sobre los niveles de Lp(a), exceptuando

el caso del ácido nicotínico<sup>82</sup>. De igual forma, se ha demostrado que el esteroide anabolizante, estanozonol, es capaz de disminuir los niveles de Lp(a) sin tener efecto alguno sobre los de la apoB100<sup>83</sup>.

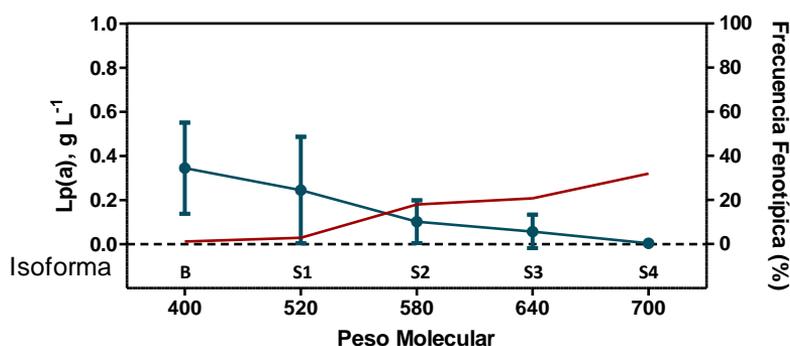
Si bien el anabolismo de la Lp(a) está relativamente descrito, del catabolismo todo son posibles hipótesis que apuntan a diferentes rutas de degradación, pero sin converger en ningún punto. Inicialmente se propuso que los responsables de la degradación de la Lp(a) eran los receptores de la LDL<sup>84</sup>, pero la afinidad de las partículas de Lp(a) hacia estos receptores es baja y desde luego, muy inferior a la que presentan las propias LDL, con lo que a priori no parece una ruta de degradación importante. Otra vía de degradación demostrada implica la acción de los macrófagos presentes en la pared arterial, que a través de determinados receptores son capaces de reconocer e internalizar la Lp(a), especialmente en su estado oxidado o bien modificado<sup>85</sup>. Por último, se ha sugerido la vía catalítica que implica el desdoblamiento de la Lp(a) en sus dos partículas proteicas, atribuyendo a los receptores de la LDL la degradación de la parte correspondiente a la apoB100, no obstante, no se ha esclarecido aun que ocurriría con la apo(a) una vez separada de la apoB100.

### **3.1.3 Heterogeneidad, genética y distribución de la Lp(a)**

Los primeros estudios realizados por Utermann y colaboradores<sup>86-87</sup> permitieron diferenciar hasta 6 isoformas diferentes de apo(a). Estas isoformas fueron caracterizadas mediante técnicas de electroforesis en gel SDS-PAGE, designándole a cada una de ellas una etiqueta diferente, F, B, S1, S2, S3 y S4, de acuerdo con su movilidad relativa en comparación con la apoB100. Siendo la isoforma etiquetada como F la de movilidad más rápida y la etiquetada como B, de semejante movilidad a la apoB100, mientras que las 4 isoformas etiquetadas como S mostraban una movilidad más lenta que la propia apoB100. Se observó que estas isoformas presentaban pesos moleculares comprendidos entre 400 y 700 kDa. Posteriormente, un estudio sobre una población de 629 individuos realizado por Gaubatz *et al.*<sup>88</sup>, reveló la existencia de 11 isoformas de la apo(a), elucidadas mediante técnicas de electroforesis y Western blot, comprendidas entre pesos moleculares de 419 y 838 kDa. Observándose que un 60% de las muestras evaluadas mostraba una sola banda de apo(a), mientras que alrededor de un 39% mostraban dos bandas y sólo un 1% no mostraban banda de apo(a)

detectable. Del mismo modo, en este estudio se estableció una correlación inversa entre la concentración de Lp(a) en plasma y la diversidad polimórfica de la apo(a), viendo que aquellos individuos que presentaban una concentración de Lp(a) más baja, tenían una isoforma de apo(a) de mayor peso molecular.

Estas observaciones junto con otros estudios realizados por Utermann *et al.*<sup>89</sup> pusieron de manifiesto que la concentración de Lp(a) en plasma está determinada por la isoforma o tamaño de la apo(a), y consecuentemente controlada a nivel genético en cada individuo (véase Figura 3.3).

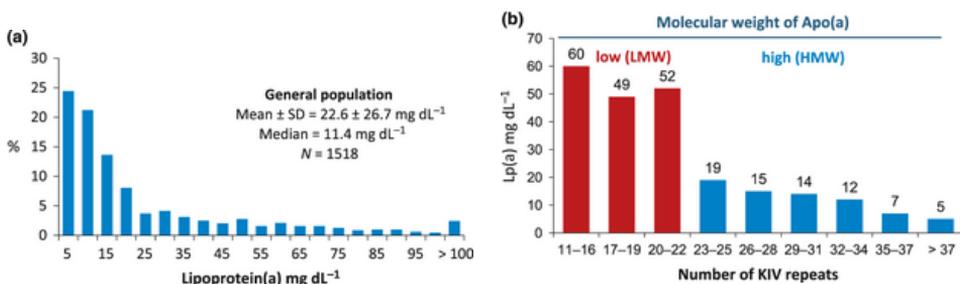


**Figura 3.3.** Diferentes isoformas de la apo(a) junto con su peso molecular estimado, y su frecuencia fenotípica, relacionadas con la concentración de Lp(a) (valor medio  $\pm$  SD) en plasma, de población Austríaca sana determinada por Utermann. Como puede observarse, existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de la isoforma y la concentración de Lp(a) en plasma. Imagen adaptada de J.J. Albers *et al. Clin. Chem.* 36/12, 2019-2026 (1990).

Estudios recientes enfocados en determinar la predisposición genética a desarrollar enfermedades cardiovasculares, han determinado la existencia de un clúster genético formado por la agrupación de 27 genes localizados en el cromosoma 6q26, cuya asociación con enfermedad coronaria es significativa. El cromosoma 6q26 incluye la región donde se encuentra el gen LPA responsable de la codificación de la apo(a), y es este gen el que determina el número de copias del *kringle* k4.2, pudiendo llegar a encontrar desde 3 hasta 40 copias, y por tanto la isoforma de la apo(a), lo que se traduce en la elevada heterogeneidad en el tamaño de la Lp(a)<sup>90</sup> (véase Figura 3.4, a).

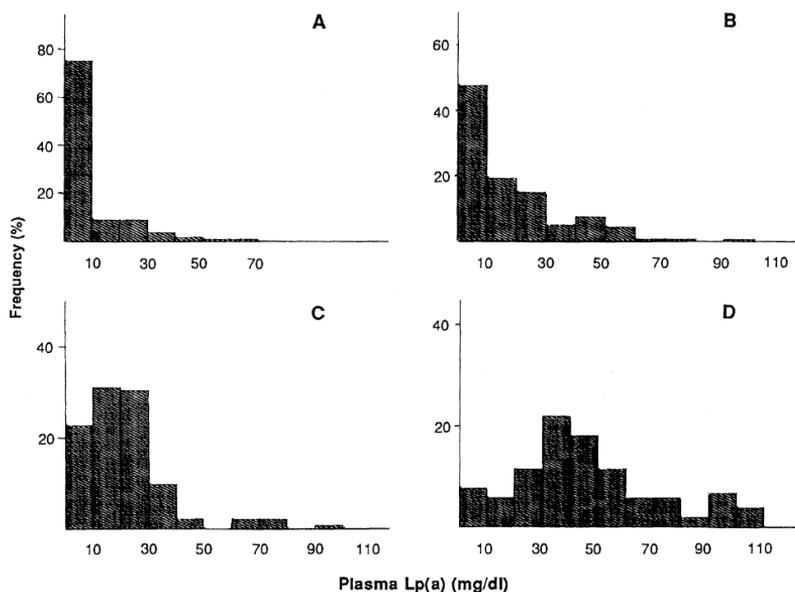
La distribución en los niveles de Lp(a) en la población mundial es muy amplia y a la vez muy desequilibrada. Encontrando distribuciones de concentración de Lp(a) muy variadas dentro de una misma población. Por ejemplo, en la Figura 3.4 se

muestran los niveles de Lp(a) establecidos para una población de 1518 individuos pertenecientes todos al continente europeo, donde se encuentran niveles desde 5 hasta más de 100 mg dL<sup>-1</sup> 91.



**Figura 3.4.** (a) Distribución de las diferentes concentraciones de Lp(a) pertenecientes a una muestra poblacional procedente de Europa. (b) Concentración promedio de varios grupos de individuos clasificada según el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2, considerándose isoformas de bajo peso molecular (LMW) aquellas que poseen entre 11 y 22 repeticiones, mientras que aquellas que presentan más de 22 repeticiones se consideran isoformas de elevado peso molecular (HMW). Se aprecia la relación inversamente proporcional entre el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2 y la concentración de Lp(a). Imagen adaptada de F. Kronenberg & G. Utermann, *Journal of Internal Medicine*, 2013, 273; 6–30.

Por su parte, la distribución de la Lp(a) entre diferentes grupos étnicos es muy desigual. Mientras que, en la mayor parte de la población caucásica, se encuentran niveles de Lp(a) menores a 1 mg dL<sup>-1</sup>, con un promedio alrededor de 15 mg dL<sup>-1</sup>, en otras poblaciones étnicas, como la afroamericana, la africana o la China de Singapur, la distribución es completamente diferente (véase Figura 3.5, pág. 39).



**Figura 3.5.** Distribución de la concentración de Lp(a) en plasma para diferentes grupos étnicos. La concentración de Lp(a) está expresada en mg/dL, fue establecida mediante técnicas de electroinmunodifusión. (A) Étnia china de Singapur ( $n = 112$ , concentración promedio de Lp(a), 7.0 mg/dL). (B) Población Caucásica ( $n = 162$ , concentración promedio de Lp(a) 15 mg/dL). (C) Población India de Sigapur ( $n = 145$ , concentración promedio de Lp(a) 20 mg/dL). (D) Población sudanesa ( $n = 105$ , concentración promedio de Lp(a) 45.7 mg/dL). Imagen adaptada de *Gerd Utermann, Science Vol 246 No. 4932 (Nov. 17, 1898) pp. 904-910.*

### 3.1.1 Lp(a) y riesgo cardiovascular

El hecho de que actualmente exista un consenso a nivel científico y clínico de que la Lp(a) sea un biomarcador independiente de riesgo cardiovascular puede explicarse atendiendo a las diferentes hipótesis planteadas sobre su función fisiológica. Si bien es cierto que son numerosos los estudios que confirman la estrecha relación que existe entre elevadas concentraciones de Lp(a) con la probabilidad de desarrollar o sufrir algún episodio coronario o bien cerebrovascular<sup>90, 92-97</sup>, la función de esta macromolécula está aun por esclarecer. De hecho, gran parte de las hipótesis planteadas acaban por explicar la patogenia relacionada con la Lp(a), en lugar de su función.

Para dar respuesta a esta incógnita, la mayoría de los trabajos se centran inicialmente en la elevada homología que presenta la apo(a) con el plasminógeno. Partiendo de este hecho, se sugieren dos formas de acción de la Lp(a), (i) la Lp(a) actúa como molécula de enlace entre el sistema encargado de transportar colesterol a los tejidos y el sistema que controla los procesos de fibrinólisis, y (ii) la Lp(a) actúa como reguladora entre los diferentes fenómenos que ocurren durante los procesos de coagulación y fibrinólisis<sup>91</sup>. Numerosos trabajos han corroborado mediante estudios *in vitro* esta última hipótesis, demostrando que la Lp(a) interfiere en muchos de los procesos implicados con los fenómenos de coagulación y fibrinólisis<sup>98</sup>. Las diferentes funciones de la Lp(a) documentadas, describen interacciones con gran número de receptores, compitiendo por los receptores del plasminógeno con los del fibrinógeno y de la fibrina, y consecuentemente favoreciendo diferentes procesos de inhibición de ciertos factores de coagulación relacionados con el plasminógeno, llegándose a demostrar que los dominios *kringle* 4 tipo 7 y 8 están relacionados directamente con todos estos procesos<sup>99</sup>. Del mismo modo, la Lp(a) a través de la apo(a) también es capaz de interactuar con diferentes receptores de la matriz extracelular, como es el caso de la fibrina. La interacción Lp(a)-fibrina ha sido propuesta como mecanismo de respuesta de la Lp(a) frente a la aparición de lesiones vasculares con el fin de evitar la invasión celular por parte de diferentes patógenos infecciosos y de reparar la agresión provocada<sup>100</sup>. No obstante, esta acción, *a priori* beneficiosa, posee un efecto secundario no tan deseable, puesto que mediante este tipo de mecanismos se ha observado que la Lp(a) es capaz de liberar colesterol en los sitios donde se ha producido una lesión o herida, contribuyendo de esta forma a un aumento de la placa esclerótica y a su vez inhibiendo el efecto de la fibrinólisis y promoviendo de esta forma la trombogénesis<sup>101-102</sup>. Así pues, se demuestra que el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular aterosclerótica atribuido a altas concentraciones de Lp(a), es independiente del efecto de otras lipoproteínas.

Es posible encontrar datos, proporcionados por la *Lipoprotein (a) Foundation*, que ponen de manifiesto el riesgo cardiovascular asociado a esta lipoproteína<sup>103</sup>,

- Se estima que un 8% de la población sometida a pruebas tradicionales de medida de colesterol no son diagnosticadas correctamente, a pesar de tener un elevado riesgo cardiovascular debido a niveles altos de Lp(a).

Haciéndose de esta forma necesario un test específico en sangre para la detección y cuantificación de esta lipoproteína<sup>104</sup>.

- Se estima que, a nivel global, 1 de cada 5 personas posee niveles altos de Lp(a) determinados por su dotación genética (63 millones de personas en USA), y consecuentemente con riesgo cardiovascular<sup>102</sup>.
- La Lp(a) se considera uno de los factores genéticos más sólidos para determinar el riesgo de sufrir enfermedades coronarias y de estenosis aórtica<sup>105-106</sup>.
- Se estima que el desarrollo de una técnica de diagnóstico fiable para la detección de Lp(a), podría ayudar a prevenir hasta 120.000 casos relacionados con ECVs cada año<sup>107</sup>.

Si bien es cierto que no existe un nivel basal bien definido de Lp(a), debido a la elevada heterogeneidad poblacional que presenta esta lipoproteína, sí que hay recomendaciones presentes en diferentes ensayos clínicos donde se sugiere a partir de qué niveles de Lp(a) en sangre, la probabilidad de desarrollar algún tipo de episodio cardio y cerebrovascular es mayor. De esta forma se establece según estudio realizado por Albers *et al.*<sup>108</sup>, que el percentil 90 y 95 de la Lp(a) referente a una población sana, se encuentra entre 35 y 48 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que otros estudios basados en la *Copenhagen City Heart Study (CCHS)*, de *Copenhagen General Population Study (CGPS)*, donde 40000 individuos fueron genotipados para el *kringle* k4.2, recomiendan establecer el percentil 80 como valor de referencia, siendo éste de 50 mg dL<sup>-1</sup><sup>102</sup>.

### 3.1.2 Técnicas inmunoquímicas para la determinación de Lp(a)

Desde su descubrimiento en el año 1963 hasta finales de la década de los 70, la Lp(a) no despertó cierto interés clínico debido a que, hasta esta fecha, no se había establecido su relación directa con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y tampoco se había definido como un factor de riesgo cardiovascular independiente. Es desde entonces que empiezan a surgir diferentes aproximaciones inmunoquímicas, como inmunodifusión radial y electroinmunodifusión<sup>58, 109-110</sup>, radioinmunoensayo<sup>108</sup> y técnicas de inmunonefelometría<sup>111-112</sup>, junto con un gran número de técnicas tipo ELISA<sup>110, 113-125</sup>, desempeñadas con el mismo objetivo, determinar Lp(a).

Centrando la atención sobre los ensayos tipo ELISA desarrollados para la detección de la Lp(a), cabe destacar que el principal reto en este caso no reside en la detectabilidad que es recomendable alcanzar (ya que gran parte de estas técnicas para la detección de este tipo de lipoproteína se mueve en el orden de 1 ng<sup>126</sup>), si no en la capacidad de desarrollar un inmunoensayo específico y cuya respuesta sea independiente de la heterogeneidad que presenta la propia Lp(a). A estos requisitos se le suma el hecho de que actualmente no existe un estándar de Lp(a) normalizado y bien establecido, con lo que la calibración y la validación de los inmunoensayos desarrollados son también un punto crítico a tener en consideración.

Encontramos en la literatura diferentes inmunoensayos basados en el uso de anticuerpos policlonales contra diferentes partes de la proteína, y en especial contra la apo(a). Este es el caso de Abe *et al.*<sup>113</sup>, Fless *et al.*<sup>115</sup> y Albers y colaboradores<sup>108</sup>, siendo este último un inmunoensayo basado en marcadores radioactivos. Del mismo modo, encontramos inmunoensayos comerciales que también hacen uso de anticuerpos policlonales generados contra la apo(a), como es el caso del ensayo MACRA<sup>®</sup>, donde el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal anti apo(a). Este tipo de estrategias, se ha demostrado que tienden a subestimar el valor de Lp(a) de aquellas muestras que presentan isoformas de Lp(a) de bajo peso molecular, así como sobrestimar aquellas cuya Lp(a) presente isoformas de menor peso molecular. Este efecto se ve reflejado en el trabajo desarrollado por Taddei-Petters *et al.*<sup>121</sup>. El inmunoensayo desarrollado en este estudio hace uso de un anticuerpo monoclonal específico anti apo(a), mientras que el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal anti apoB100. De este modo, y al contrario que los ensayos citados anteriormente, la detección depende de un anticuerpo que no es sensible a la heterogeneidad que presenta la Lp(a), evitando así la aparición de artefactos indeseados.

El efecto que ejerce la heterogeneidad de la apo(a) sobre la inmunodetección de la Lp(a) y la precisión de los inmunoensayos, ha sido estudiado en profundidad por Marcovina *et al.*<sup>127</sup>. En este trabajo se demuestra la variabilidad de los resultados para una misma muestra dependiendo del tándem anticuerpo captura/anticuerpo detección utilizados, y la posibilidad de disminuir la incertidumbre de los resultados mediante el uso de anticuerpos que no sean sensibles al polimorfismo de la apo(a).

La selección del inmunógeno para la producción de anticuerpos monoclonales también puede ser un paso crítico. El uso más extendido en la bibliografía es el de utilizar la propia Lp(a) como inmunógeno tras su aislamiento y purificación<sup>114, 117, 121-122</sup>. Los clones obtenidos de esta forma son evaluados frente a diferentes antígenos, principalmente Lp(a), plasminógeno y LDL, seleccionando finalmente aquellos que muestran mayor especificidad en relación al reconocimiento de la Lp(a), y cuyo epítipo consecuentemente se encuentra en la apo(a). Esta estrategia permite la selección de anticuerpos específicos para la Lp(a) reduciendo significativamente la reactividad cruzada con el plasminógeno. No obstante se pueden encontrar trabajos como el realizado por Guo *et al.*<sup>116</sup>, donde tras el paso de reducción de la Lp(a) son capaces de aislar la apo(a) y utilizarla como inmunógeno. Al contrario de lo que se puede pensar, esta estrategia conlleva ciertos riesgos ya que, como ocurre en este caso, los anticuerpos desarrollados tan solo son capaces de detectar la Lp(a) cuando se trata previamente con un agente reductor como el Ditioneitol (DTT), poniendo de manifiesto que los epítipos responsables de la interacción Ag-Ab no se encuentran accesibles en la forma nativa de la Lp(a).

Otro factor, fuente de incertidumbre y de falta de precisión entre los diferentes ensayos desarrollados, es el uso de un determinado estándar en el desarrollo y calibración del inmunoensayo. De este modo, el factor clave reside en la capacidad de preparación de un estándar/calibrador de referencia universal, transferible y aplicable a todos los inmunoensayos destinados a la detección y cuantificación de Lp(a). Tal y como describe Marcovina *et al.*<sup>128</sup>, es imprescindible determinar la masa absoluta de la Lp(a) presente en el estándar, con el fin de establecer esa Lp(a) como un calibrador y consecuentemente poder expresar los valores encontrados de Lp(a) en las muestras en unidades de masa total. El uso de un estándar de Lp(a) diferente al que tengamos presente en la muestra puede dar lugar a valores erróneos en la cuantificación de la Lp(a). No obstante, la determinación de la masa absoluta de la Lp(a) no está únicamente ligada a la componente proteica de esta molécula, que ya de *per se* es variable entre individuos, si no a la carga lipídica y el grado de glicosilación que presenta. En este sentido, todos aquellos métodos inmunoquímicos para la cuantificación de Lp(a), basados en el reconocimiento de la apo(a) y que expresan el resultado en términos de masa total de partícula, no tienen en consideración todos los factores de variabilidad asociados a la existencia de diferentes isoformas de la apo(a). Tal y como explica Marcovina *et al.*, si asumimos que cada molécula de

Lp(a) está formada por una única molécula de apoB100 asociada a una única molécula de apo(a), la relación apo(a)/apoB100 en masa puede variar de 0.51 a 1.3 para una apo(a) de peso molecular entre 280 y 710 kDa, respectivamente. Por este motivo principalmente, se hace necesario que la composición del estándar sea lo más parecido a la composición de la muestra, y actualmente para la Lp(a) esta tarea sigue siendo imposible de realizar. Si bien es cierto que el uso de un estándar de Lp(a) con una única isoforma de apo(a) de tamaño intermedio, o bien un conjunto formado por diferentes moléculas de Lp(a) con diferentes rangos de isoformas, podría minimizar las diferencias existentes entre los diferentes inmunoensayos. La composición del estándar, calibrador o material de referencia no deja de ser actualmente, una elección arbitraria.

En la literatura encontramos diferentes aproximaciones dirigidas a minimizar este tipo de efectos. Vu Dac *et al.*<sup>122</sup> hace uso de un conjunto de Lp(a) de diferentes isoformas (50 pacientes) de forma que sea lo más representativo posible respecto a la variedad presente en las muestras. En cambio Duvic *et al.*<sup>114</sup> y Wong *et al.*<sup>123</sup> hacen uso de la propia Lp(a) aislada y utilizada como inmunógeno, para caracterizar el ensayo. En definitiva, tal y como se muestra en el trabajo desarrollado por Taddei-Petters y colaboradores<sup>121</sup>, dada la propia naturaleza compleja de la Lp(a), es importante caracterizar el estándar en términos de concentración total de Lp(a) y de fenotipado de la apo(a).

Respecto a la cuantificación del número de copias del *k4.2*, causantes del polimorfismo que presenta la Lp(a), no se encuentran descritos inmunoensayos en microplaca destinados a este efecto. El método más extendido para la determinación del tipo de isoforma de la apo(a) es la electroforesis en gel<sup>129-130</sup>, en algunos casos seguida de análisis tipo Western blot<sup>131</sup>. De esta forma tan solo es posible determinar el peso molecular de esta isoforma, pero no el número de copias del k4.2. Actualmente existen diferentes métodos más precisos destinados a la cuantificación del número de repeticiones del k4.2, como son, las técnicas de electroforesis de campo pulsado (PFGE) seguidas de Southern blot de DNA<sup>132-133</sup>, y las técnicas cuantitativas de PCR (qPCR)<sup>1, 134</sup>. No obstante, el método más preciso hasta ahora es el de la hibridación fluorescente *in situ* (Fiber-FISH), basado en el estudio de la estructura y función de los cromosomas a través de la hibridación de sondas con marcaje fluorescente permitiendo de esta forma la visualización y distinción de los cromosomas de interés. En este estudio desarrollado por Erdel *et al.*<sup>135</sup>, utilizan sondas de DNA marcadas con

fluoresceína y complementarias a las secuencias presentes en el gen LPA KIV-2, responsable del número de copias del k4.2, y haciendo posible la determinación de éstas.

### 3.1.3 Objetivos

A pesar de los diferentes métodos descritos en el apartado anterior para la detección de la Lp(a), tanto los reportados en la literatura como los que actualmente pueden encontrarse en el mercado son pocos los que están dirigidos a estimar o cuantificar el número de repeticiones del k4.2, siendo, tal como ya se ha comentado antes, las técnicas de electroforesis y Western blot<sup>130-131, 136-138</sup>, las más habituales para la determinación del tamaño de la apo(a) así como para la estimación del número de repeticiones de este *kringle*. Por otro lado, la mayoría de los inmunoensayos para la determinación de Lp(a) son sensibles a las repeticiones de k4.2, lo que da lugar a discordancias en las medidas por los motivos anteriormente comentados. Este escenario fue principalmente la fuente de motivación para plantear nuestro objetivo.

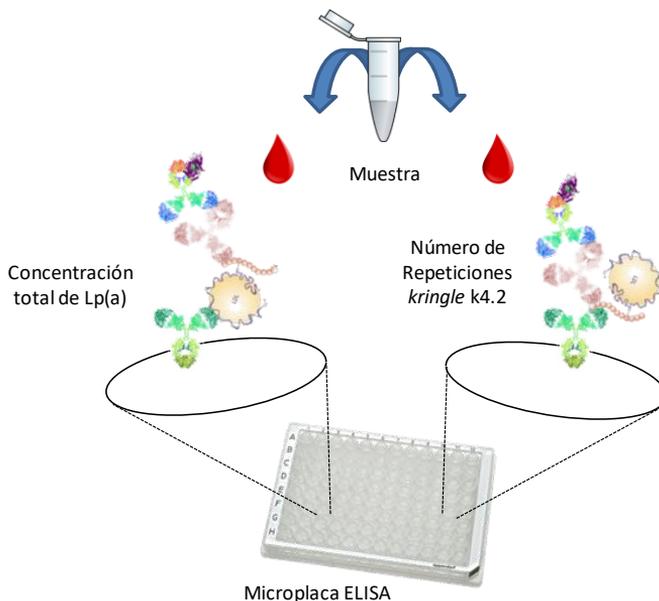
#### Objetivo General

Desarrollo de una **herramienta inmunoquímica de diagnóstico** capaz de proporcionar información, lo más fiable posible, de la **concentración de Lp(a)**, y a la vez del **número de *kringles* 4 tipo 2**.

Con este fin, se plantearon dos objetivos concretos,

- Primero, el **desarrollo de un inmunoensayo para la detección y cuantificación de la Lp(a)** de una forma eficaz y fiable en muestras clínicas. Para esto, tal y como se describirá detalladamente en la siguiente sección, era primordial que la respuesta de los anticuerpos utilizados no fuera dependiente de la inherente heterología que presenta la Lp(a).
- Segundo, el **desarrollo de un inmunoensayo capaz de cuantificar el número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2 de la apo(a)**. Como se ha explicado anteriormente, la reiteración de este *kringle* está íntimamente relacionada con la trombogénesis, lo que confiere de este modo un interés clínico bastante relevante.

Con estos objetivos, planteábamos la idea de desarrollar una herramienta de diagnóstico en la que para cada muestra se pudieran realizar dos medidas simultáneas, una que proporcionaría datos objetivos sobre la concentración de Lp(a) y otra, en la que se obtendría una respuesta proporcional al número de *kringles* 4.2 (véase Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Esquema representativo donde se muestra el planteamiento propuesto para el desarrollo de una técnica inmunoquímica tipo ELISA capaz de determinar de forma simultánea, la concentración total de Lp(a) y el número de repeticiones del kringe k4.2 de una misma muestra.

## 3.2 Estrategias para el desarrollo de técnicas de diagnóstico para la Lp(a)

Se plantearon una serie de estrategias basadas en la producción de anticuerpos específicos para la determinación de la Lp(a) mediante el diseño racional de los inmunógenos. Con el fin de desarrollar exitosamente esta tarea, dependemos en primera estancia de la calidad de los anticuerpos producidos, y por tanto del criterio de selección de unos inmunógenos y haptenos frente a otros. No obstante, en el caso de la Lp(a) debemos atender también a otro criterio, la falta de un estándar de Lp(a) normalizado y homologado. En base a todo lo

anteriormente expuesto, en el desarrollo de esta técnica de diagnóstico, había que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

**1. Los anticuerpos utilizados deben presentar un grado de especificidad elevado por la Lp(a).**

En el caso de producir anticuerpos contra la apo(a), había que considerar que el dominio *kringle* de la apo(a) guarda un elevado grado de homología con el dominio *kringle* tipo 4 del plasminógeno (sección 3.1.1). Algunos de los trabajos publicados para la detección de la Lp(a) están basados en el uso de anticuerpos policlonales generados directamente contra la apo (a). En muchos casos, con la finalidad de eliminar la posible reactividad cruzada con la apoB100 libre y con otras lipoproteínas que contienen dicha macromolécula (como las partículas tipo LDL o VLDL), los anticuerpos son purificados por cromatografía de inmovilización de anticuerpos, descartando la fracción responsable del reconocimiento de la LDL y aislando por completo tan solo la fracción de anticuerpos que reconocen la apo(a)<sup>113, 121</sup>. No obstante, este tipo de estrategias no eliminan la reactividad cruzada con el plasminógeno, por lo que todas las técnicas inmunológicas desarrolladas de esta forma deben demostrar que los anticuerpos utilizados para la detección de la Lp(a) no crosreaccionan con el plasminógeno. Con la intención de eliminar este reconocimiento cruzado con el plasminógeno, se han descrito varios trabajos donde el anticuerpo de captura utilizado es un anticuerpo contra la apo(a), mientras que como anticuerpo de detección se utiliza un anticuerpo producido contra la apoB100. Esta aproximación permite en un principio eliminar el problema de la especificidad y, además teniendo en cuenta el problema de la estandarización de la Lp(a), permite la expresión de los resultados en unidades de molaridad<sup>115, 139</sup>.

Otra posible estrategia sería producir anticuerpos contra la apo(a) previamente aislada de la Lp(a) mediante el uso de diferentes agentes reductores, y posteriormente purificada<sup>64</sup>. No obstante, el reconocimiento de la Lp(a) por parte de estos anticuerpos se ve considerablemente afectado. Esto se debe principalmente a que tras el tratamiento de la Lp(a) con el agente reductor, los puentes disulfuro que estabilizan las estructuras *kringle* también se rompen, cambiando la estructura conformacional de la apo(a) y consecuentemente afectando a su inmunodetección<sup>114, 116, 140</sup>.

## **2. Las características estructurales del analito deben ser iguales a las del compuesto utilizado como inmunógeno**

Considerando el alto grado de variabilidad de la Lp(a) mencionado anteriormente es difícil conseguir un estándar que pueda ser utilizado como calibrador universal. Así pues, los anticuerpos generados contra el *kringle* k4.2 generarán mayor respuesta en aquellos individuos con moléculas de Lp(a) con mayor número de repeticiones de este *kringle*, lo que puede conducir a una sobrestimación de la concentración de Lp(a). Por el contrario, aquellos individuos con moléculas de Lp(a) de menor tamaño (menor número de *kringles* 4 tipo 2) la concentración de este biomarcador podría subestimarse.

## **3. La falta de un material de referencia apropiado no garantiza la consistencia y la comparabilidad entre resultados.**

La concentración de Lp(a) se suele expresar en miligramos por decilitro<sup>58, 108, 141</sup>. No obstante, determinar la masa exacta del estándar de referencia es sumamente complicado debido a que deben considerarse la aportación de diferentes factores a la masa total de la Lp(a), como los asociados a la parte proteica, lipídica y los carbohidratos. Considerando la alta variabilidad en la composición química de la Lp(a), este ejercicio resulta prácticamente imposible de llevar a cabo. Diferentes estrategias se han propuesto para abordar esta problemática, como es el caso del uso de un péptido sintético bien caracterizado de la apo(a), para su uso como estándar, siempre y cuando su reactividad inmunológica sea comparable a la de la apo(a) presente en la muestra. No obstante, este estándar más allá de la posibilidad de estar bien caracterizado, perdería su interés en aquellos inmunoensayos que utilizan anticuerpos contra la apoB100. Todos los métodos inmunoquímicos para la detección de Lp(a) que implican el uso de anticuerpos específicos contra la apo(a), y expresan los resultados en términos de masa total de proteína o proteína total, no tienen en consideración las diferencias de masa existentes entre las diferentes isoformas de la apo(a), y consecuentemente de la Lp(a).

Actualmente, la polémica referente al estándar para la calibración de los inmunoensayos para la detección de Lp(a) sigue siendo un problema pendiente de consenso por parte de la comunidad científica. En este aspecto, Marcovina SM y colaboradores, tras la puesta en evidencia de dicha discordancia entre los

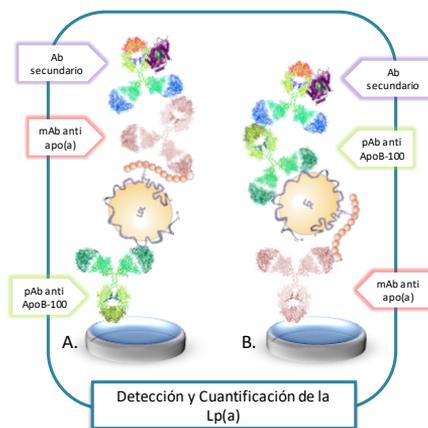
diferentes ensayos publicados, trabajaron en contacto con la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* con el fin de establecer, tras varias etapas, un estándar válido para los inmunoensayos de la Lp(a)<sup>142</sup>. En este trabajo se pone en evidencia que es de especial utilidad que el estándar de Lp(a) quede bien definido en términos de masa total y número de repeticiones del *kringle* k4.2 y que, tras ser evaluado como calibrador por diferentes ensayos destinados a la detección de Lp(a) con diferentes muestras, la precisión y variabilidad inter-ensayo para las diferentes muestras sea significativamente baja. Finalmente se concluye que, el material de referencia propuesto es capaz de unificar los valores de Lp(a) de los diferentes métodos analíticos evaluados si y solo si, éstos no se ven afectados por la heterogeneidad de la apo(a). En cambio, para aquellos ensayos cuya detección de Lp(a) es sensible a las diferentes isoformas de la apo(a), encontrar un estándar válido es aun una tarea pendiente<sup>142-143</sup>.

Debido a la falta de un estándar homologado y normalizado para la calibración de ensayos para la Lp(a), se sugieren dos estrategias con el fin de minimizar los posibles errores cometidos en la inmunodetección de la Lp(a) y descritos anteriormente, (a) el uso de una Lp(a) única cuya apo(a) sea una isoforma de tamaño intermedio, (b) el uso de un estándar que contenga una distribución representativa de las diferentes isoformas existentes de la apo(a), para de esta forma, minimizar las diferencias entre las diferentes muestras de Lp(a) medidas.

En esta tesis, tras considerar estas observaciones se abordó el reto que constituye el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de Lp(a) y la cuantificación del número de *kringles* k4.2, planteándose diferentes estrategias basadas en la inmunodetección de esta proteína e intentando evitar, para la cuantificación de la Lp(a), el uso de anticuerpos sensibles a las diferentes isoformas existentes de la apo(a). Así mismo, con el fin de minimizar los posibles efectos asociados a esta heterología, se decidió utilizar un calibrador formado por una mezcla de diferentes Lp(a) con diferentes isoformas. De esta forma, las diferentes estrategias planteadas para alcanzar los objetivos principales detallados en el apartado anterior se describen a continuación.

### 3.2.1 ELISA para la detección y cuantificación de la Lp(a) total

Con el fin de detectar y cuantificar la Lp(a) presente en suero o plasma humano, se planteó el desarrollo de un ELISA tipo sándwich, tal y como se ilustra en la Figura 3.7. Inicialmente se plantearon dos opciones. En la primera de ellas (véase Figura 3.7, A), se propuso el uso de un anticuerpo anti apoB100 como anticuerpo de captura, y como anticuerpo de detección uno generado contra una secuencia peptídica de uno de los *kringles*. Mediante el uso de este formato, no obstante válido, nos exponíamos a capturar otras lipoproteínas que contienen la misma apoB100, como es el caso de la LDL y la VLDL<sup>144</sup>, lo que podría resultar en una disminución de la sensibilidad, a pesar de que el de detección si sería específica para la Lp(a). En cuanto a la segunda opción planteada (véase Figura 3.7, B), el orden de los anticuerpos sería inverso, es decir, como anticuerpo de captura se utilizaría el anticuerpo anti *kringle* 4 el cual capturaría exclusivamente la Lp(a) y como anticuerpo de detección se utilizaría el anticuerpo anti apoB100. El anticuerpo contra el *kringle* se escogería en base a una secuencia conservada de la proteína, de tal manera que no se viese afectada por la heterología inherente de la misma.



**Figura 3.7.** Esquema donde se representan las diferentes propuestas de ensayo para la detección y cuantificación de la Lp(a). A) Formato donde el anticuerpo de captura correspondería a un anticuerpo policlonal contra la apoB100 y el anticuerpo de detección, un anticuerpo monoclonal contra una zona de la apo(a) no variable ente individuos. B) el anticuerpo monoclonal actuaría como anticuerpo de captura, mientras que el policlonal anti-apoB100 lo haría como anticuerpo de detección.

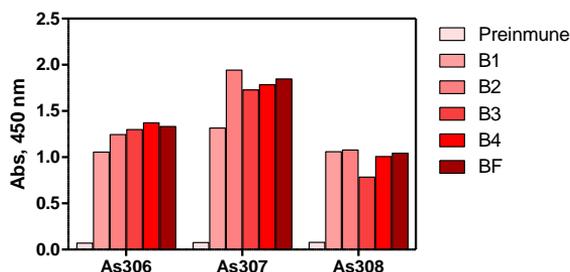


2. Desarrollar técnicas inmunoquímicas de análisis para,
  - 2.1. La cuantificación de Lp(a) total
  - 2.2. La cuantificación de kringles k4.2
3. Establecer un sistema inmunoquímico para la obtención simultánea de la información relativa a la concentración de Lp(a) y del número de repeticiones del k4.2
4. Implementar estas tecnologías al análisis de muestras clínicas complejas,
  - 4.1. Realización de estudios de validación con muestras clínicas

Adicionalmente, consideramos que sería bueno, a nivel compartivo disponer de una técnica de detección de Lp(a) similar a los ensayos reportados o que ya existen en el mercado. El grupo de investigación disponía de anticuerpos comerciales (pAbAD1, pAbAD2 y pAbAD3) producidos en cabra contra una secuencia peptídica sintética de la apo(a), proporcionados por la empresa Audit Diagnostics LTD (Cork, Ireland) fruto de un proyecto previo en colaboración con esta empresa. Así pues, como se verá más adelante, estos anticuerpos fueron utilizados en combinación con los nuestros para establecer un ELISA para Lp(a).

### **3.3.1 Producción de anticuerpos policlonales contra la Apolipoproteína B-100**

Para la producción de anticuerpos contra la apoB100, se seleccionó como inmunógeno la propia lipoproteína purificada (> 95 % SDS-PAGE) y aislada. Se inmunizaron tres conejos tipo New Zealand (306, 307 y 308) siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio (véase sección 6.4.2, pág. 191). La evolución de título de anticuerpos se evaluó mediante el uso de un ELISA indirecto no competitivo (véase sección 6.6.1, pág. 207) en el que las microplacas se tapizaban con apoB100. Como puede apreciarse en la Figura 3.9, en todos los casos la avidéz de los anticuerpos a lo largo del proceso de inmunización fue creciendo o bien manteniéndose en el mismo orden.



**Figura 3.9.** Evolución del título de anticuerpos de los antisueros As306, As307 y As308. Para  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de apoB100 tapizado, la respuesta mostrada corresponde a diluciones 1/16000 de cada antisuero.

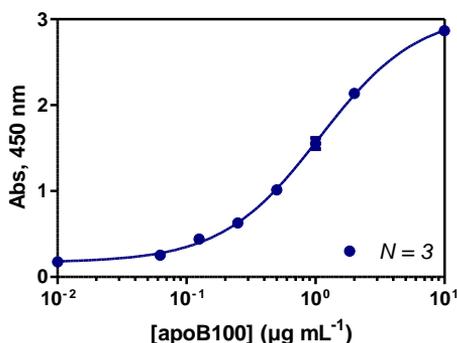
### 3.3.2 Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA para la detección y cuantificación de apoB100

Una vez finalizado el proceso de inmunización, los anticuerpos generados se caracterizaron desarrollando un ELISA de tipo sándwich. Inicialmente, mediante ensayos tipo ELISA 2D, se seleccionaron la combinación anticuerpos de captura/anticuerpo de detección más apropiada, y se establecieron las concentraciones óptimas de cada anticuerpo, el de captura y el de detección. Seguidamente se realizó la curva de calibrado.

Puesto que en ambos casos se trata de anticuerpos policlonales de conejo era imposible realizar la detección mediante el empleo de una anti IgG marcada con peroxidasa (anti IgG-HRP), por lo que fue necesario el marcaje con biotina del anticuerpo de detección (pAb306-B, pAb307-B y pAb308-B) y posterior utilización de estreptavidina (Sav) unida a peroxidasa (Sav-HRP) para generar la señal colorimétrica. De esta manera la Sav-HRP tan solo reconocería el anticuerpo de detección. El procedimiento utilizado para la purificación y marcaje de los anticuerpos con biotina se encuentra descrito en la parte experimental de esta memoria (véase sección 6.4.4, pág. 195).

Finalmente, se seleccionó el antisuero As306 como anticuerpo de captura, y el anticuerpo pAb307-B, como anticuerpo de detección. La Figura 3.10 muestra la curva de calibración obtenida, mientras que los parámetros analíticos se encuentran en la Tabla 3.1. Como puede observarse, el inmunoensayo desarrollado es capaz de alcanzar para la apoB límites de detección en PBST muy

bajos ( $0.015 \text{ mg dL}^{-1}$ ), si consideramos que los niveles deseables de apoB100 para individuos de alto riesgo están alrededor de  $70 \text{ mg dL}^{-1}$ , mientras que, para aquellos de riesgo alto, alrededor de los  $100 \text{ mg dL}^{-1}$  <sup>145-146</sup>. Este hecho tiene la ventaja de que, puesto que las muestras clínicas deberán diluirse en tampón para situarlas en el intervalo de medida del ELISA, los posibles efectos inespecíficos que pudiera causar la matriz quedarían minimizados. Además, el inmunoensayo desarrollado se trata de un ELISA rápido y fácilmente automatizable.



**Figura 3.10.** Curva de calibración para la apoB100 (en 10 mM PBS-T) obtenida utilizando la combinación As306 a una dilución 1/16000 y pAb307-B a  $0.3125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , como Ascaptura/pAbdetección. Los datos mostrados corresponden al promedio de ensayos realizados en tres días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por duplicado.

**Tabla 3.1.** Parámetros analíticos del ELISA para apoB100

<b>Apolipoproteína B-100</b>	
<b>As de Captura</b>	As306
<b>pAb de Detección</b>	pAb307-Biotina
<b>Abs<sub>máx</sub></b>	$3.08 \pm 0.15$
<b>Abs<sub>mín</sub></b>	$0.17 \pm 0.03$
<b>Pendiente</b>	$1.14 \pm 0.02$
<b>R<sup>2</sup></b>	$0.997 \pm 0.003$
<b>IC50 (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	$1.08 \pm 0.08$
<b>Rango de trabajo (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	$(0.29 \pm 0.02) - (2.71 \pm 0.17)$
<b>LD (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	$0.15 \pm 0.01$

El ELISA tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección As306/pAb307-B. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste sigmoide empleando la ecuación de  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoide y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. Cada punto corresponde al promedio de ensayos realizados en tres días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por duplicado. La curva de calibrado para la apoB100 se preparó en 10 mM PBS-T (PBS pH 7.5 0.05 % Tween).

Respecto de otros ensayos reportados o disponibles comercialmente para apoB100, este ensayo tan solo requiere de 2 h para obtener una respuesta cuantificable y además no utiliza ningún marcaje por radioisótopos, como es el caso de algunos ensayos disponibles comercialmente<sup>147</sup>.

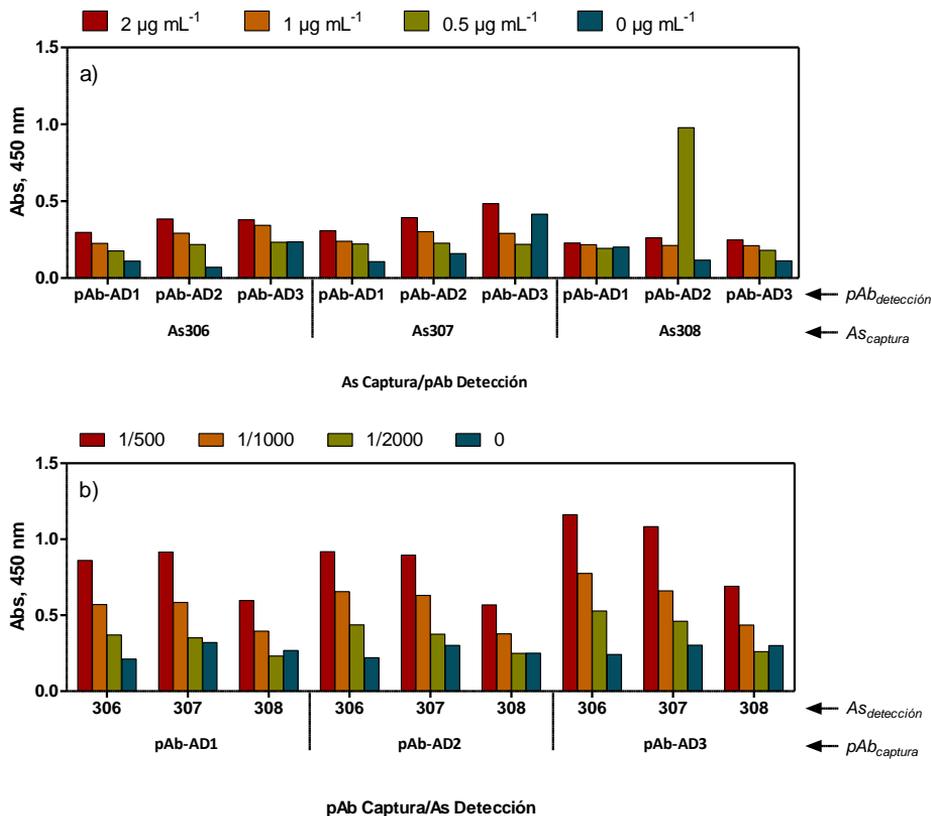
### **3.3.3 Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA para la detección y cuantificación de Lp(a) en muestras clínicas mediante el uso de anticuerpos comerciales**

Con el fin de tener un ensayo de referencia, se decidió desarrollar un ELISA tipo sándwich para la determinación de Lp(a). A su vez, este ensayo permitiría caracterizar los anticuerpos policlonales producidos en el contexto de esta tesis contra la apoB100 en presencia de suero humano, mediante el uso combinado con los anticuerpos comerciales descritos anteriormente.

#### **3.3.3.1 Determinación de las condiciones de ensayo. Adsorción inespecífica de la Lp(a).**

Inicialmente se evaluaron los anticuerpos policlonales As306, As307 y As308 anti apoB100 en combinación con los anticuerpos comerciales anti apo(a) disponibles pAbAD1, pAbAD2 y pAbAD3. Se contemplaron las dos opciones posibles en cuanto a su uso como anticuerpos de captura o de detección con el fin de determinar que combinación era la óptima para desarrollar la recta de calibrado para la Lp(a). La selección se hizo en base a evaluar la señal y el ruido de fondo (señal en ausencia de Lp(a)) de cada combinación. Cuando los anticuerpos policlonales anti apoB100 actuaban como anticuerpos de captura, la respuesta en presencia de Lp(a) era muy baja (Figura 3.11, gráfico a). En cambio, en el formato opuesto la relación señal/ruido era mucho más favorable (véase Figura 3.11, gráfico b). A la vista de estos resultados se escogió el sistema formado por el anticuerpo anti apo(a) pAbAD3 como anticuerpo de captura, y el antisuero As306 anti apoB100 como anticuerpo de detección; si bien era preocupante el elevado ruido de fondo. Tal y como describen Fless *et al.*<sup>115</sup>, el fenómeno de adsorción inespecífica tanto de la Lp(a) como de la LDL se conseguía minimizar significativamente mediante la incorporación de 0.5 NaCl y 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> al tampón de lavado.

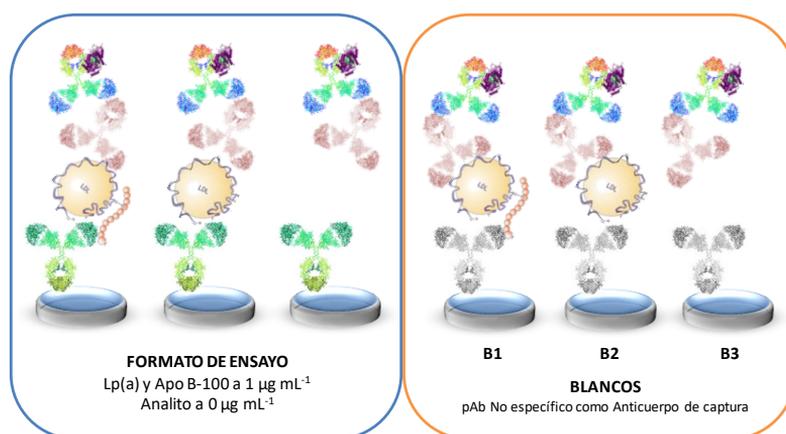
Por otro lado, es conocido que la concentración de sales del medio afecta a las interacciones de carácter hidrofóbico<sup>148-150</sup>. En base a estos precedentes se decidió evaluar el efecto de tampones con diferentes fuerzas iónicas. Con el mismo objetivo, se evaluó también el efecto de la presencia de diferentes aditivos (leche en polvo, BSA, caseína, gelatina y aminodextrano) conocidos como agentes de bloqueo.



**Figura 3.11.** Gráficos donde se muestran los resultados para el screening en ambos formatos. a) Se utilizaron los antisueros anti apoB100 306, 307 y 308 como anticuerpos de captura mientras que los anticuerpos, pAbAD1, pAbAD2 y pAbAD3, como anticuerpos de detección a 3 concentraciones diferentes y un 0 de Lp(a). b) Se utilizaron los anticuerpos pAbAD1, pAbAD2 y pAbAD3 anti apo(a) como anticuerpos de captura mientras que los antisueros producidos contra la apoB100, 306, 307 y 308, como anticuerpos de detección a 3 diluciones diferentes y un 0 de Lp(a).

### 3.3.3.2 Efecto de la concentración de sales y de los agentes bloquantes sobre las señales no específicas

En la Figura 3.12 se muestra el diseño experimental seguido. Se plantearon una serie de experimentos control en los que se utiliza como anticuerpo de captura, un anticuerpo pre-inmune y por lo tanto si capacidad unirse al analito. Como anticuerpo de detección se empleó As306 contra apoB100. Cada uno de estos experimentos control iban dirigidos a conocer el origen de la señal inespecífica observada, la cual podría proceder de la adsorción inespecífica de la Lp(a) (**B1**), de la fracción de apoB100 (**B2**), cosa probable dado su carácter hidrofóbico, o de la unión inespecífica del anticuerpo de detección o del segundo anticuerpo (**B3**). Así se realizaron en paralelo experimentos en los que, en una misma microplaca, se inmovilizaban en diferentes pocillos el anticuerpo específico de captura (pAbAD3) o el preinmune. A continuación se añadía Lp(a) y la apoB100 preparadas en tampones de diferente composición, o tan solo tampón (véase sección 6.6.4, pág. 209).



**Figura 3.12.** Diseño experimental planteado para valorar la adsorción inespecífica de la Lp(a), así como de la apoB100 al poliestireno de la microplaca, bajo diferentes condiciones. Tanto la Lp(a) como la apoB100 se evaluaron a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Los tampones en los que se prepararon tanto la Lp(a) como la apoB100 fueron, tampones 10 mM PBS-T en la que las concentraciones de NaCl entre 0 y 54.8 mM y de KCl entre 0 y 10.8 mM (véase Tabla 3.2). A su vez, estos mismos estudios se realizaron añadiendo a los tampones los agentes de bloqueo antes mencionados.

Los resultados en tampón sin aditivos muestran como la concentración de sales afecta la señal, particularmente en el caso de la apoB100 donde la señal queda inhibida en gran medida con el aumento de la fuerza iónica (véase barras azules en Figura 3.13, gráfica a). Igualmente, para la señal de los blancos (véase B2, barras naranjas en Figura 3.13, gráfica a). Así, cuando el tampón presenta una fuerza iónica de 28.7 mS/cm, la señal inespecífica de la apoB100 es prácticamente nula; no obstante, en estas condiciones parece que la Lp(a) podría tener tendencia a absorberse inespecíficamente a la placa u otras proteínas preentes en la muestra (véase barra naranja B1, Figura 3.13, grafico a). En la gráfica también puede observarse que no hay en ningún caso adsorción inespecífica por parte del anticuerpo de detección o el anticuerpo secundario. En cualquier caso, estos resultados parecen indicar que variando tan solo la concentración de sales no se consigue mejorar significativamente la relación señal/ruido para la detección de Lp(a)

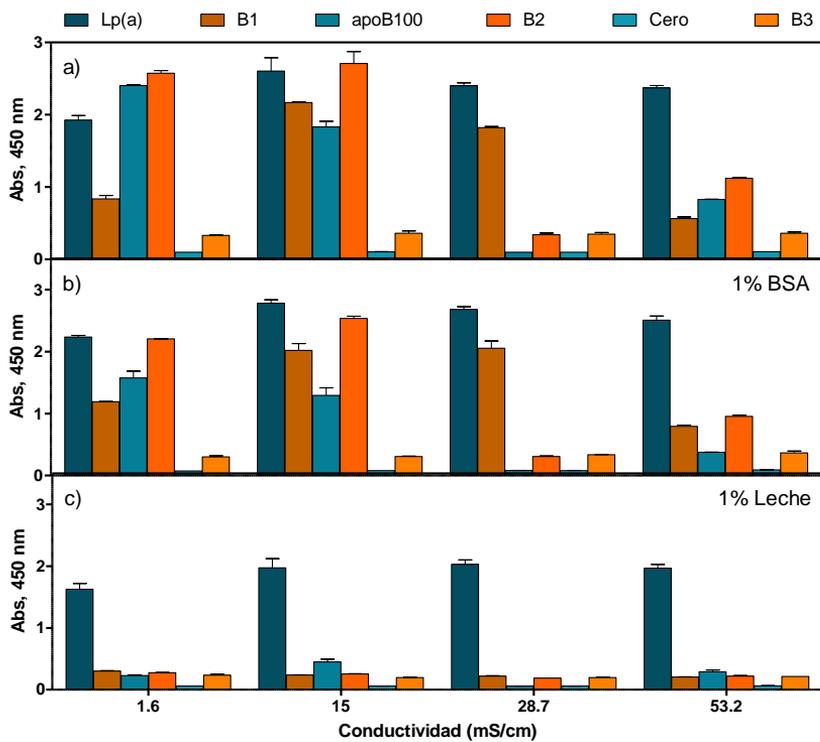
El estudio de adicionar agentes bloqueantes en el tampón del ensayo revelaron que tan solo la caseína al 0.2 % (Figura 3.13, f) o bien la leche en polvo al 1 % (Figura 3.13, grafico c) conseguían minimizar las señales no específicas de forma efectiva. El hecho de que se observe un efecto semejante en ambos casos, sugiere que es la caseína presente en la leche la que elimina por completo las adsorciones inespecíficas.

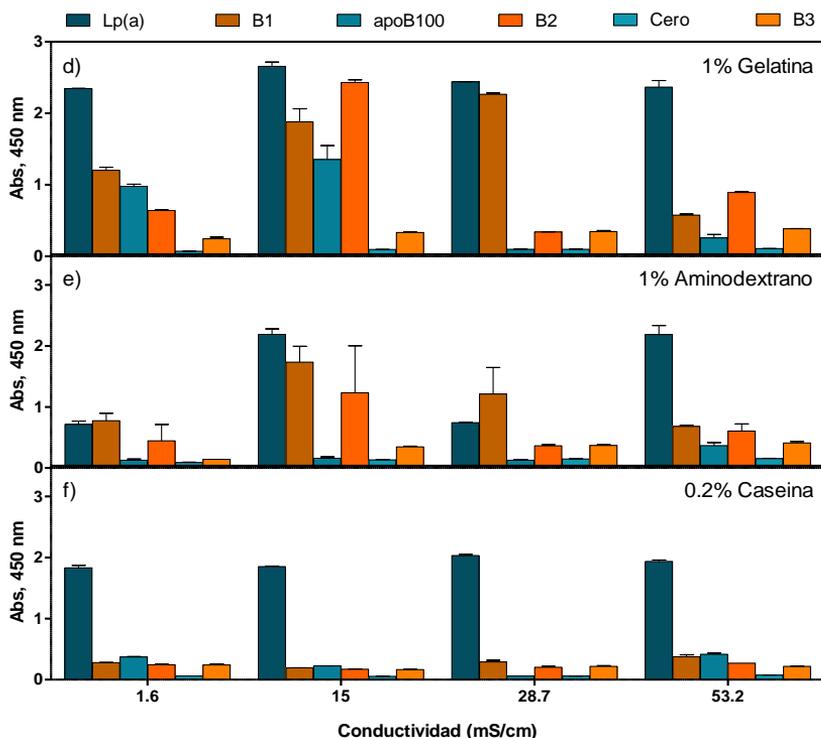
En base a estos resultados se escogió el tampón 10 mM PBS-T en el que la concentración de sales era de 27.4 y 5.4 mM para NaCl y KCl, respectivamente (28.7 mS/cm) y con un 1% de leche en polvo, como tampón del ensayo de Lp(a).

**Tabla 3.2.** Concentración de NaCl y KCl, y valores de conductividad correspondientes a cada tampón evaluado.

Tampón	[NaCl] (mM)	[KCl] (mM)	Conductividad (mS/cm)
10 mM PB-T	0	0	1.6
10 mM PBS-T	13.7	2.7	15
10 mM PB 2xS-T	27.4	5.4	28.7
10 mM PB 4xS-T	54.8	10.8	53.2

*Tampón fostafo salino a una concentración de 10 mM y 0.05% de Tween y a diferentes concentraciones de NaCl/KCl*



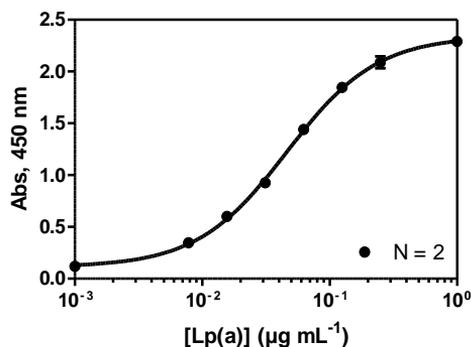


**Figura 3.13.** Resultados obtenidos para los diferentes tampones evaluados con el fin de evitar adsorciones inespecíficas de la Lp(a) y de la apoB100 a la microplaca. a) Evaluación de diferentes tampones con diferentes fuerzas iónicas. b) Evaluación de los tampones de a) pero con un 1 % de BSA, c) 1 % Leche, d) 1 % Gelatina, e) 1 % Aminodextrano y por último f) 0.2 % Caseína. En todos los casos se tapizó el anticuerpos tanto específico como inespecífico a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , la Lp(a) y la apoB100 se evaluaron en cada medio a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la dilución de trabajo del antisuero de detección As306 fue de  $1/4000$  en todos los casos.

### 3.3.3.3 Caracterización del inmunoensayo en placa para la Lp(a)

Con esta información y habiendo seleccionado la pareja de anticuerpos pAbAD3 y el As306 como captura y detección, respectivamente, se procedió a determinar las concentraciones óptimas de cada uno de estos anticuerpos mediante técnicas tipo ELISA 2D. Una vez seleccionadas se procedió a preparar curvas de calibrado con Lp(a) en el tampón del ensayo 10 mM PB 2xS-T pH 7.5 y 0.05 % Tween (véase sección 6.6.4, pág. 209). En las condiciones establecidas la curva de calibrado reveló que el ensayo podía alcanzar un límite de detección de  $8 \pm 1 \text{ ng mL}^{-1}$  (véase Figura 3.14 y Tabla 3.3). Considerando que el *cutoff* recomendado en 2010 por la *European Atherosclerosis Society Consensus Panel* para la detección de Lp(a)

es de  $50 \text{ mg dL}^{-1}$ , el cual se sitúa aproximadamente en el percentil 80 de la población Danesa<sup>102</sup>, el ensayo establecido podría *a priori* detectar Lp(a) muy por debajo de los niveles establecidos para determinar riesgo para infarto de miocardio. Faltava conocer el comportamiento del ensayo en muestras clínicas complejas, como podría ser el suero, pero antes queríamos conocer su especificidad.



**Figura 3.14.** Curva de calibrado para la Lp(a) correspondiente al promedio de dos días diferentes. Se utilizó como anticuerpo de captura el pAbAD3 anti apo(a) a  $1.25 \text{ µg mL}^{-1}$ , y como anticuerpo de captura el As306 anti apoB100 a una dilución 1/1000. Cada punto se realizó con su correspondiente tríplica.

**Tabla 3.3.** Parámetros analíticos del ELISA de Lp(a).

Lipoproteína (a)	
As de Captura	pAbAD3
pAb de Detección	As306
Abs <sub>máx</sub>	$2.342 \pm 0.064$
Abs <sub>mín</sub>	$0.107 \pm 0.005$
Pendiente	$1.211 \pm 0.059$
R <sup>2</sup>	$0.995 \pm 0.002$
IC50 ( $\text{µg mL}^{-1}$ )	$0.047 \pm 0.005$
Rango de trabajo ( $\text{µg mL}^{-1}$ )	$(0.015 \pm 0.002) - (0.139 \pm 0.031)$
LD ( $\text{µg mL}^{-1}$ )	$0.008 \pm 0.001$

El ELISA tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección pAbAD3/As306. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste sigmoide empleando la ecuación de  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoide y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. Cada punto corresponde al promedio de ensayos realizados en dos días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por triplicado. La curva de calibrado para la Lp(a) se preparó en 10 mM PBS-T 1% Leche con una conductividad de  $28.7 \text{ mS/cm}$ .

### 3.3.3.4 Estudios de especificidad

Se prepararon curvas de calibrado en el tampón de ensayo con Lp(a), plasminógeno y apoB100 (sección 3.3.3.3) y se ajustaron a la ecuación sigmoideal antes mencionada. Con los parámetros analíticos obtenidos se calculó la reactividad cruzada para cada compuesto de acuerdo con la ecuación,  $IC_{50} [nM] (Lp(a))/IC_{50} [nM] (\text{crosreactante}) \times 100$ . En la Tabla 3.4 se muestran los valores obtenidos para cada proteína, donde puede observarse que el ELISA desarrollado para la Lp(a) es específico siendo la interferencia de las proteínas estudiadas inferior al 10%

**Tabla 3.4.** Valores de reactividad cruzada para la apoB100 y el plasminógeno en el inmunoensayo desarrollado para la Lp(a).

Proteína	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> (nm) <sup>a</sup>	% CR <sup>b</sup>
<b>Lipoproteína (a)</b>	0.047	0.05	100
<b>apoB100</b>	0.769	1.40	3.6
<b>plasminógeno</b>	0.615	6.83	0.73

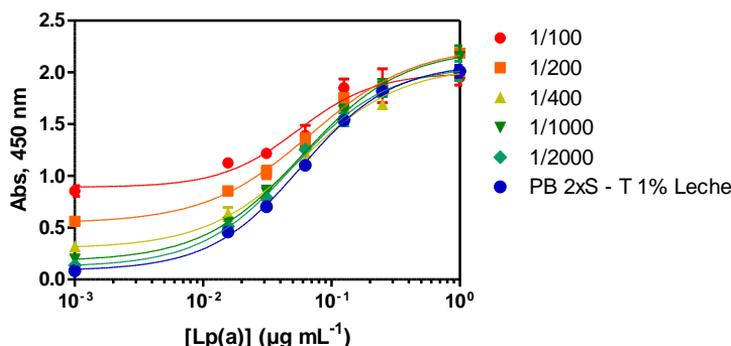
<sup>a</sup> La concentración en unidades de molaridad para la Lp(a) se calculó tomando como peso molecular promedio el de 939 kDa, que corresponde a un peso molecular de la apo(a) promedio de 389 kDa.

<sup>b</sup> El valor de la reactividad cruzada está expresado como la relación entre los valores de IC<sub>50</sub> de la Lp(a) y la proteína problema.

### 3.3.3.5 Evaluación de la robustez del inmunoensayo en presencia de suero humano

Las muestra clínicas son matrices complejas con muchos componentes, además del biomarcador que queremos determinar, que podrían interferir en la reacción antígeno/anticuerpo y por lo tanto en la respuesta del ensayo de forma no específica. El objetivo de estos estudios era conocer la extensión del efecto de la matriz, en concreto suero humano. Para ello se prepararon diferentes diluciones de éste con el tampón del ensayo (1/100, 1/200, 1/400, 1/1000 y 1/2000) y se utilizaron para preparar curvas de calibrado de la Lp(a) (Figura 3.15). Idealmente estos estudios deberían realizarse con muestras blancas, es decir muestras que no tuvieran el biomacador que estamos estudiando. No obstante, fue imposible encontrar fuentes comerciales de un suero humano de referencia con concentración 0 de Lp(a). Por lo tanto, había que tener en cuenta que los sueros utilizados en estos estudios podrían proporcionar cierta respuesta específica debido a la Lp(a) intrínseca.

Como resultado de la colaboración con el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) pudimos tener acceso a 10 muestras de pacientes bien caracterizadas y de concentración de Lp(a) por debajo de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo que podría considerarse niveles basales bajos; por lo que considerando la elevada detectabilidad de nuestro ensayo, se consideró que un pool de éstas podrían ser utilizadas como una matriz cercana a lo que conocemos como “matriz blanca”. De este modo, se prepararon curvas de calibrado en este pool (concentración final estimada de Lp(a) de aproximadamente  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se midieron en el ELISA que habíamos desarrollado. Teniendo en cuenta los parámetros analíticos de la Tabla 3.5 se puede deducir que para evitar una respuesta específica procedente de los niveles basales de este pool, la matriz tendría que diluirse al menos cerca de 340 veces.



**Figura 3.15.** Distintas curvas de calibrado para la Lp(a) a distintas concentraciones de suero humano (pool de muestras proporcionadas por IACS). Para todos los casos se utilizó como anticuerpo de captura el pAbAD3 anti apo(a) a  $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y como anticuerpo de captura el As306 anti apoB100 a una dilución 1/1000.

La Figura 3.15 muestra los resultados de este estudio en los que es posible apreciar, que tal como esperábamos, se observaba cierta respuesta en el ELISA en aquellas curvas preparadas con suero a diluciones inferiores a 1/400. No obstante, a partir de esta dilución el efecto se minimiza considerablemente, y si se aplica una dilución 1/1000 a la muestra, esta respuesta es comparable a la respuesta basal, haciendo que las siguientes curvas a diluciones superiores sean comparables y semejantes (véanse los parámetros analíticos de las curvas preparadas en suero 1/1000 y 1/2000 en la Tabla 3.5). Si para la realización de medidas de Lp(a) escogiéramos una dilución 1/1000 de la muestra, el LOD del ELISA todavía estaría en  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ , muy por debajo del *cuttloff* recomendado por

la *European Atherosclerosis Society Consensus Panel* para la detección de Lp(a), que es de  $50 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Podemos pues afirmar que hemos desarrollado un ELISA para la Lp(a) que podría ser útil como herramienta de diagnóstico para la determinación de niveles de este biomarcador.

**Tabla 3.5.** Parámetros analíticos para las diferentes curvas de calibrado para la Lp(a) a diferentes concentraciones de suero humano<sup>a</sup>.

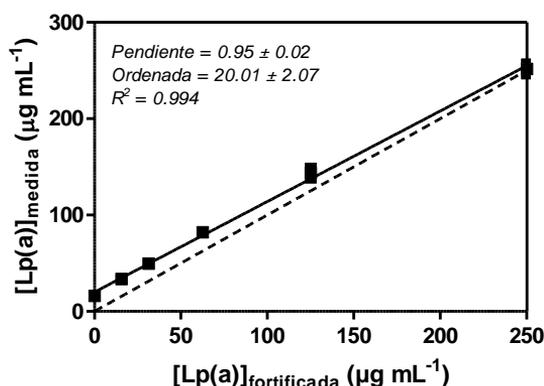
Parámetro	PB 2xS-T 1% Leche	Suero 1/1000 <sup>b</sup>	Suero 1/2000 <sup>b</sup>
<b>Abs máx</b>	$2.342 \pm 0.064$	$2.297 \pm 0.097$	$2.288 \pm 0.317$
<b>Abs mín</b>	$0.107 \pm 0.005$	$0.233 \pm 0.081$	$0.164 \pm 0.059$
<b>Pendiente</b>	$1.211 \pm 0.059$	$1.152 \pm 0.046$	$1.183 \pm 0.022$
<b>IC50 (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	$0.047 \pm 0.005$	$0.055 \pm 0.006$	$0.051 \pm 0.001$
<b>R<sup>2</sup></b>	$0.995 \pm 0.002$	$0.991 \pm 0.001$	$0.997 \pm 0.001$
<b>LD (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	$0.008 \pm 0.001$	$0.008 \pm 0.001$	$0.008 \pm 0.001$

<sup>a</sup> Valores promedio con su correspondiente desviación estándar de dos días diferentes. Cada curva se realizó con su correspondiente réplica. <sup>b</sup> Ambos ensayos realizados con suero humano a dos diluciones diferentes realizadas en el tampón de ensayo. Tampón PB 2xS-T 1% Leche es tampón PB 10 mM y 0.05% Tween con una conductividad de 28.7 mS/cm y un 1% en leche a pH 7.5. Las diluciones de suero se realizaron en este medio.

### 3.3.3.6 Evaluación de la exactitud del ELISA para la detección de Lp(a)

Para evaluar la exactitud del ensayo se hicieron una serie de medidas de muestras fortificadas en el laboratorio a concentraciones conocidas de Lp(a) (250, 125, 62.5, 31.25 y  $15.625 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estas muestras se prepararon directamente en “suero blanco” (pool IACS) para posteriormente, evaluarlas por ELISA a una dilución 1/1000.

Los resultados mostrados en la Figura 3.16 corresponden a la correlación establecida entre el valor de Lp(a) encontrado y el fortificado, obteniéndose una pendiente cercana a 1 (0.97) y un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.987$ , lo cual es indicativo de que el ensayo presenta una buena exactitud. Los resultados obtenidos para cada muestra se resumen en la Tabla 3.6.



**Figura 3.16.** Resultado del estudio de exactitud. La gráfica muestra la correlación existente entre la concentración de la Lp(a) en las muestras fortificadas en el laboratorio y el valor de Lp(a) medido por el inmunoensayo desarrollado. Los datos corresponden al promedio de dos ensayos y cada punto por triplicado. Para todos los casos se utilizó como anticuerpo de captura el pAbAD3 anti apo(a) a 1.25 µg mL<sup>-1</sup>, y como anticuerpo de captura el As306 anti apoB100 a una dilución 1/1000.

**Tabla 3.6.** Resultados preliminares para el ensayo de exactitud de la Lp(a) en muestras de suero fortificadas en el laboratorio

[Lp(a)]fortificada (µg mL <sup>-1</sup> )	[Lp(a)]medida (µg mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	CV (%)
250	236 ± 12	5
125	142.8 ± 12	8
62.5	66 ± 3	3
31.25	34 ± 4	7
15.625	18 ± 4	11

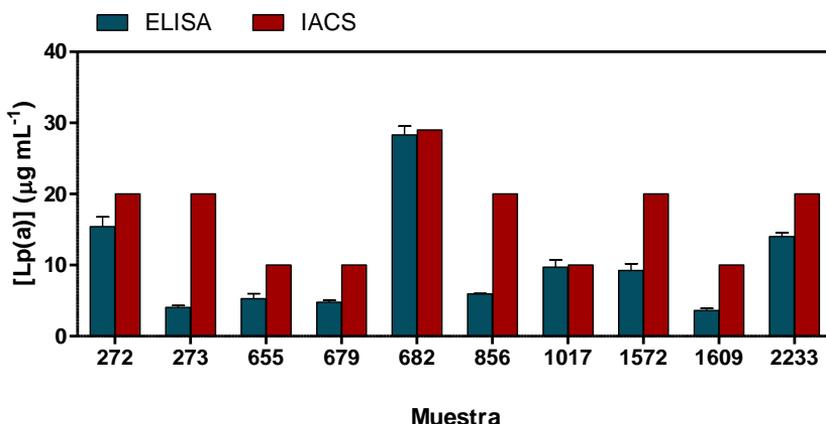
<sup>a</sup> Valores correspondientes al promedio de dos ensayos diferentes, cada uno de ellos con cada muestra analizada por triplicado. Valores finales de Lp(a) fortificada tras la correspondiente substracción del 0, valor basal de Lp(a) presente en la matriz.

Como puede observarse, los valores medidos de Lp(a) correlacionan muy bien con los valores de Lp(a) fortificados, considerando el nivel basal de Lp(a) presente en la matriz utilizada en este estudio.

### 3.3.3.7 Análisis de muestras clínicas

Con todos estos estudios de caracterización del ELISA para la Lp(a) consideramos que se podría realizar un pequeño estudio piloto de validación clínica, midiendo muestras de pacientes. En concreto las muestras suministradas por el IACS, cuya concentración era conocida. Las muestras se diluyeron 1/1000 y 1/2000 con el tampón del ensayo, midiéndose por ELISA, y utilizando una curva de calibración

preparada en el mismo tampón. Tal como se observa en la Figura 3.17, nuestro ELISA proporcionaba valores cercanos, aunque no en todos los casos idénticos a los valores de concentración proporcionados por el IACS; si bien desde un punto de vista clínico, posiblemente la diferencia entre uno y otro valor no es relevante.



**Figura 3.17.** Gráfico de barras donde se muestra el valor de Lp(a) proporcionado por el IACS (rojo), y el valor obtenido mediante el ensayo ELISA desarrollado (azul).

En la Tabla 3.7 se muestran los valores exactos obtenidos, donde también aparecen los valores de apoB100. Las diferencias entre los valores proporcionados por el IACS y los obtenidos en el ELISA desarrollado en esta tesis doctoral, podrían ser atribuidos a las isoformas presentes en el calibrador utilizado en cada caso y a las diferentes isoformas de la apo(a) de cada paciente. Puesto que el anticuerpo de captura es contra la apo(a), el número de *kringles* k4.2 podría afectar su capacidad de reconocimiento. A pesar de los esfuerzos realizados por nuestra parte para poder conocer en detalle las características de este anticuerpo, sobretodo si es o no sensible al polimorfismo que presenta la propia Lp(a), la casa comercial no nos proporcionó ningún dato por omisión en este aspecto. Por este motivo, el planteamiento de esta hipótesis está fundamentado en la asunción de que, al tratarse de un anticuerpo policlonal contra la apo(a), a priori, es plausible que sea sensible al número de copias del *kringle* k4.2. Este hecho pone de manifiesto la importancia de desarrollar herramientas de diagnóstico para la cuantificación de la Lp(a) que sean independientes del polimorfismo que presenta. Este fue uno de los retos planteados en esta tesis, llegando a desarrollar anticuerpos contra zonas

invariables de la Lp(a) para el desarrollo de técnicas de diagnóstico robustas y fiables.

**Tabla 3.7.** Resultados del estudio pilot de validación clínica del ELISA de Lp(a) desarrollado para la cuantificación de Lp(a).

Muestra	Repeticiones k4.2	<sup>a</sup> apoB	Lp(a) <sub>IACS</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	[Lp(a)] <sub>ELISA</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
273	15	92	20	4.06 $\pm$ 0.24
1609	17	187	10	3.63 $\pm$ 0.28
272	18	84	20	15.42 $\pm$ 1.35
856	19	132	20	5.96 $\pm$ 0.04
682	24	159	29	28.31 $\pm$ 1.24
1017	26	119	10	9.72 $\pm$ 1.03
679	27	119	10	4.78 $\pm$ 0.27
1572	32	83	20	9.24 $\pm$ 0.94
2233	40	95	20	14.01 $\pm$ 0.54
655	45	93	10	5.30 $\pm$ 0.70

<sup>a</sup> Los valores apoB vienen dados en mg dL<sup>-1</sup>. Las muestras clínicas de concentración baja de Lp(a) fueron proporcionadas por el IACS. Resultados de un día, cada muestra se evaluó por triplicado.

### 3.3.4 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la cuantificación de los *kringles*

Para poder cuantificar el número de *kringles* k4.2 se decidió producir anticuerpos específicos contra diferentes fragmentos peptídicos representantes de esta zona y también de las regiones no variables de la apo(a), lo cual aportaría información sobre la concentración de apo(a) de forma independiente a la variabilidad en el número de *kringles* k4.2. Además había que tener en cuenta la homología con el plasminógeno.

#### 3.3.4.1 Estudios dirigidos a conocer la homología entre los diferentes *kringles* de la apo(a)

Se realizó un estudio en profundidad de las diferentes secuencias de aminoácidos (aa) que conformaban los diferentes *kringles* de la apo(a), para así encontrar y seleccionar aquellas secuencias peptídicas que menos grado de homología guardasen con el plasminógeno.

Para esto se hizo uso de diferentes recursos como UniProtKB, que cuenta con un amplio repositorio de información relacionada con las proteínas, creado mediante la combinación de diferentes bases de datos como Swiss-Prot, TrEMBL y PIR<sup>t151-152</sup>. Del mismo modo se hizo uso de toda la información referente a la Lp(a) obtenida de PDB<sup>153</sup> (Protein Data Bank), base de datos de dominio público, donde se encuentran datos muy valiosos relacionados con la estructura tridimensional de las proteínas.

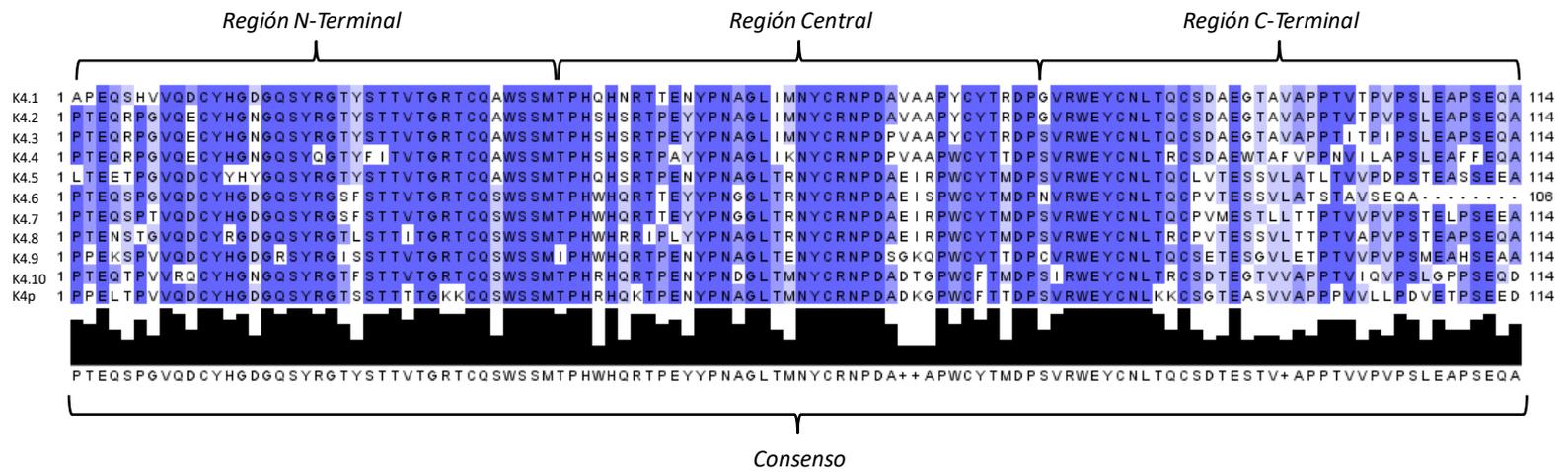
Mediante la herramienta Align tanto de Uniprot como del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), se realizó un estudio comparativo de las diferentes secuencias peptídicas de los *kringles* de la apo(a) junto con el plasminógeno<sup>154-155</sup>. El criterio de selección de unas secuencias frente a otras se realizó atendiendo a dos factores principalmente. Primero, el grado de homología presentado por la secuencia seleccionada de la apo(a), como hapteno potencial para la producción de anticuerpos, frente al resto de secuencias de los *kringles* de la misma proteína. Segundo, el grado de homología de la secuencia seleccionada como posible candidata frente al plasminógeno. Cabe destacar que la búsqueda de la secuencia peptídica con homología cero resulta prácticamente imposible dada la alta similitud existente entre los diferentes *kringles* de la propia apo(a). En la Tabla 3.8 puede observarse el grado de similitud existente entre los *kringles* 4 tipo 1 al tipo 10 (k4.1 – k4.10) de la apo(a), así como con el *kringle* 4 del plasminógeno (k4p). En ningún caso la similitud es nula, alcanzando grados de homología de alrededor un 70 % en la mayoría de los casos.

En base a estos resultados, se decidió realizar un estudio comparativo de las diferentes secuencias de aminoácidos que componen cada *kringle*, con el fin de determinar qué zonas eran las más heterólogas. Para esto se alinearon las diferentes secuencias mediante la herramienta Align, y se observó que la región correspondiente a la parte N-terminal del *kringle* k4.1, presentaba un mayor grado de heterología con el resto de *kringles*, así como con el *kringle* k4p del plasminógeno (véase Figura 3.18). Por este motivo, se escogió esta zona del *kringle* k4.1 para la producción de anticuerpos no sensibles al número de repeticiones del *kringle* k4.2, tal y como se describe en la siguiente sección.

**Tabla 3.8.** Homología de las secuencias peptídicas entre los diferentes *kringles* de la apo(a)

	k4.1	k4.2	k4.3	k4.4	k4.5	k4.6	k4.7	k4.8	k4.9	k4.10	k4p
k4.1	100	90	87	74	71	63	73	69	72	74	68
k4.2	90	100	96	83	73	64	73	71	69	76	66
k4.3	87	96	100	84	72	63	71	69	68	75	65
k4.4	74	83	84	100	66	58	65	66	63	68	61
k4.5	71	73	72	66	100	73	79	80	73	68	68
k4.6	63	64	63	58	73	100	81	74	69	66	62
k4.7	73	73	71	65	79	81	100	83	76	71	67
k4.8	69	71	69	66	80	74	83	100	74	69	66
k4.9	72	69	68	63	73	69	76	74	100	68	71
k4.10	74	76	75	68	68	66	71	69	68	100	75
k4p	68	66	65	61	68	62	67	66	71	75	100

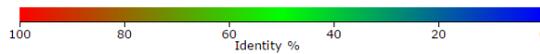
La tabla se recoge la homología existente entre todos los *kringles* de la apo(a) (k4.1 – k4.10) junto con el *kringle* 4 del plasminógeno (k4p). El código de colores indica el grado de homología, de este modo rojo implica un 100 % de coincidencia, mientras que blanco un 0 %. Puede observarse como la similitud entre los diferentes *kringles* y el *kringle* 4 del plasminógeno es superior al 50 %.



**Figura 3.18.** Resultado del alineamiento de todos los *kringles* de la apo(a) (k4.1-k4.10) con el *kringle* 4 del plasminógeno (k4p). El grado de identidad entre todas las secuencias alineadas es del 23.2 % encontrando 29 posiciones idénticas. El consenso nos indica en cada columna cual es el aminoácido que predomina frente al resto de forma significativa<sup>1</sup>

### 3.3.4.2 Diseño del hapteno para la detección específica del *Kringle 4* tipo 1 de la apolipoproteína (a)

Mediante la herramienta BLAST (de las siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) la cual nos permite, ajustando los parámetros adecuados, determinar que proteínas guardan un mayor grado de homología con el péptido que estamos analizando, se compararon la secuencia peptídica correspondiente al *kringle* k4.1 de la apo(a) con el resto de proteínas de la misma especie presentes en la base de datos. Como puede observarse en la Figura 3.19, tan solo la propia Lp(a) y la apolipoproteína (a) guardaban un 100% de homología con la secuencia analizada, ya que ésta forma parte tanto de la Lp(a) como de la apo(a). En siguiente instancia, se observó como el plasminógeno guarda un grado de homología del 68.8 %. Además, hay que destacar que esta homología está directamente relacionada con la zona del plasminógeno que comprende el *kringle 4*. El siguiente paso fue comparar mediante la herramienta Align, qué región del *kringle* k4.1 guarda mayor grado de heterología tanto con el resto de secuencias de los diferentes *kringles* de la apo(a), como con la secuencia completa del *kringle 4* del plasminógeno. Como puede observarse en la Figura 3.18, la región N-terminal del *kringle* k4.1 es la que guarda mayor grado de heterología (aminoácidos en blanco) con el resto de secuencias de la misma apo(a) e incluso del plasminógeno. Del mismo modo es fácil observar como la región C-terminal del *kringle* k4.1 también guarda cierto grado de heterología con el plasminógeno. No obstante, esta región del *kringle* es muy parecida a la región C-terminal del *kringle* k4.2. Dado que el objetivo en este caso, es producir un anticuerpo cuyo reconocimiento de la apo(a) no se vea afectado por el número de repeticiones del *kringle* k4.2, la región C-terminal del *kringle* k4.1 quedó descartada.



## Overview

Entry	Protein names	Match hit	Identity
Q1HP67	Lipoprotein, Lp(A) (Homo sapiens)		100.0%
P08519	Apolipoprotein(a) (Homo sapiens)		100.0%
P00747	Plasminogen (Homo sapiens)		68.8%

## Alignments

BLAST  Align  Download  Add to basket  Columns 1 to 3 of 3 Show 25 ▾

Entry	Alignment overview	Info	Length
Query: k4.1 B20170219A7434721E10EE6586998A056CCD0537E78C6B8X			
<input type="checkbox"/> Q1HP67	Q1HP67_HUMAN - Lipoprotein, Lp(A) Homo sapiens (Human) - <a href="#">View alignment</a> 	E-value: 2e-74 Score: 643 Ident.: 100.0%	2,040
<input type="checkbox"/> P08519	APOA_HUMAN - Apolipoprotein(a) Homo sapiens (Human) - <a href="#">View alignment</a> 	E-value: 3.5e-74 Score: 643 Ident.: 100.0%	4,548
<input type="checkbox"/> P00747	PLMN_HUMAN - Plasminogen Homo sapiens (Human) - <a href="#">View alignment</a> 	E-value: 2.5e-50 Score: 456 Ident.: 68.8%	810

**Figura 3.19.** Resultados obtenidos tras realizar un estudio comparativo de la secuencia de aminoácidos (aa) del *kringle* 4 tipo 1 de la apo(a) mediante la herramienta BLAST con un E-value = 10. En la parte superior figuran distintos grados de identidad del *kringle* 4 tipo 1 de la apo(a) con la Lp(a), con la propia apo(a) y el plasminógeno. El código de colores indica en que región de la proteína esta similitud es mayor, de este modo el color rojo corresponde a una similitud del 100%, mientras que el azul a un 0%. En la parte inferior puede observarse el grado de similitud y significancia indicada por medio del E-value, en relación al *kringle* 4.1(línea negra). Se observa que, tal como era de esperar, el solapamiento es total entra la apo(a) y la Lp(a), mientras que, con el plasminógeno, esta zona, que corresponde al *kringle* 4, presenta una homología de alrededor un de un 68 %.

Así pues, se seleccionaron los 11 primeros aminoácidos de la región N-terminal del *kringle* k4.1, APEQSHVVQDC. La elección de estos 11 aminoácidos atendió al hecho de que en ellos está comprendida la zona más heteróloga, y además al hecho de que tener un aa Cys en un extremo C-terminal del péptido nos permitiría conjugar dicho péptido a una macrobiomolécula inmunogénica mediante una química de tipo ortogonal, en la que la reactividad de otros grupos funcionales presentes en el resto de aminoácidos, no interfiriera.

La secuencia se volvió a comparar con el resto de *kringles* de la apo(a) así como con el plasminógeno, con el objetivo de determinar si el péptido escogido guardaba algún tipo de homología significativa con el resto de *kringles* de la apo(a), así como con el plasminógeno. En la Tabla 3.9 se muestran los valores obtenidos tras realizar la comparación de la secuencia seleccionada con el resto de la apo(a) y del plasminógeno. Puede observarse como el mayor grado de homología del péptido escogido lo guarda con la zona N-terminal del *kringle* k4.9 de la apo(a), teniendo una identidad de alrededor de un 72 %, mientras que con la zona N-terminal del plasminógeno guarda un grado de identidad del 63%, siendo esta similitud poco significativa.

**Tabla 3.9.** Grado de identidad de la secuencia peptídica N-terminal del *kringle* k4.1 con el resto de regiones N-terminales de los *kringles* k4.2 – k4.10 de la apo(a) y con el *kringle* k4p del plasminógeno.

Proteína	<i>Kringle</i>	aa <sup>a</sup>	Secuencia Problema	Secuencia Homóloga	Homología (%)
apo(a)	4.1	1 → 11	APEQSHVVQDC	APEQSHVVQDC	100
	4.2	132 → 143		PTEQRPGVQEC	45,5
	4.3	817 → 828		PTEQRPGVQEC	45,5
	4.4	926 → 937		PTEQRPGVQEC	45,5
	4.5	1045 → 1056		LTEETPGVQDC	45,5
	4.6	1157 → 1168		PTEQSPGVQDC	63,6
	4.7	1163 → 1174		PTEQSPTVQDC	63,6
	4.8	1379 → 1390		PTENSTGVQDC	54,5
	4.9	1493 → 1502		PPEKSPVVQDC	72,7
	4.10	1607 → 1618		PTEQTPVVRQC	45,5
plasminógeno	4	368 → 377	PPELTPVVQDC	63,3	

<sup>a</sup> Los aminoácidos tanto inicial como final hacen referencia a la posición de la secuencia de la región N-terminal en la proteína que figura en la base de datos del NCBI, donde la apo(a) está registrada con 6 copias del *kringle* 4 tipo 2. Los datos de homología se obtuvieron utilizando la herramienta Align.

### 3.3.4.3 Selección de haptenos para la detección del *Kringle 4* tipo 2 de la apolipoproteína (a)

Para la selección de péptidos candidatos a haptenos para la producción de anticuerpos para la detección del *kringle* k4.2 de la apo(a), se procedió de idéntica forma a la descrita anteriormente (sección 3.3.4.2). Inicialmente se comparó toda la secuencia peptídica del *kringle* k4.2 mediante la herramienta BLAST, con el fin de determinar el grado de similitud con las secuencias peptídicas de otras proteínas seleccionadas y si éste era significativo. En la Figura 3.20 se muestra el resultado de este estudio pudiendo observarse que, al igual que con el *kringle* k4.1, la homología entre la apo(a) y la Lp(a) es total, mientras que con el plasminógeno es del 67 %.

Seguidamente nos propusimos encontrar que zona del *kringle* k4.2 era la más heteróloga con el resto de *kringles*. En este punto, tras la representación de todos los *kringles* y el grado de homología de cada uno de ellos tal y como se muestra en la Figura 3.18, no se pudo identificar ningún fragmento o péptido con la heterología que hubiéramos deseado (idealmente, 0%, pero como mínimo una homología inferior al 40%). Al contrario que con el *kringle* k4.1 cuya zona N-terminal mostraba una heterología aceptable respecto del resto de *kringles* (véase Figura 3.18, zonas marcadas en blanco), el grado de semejanza del *kringle* k4.2 con el resto de *kringles* es muy elevado en casi toda la secuencia, por lo que la selección del péptido más conveniente para producir anticuerpos monoclonales capaces de detectar de forma específica el *kringle* k4.2 de la apo(a) sin reconocimiento cruzado con ningún otro *kringle* ni con el plasminógeno, se presentaba como un reto complejo.



## Overview

Entry	Protein names	Match hit	Identity			
			1k	2k	3k	4k
Q1HP67	Lipoprotein, Lp(A) (Homo sapiens)		100.0%			
P08519	Apolipoprotein(a) (Homo sapiens)		100.0%			
P00747	Plasminogen (Homo sapiens)		66.4%			

## Alignments

BLAST Align Download Add to basket Columns 1 to 3 of 3 Show 25

Entry	Alignment overview	Info	Length
Query: k4.2 B20170219A7434721E10EE6586998A056CCD0537E78C621I			
Q1HP67	Q1HP67_HUMAN - Lipoprotein, Lp(A) Homo sapiens (Human) - View alignment 	E-value: 1.1e-74 Score: 645 Ident.: 100.0%	2,040
P08519	APOA_HUMAN - Apolipoprotein(a) Homo sapiens (Human) - View alignment 	E-value: 1.9e-74 Score: 645 Ident.: 100.0%	4,548
P00747	PLMN_HUMAN - Plasminogen Homo sapiens (Human) - View alignment 	E-value: 1.2e-48 Score: 444 Ident.: 66.4%	810

**Figura 3.20.** Resultados obtenidos tras realizar un estudio comparativo de la secuencia de aa del *kringle* 4 tipo 2 de la apo(a) mediante la herramienta BLAST con un E-value = 10. En la parte superior figuran distintos grados de identidad del *kringle* 4 tipo 2 de la apo(a) con la Lp(a), con la propia apo(a) y el plasminógeno. El código de colores indica en que región de la proteína esta similitud es mayor, de este modo el color rojo corresponde a una similitud del 100%, mientras que el azul a un 0%. En la parte inferior puede observarse el grado de similitud y significancia indicada por medio del E-value, en relación a al *kringle* 4.2 (línea negra). Se observa la similitud es total entre la apo(a) y la Lp (a), mientras que, con el plasminógeno, esta región, que precisamente corresponde al *kringle* 4, presenta una homología del 67 %.

En base a los datos mostrados en a la Figura 3.18, en la que se comparan las secuencias peptídicas de los diferentes *kringles*, se escogió una zona más amplia que para el *kringle* k4.2 de la región C-terminal, donde *a priori* nos parecía observar un mayor grado de heterología que en el resto de la secuencia, y se comparó con las secuencia peptídicas comprendidas entre el aa 88 y el 114 de cada *kringles* de la apo(a) y la correspondiente (aa454-479) del plasminógeno. Los resultados se recogen en la Tabla 3.10, donde se puede ver que el grado de similitud de esta región con el plasminógeno es del 50 %, mientras que para el resto de *kringles* de la apo(a) puede variar desde un 60 a un 100 %. Tan solo en el caso del *kringle* k4.6, se observa una homología inferior debido a que el número de aa entre el k4.6 y el k4.7 es menor que en el resto de espacios inter*kringle* (28 aa en lugar de 36 aa), con lo que el número de aa que conforman este *kringle* es de 106, en lugar de los 114 del resto de *kringles*<sup>76</sup>.

**Tabla 3.10.** Grado de identidad y de similitud existente entre la secuencia C-terminal escogida del *kringle* k4.2 y el resto de regiones C-terminal correspondientes a los *kringles* de la apo(a) junto con el plasminógeno.

Proteína	Kringle	aa	Secuencia Problema	Secuencia Homóloga	Homología (%)
apo(a)	4.2	88 → 114	CSDAEGTAVAPPTVTVPVPSLEAPSEQA	CSDAEGTAVAPPTVTVPVPSLEAPSEQA	100
	4.1	105 → 131		CSDAEGTAVAPPTVTVPVPSLEAPSEQA	100
	4.3	903 → 929		CSDAEGTAVAPPTITPIPSLEAPSEQA	93
	4.4	1017 → 1043		CSDAEWTAFFVPPNVLAPSLEAFFEQA	67
	4.5	1132 → 1158		CLVTESSVLATLTVVPDPSTEASSEA	48
	4.6	1246 → 1272		CPVTESSVLATSTAVSEQA	33
	4.7	1351 → 1377		CPVMESTLLTPTVVPVSTELPSEA	56
	4.8	1465 → 1491		CPVTESSVLTTPTVAPVPSLEAPSEQA	59
	4.9	1579 → 1605		CSETESGVLETTPTVVPVPSMEAHSEA	56
	4.10	1693 → 1718		CDSTEGTVVAPPTVIQVPSLGGPSEQA	70
Plasminógeno	4 → 5	454 → 479	CSGTEASVAPPFVLLPDEVETPSEED	48	

<sup>a</sup> Los aminoácidos tanto inicial como final hacen referencia a la posición en la proteína que figura en la base de datos del NCBI, donde la apo(a) está registrada con 6 copias del *kringle* 4 tipo 2. Los datos de homología se obtuvieron utilizando la herramienta Align. <sup>b</sup> La secuencia del plasminógeno que presentaba mayor grado de similitud se encuentra comprendida entre el *kringle* 4 y el 5.

Con el fin de disminuir este grado de homología tanto con el plasminógeno como con el resto de *kringles* de la apo(a), se realizó un estudio comparativo de diferentes péptidos comprendidos en la secuencia anteriormente descrita. Los péptidos seleccionados se encuentran resumidos en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11.** Secuencias del *kringle* k4.2 de la apo(a) seleccionadas *kringles*

Secuencia	Péptido
88 → 98	CDSAEGTAVAP
88 → 103	CSDAEGTAVAPPTVP
93 → 105	GTAVAPPTVTPVPA
103 → 114	PVPSLEAPSEQA

Se seleccionaron varios fragmentos de la secuencia aa88-114 con el fin de identificar un fragmento que mostrara mayor heterogeneidad con el resto de *kringles*.

Estas secuencias fueron de nuevo analizadas de forma individual con el fin de conocer aquellos solapamientos más significativos y el grado de similitud que podían presentar con el resto de *kringles* de la apo(a), así como con el plasminógeno (véase Tabla 3.12).

**Tabla 3.12.** Homología de los fragmentos peptídicos del *kringle* 4.2 seleccionados en el resto de *kringles*, y con el *kringle* 4 del plasminógeno.

Secuencia problema		88 → 99	88 → 103	93 → 105	103 → 114
Proteína	Kringle	Homología (%)	Homología (%)	Homología (%)	Homología (%)
apo(a)	4.1	100	100	100	100
	4.3	100	93	92	84
	4.4	73	67	67	46
	4.5	23	33	67	38
	4.6	27	25	16	42
	4.7	25	40	75	53
	4.8	15	33	92	46
	4.9	23	40	75	46
	4.10	75	80	67	76
	Plasminógeno	4	58	50	42

Se muestra el grado de homología de cada secuencia de longitud diferente, de la región C-terminal del *kringle* k4.2 con el resto de *kringles*. El grado de homología se estudió mediante la herramienta *Align*.

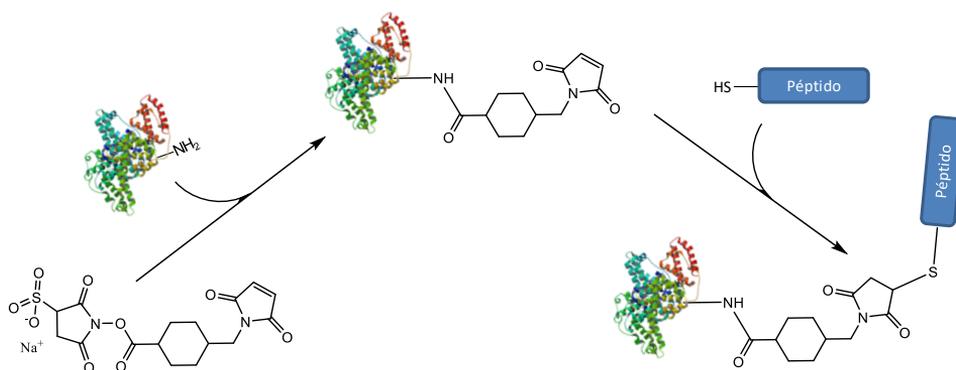
Tal y como se anticipaba, la homología no pudo estar por debajo del 40% con el resto de *kringles* ni tampoco con el plasminógeno. No obstante, la secuencia comprendida entre los aa88 y 98 (CDSAEGTAVAP), presentaba valores bastante bajos para un número significativo de *kringles* (K4.5, 23%; K4.6, 27%; K4.7, 25%; K4.8, 15%; K4.9, 23%), mientras que otras secuencias solo mostraban homología por debajo del 40% para un menor número de *kringles*. Así pues, a pesar de que la secuencia aa88-98 mostraba un elevado grado de homología con el k4.1 y del 58 % con el plasminógeno, se decidió seleccionar este péptido para la producción

de anticuerpos específicos, considerando que quizá con un buen diseño de experimentos en cuanto al cribaje de hibridomas, podría ser finalmente posible conseguir aislar algún clon productor de anticuerpos específicos para el k4.2.

### **3.3.5 Producción de anticuerpos monoclonales contra los *Kringle 4* tipo 1 y tipo 2 de la apolipoproteína (a)**

#### **3.3.5.1 Preparación de bioconjugados**

Las secuencias peptídicas propuestas como haptenos para la producción de anticuerpos contra el *kringle* k4.1 (hapteno Lpak4.1Nt, APEQSHVVQDC; aa1-11 y contra el *kringle* k4.2 (hapteno Lpak4.2Ct, CDSAEGTAVAP; aa88-98) fueron sintetizados por la Unitat de Química Combinatòria (UQC, PCB). Ambos péptidos poseían un aa Cys en uno de sus extremos N-terminal (hapteno Lpak4.1Nt) y C-terminal (hapteno Lpak4.2Ct) lo que permitiría el acoplamiento covalente a una biomacromolécula mediante una química ortogonal, utilizando la reactividad específica del grupo SH de la Cys y empleando un reactivo heterobifuncional como es el 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMCC). Este reactivo contiene en uno de sus extremos un grupo N-hidroxisuccinimida, que constituye un ácido carboxílico activado, capaz de reaccionar mayoritariamente con electrófilos como podrían ser los grupos de amina primaria de los residuos de lisina. En el otro extremo posee un grupo maleimido que reacciona específicamente con el grupo SH. La Figura 3.21 visualiza como el bioconjugado se forma en dos etapas, una primera en la cual se modifica la proteína con el reactivo SMCC a través de los residuos de lisina y una segunda en la que se produce la unión del péptido de forma específica a través de los grupos maleimido. La monitorización de esta reacción se llevó a término mediante MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry*), demostrándose que de los 8 restos de SMCC incorporados, 3 fueron ocupados con el hapteno correspondiente en ambos casos. Los grupos maleimido restantes se bloquearon con cisteína para evitar posibles reacciones secundarias no deseadas (véase Sección 6.4.1, pág. 190).



**Figura 3.21.** Secuencia de reacciones a través de la cual tiene lugar la conjugación péptido-proteína. En primer término, se lleva a cabo la introducción de los grupos maleimido a través de las aminas de la proteína. En segunda instancia, mediante una reacción de adición, se introduce el péptido a la proteína a través del grupo -SH presente en el residuo de Cisteína.

Previamente se había intentado de forma fallida preparar los bioconjugados hapteno proteína mediante la utilización de SIA (iodoacetato de succinimidilo), que también permitía realizar un acoplamiento específico a través de los grupos tiol. En base a estos resultados, se decidió optar por la utilización de sulfo-SMCC que además permitía espaciar el péptido del efecto estérico de la proteína.

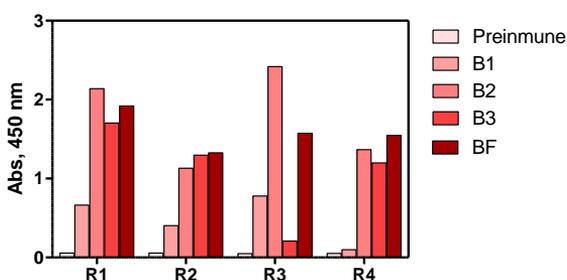
De esta forma se prepararon 4 bioconjugados uniendo los dos haptenos diseñados a HCH (horseshoe crab hemocyanin) y BSA (bovine serum albumin). Los conjugados fueron denominados Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH y LpaNtk4.1-Cys-SMCC-BSA para el *kringle* k4.1 de la apo(a), mientras que para el *kringle* k4.2 se denominaron HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct y BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct, indicando de esta manera el punto a través del cual se había producido la conjugación, puesto que esto puede tener un gran efecto sobre la especificidad de los anticuerpos resultantes.

Los conjugados de HCH se utilizaron como inmunógenos en la producción de anticuerpos, mientras que los de BSA se utilizaron para hacer un seguimiento de la respuesta inmune tal como se describe a continuación.

### 3.3.5.2 Generación de anticuerpos policlonales contra los diferentes inmunógenos de la apo(a)

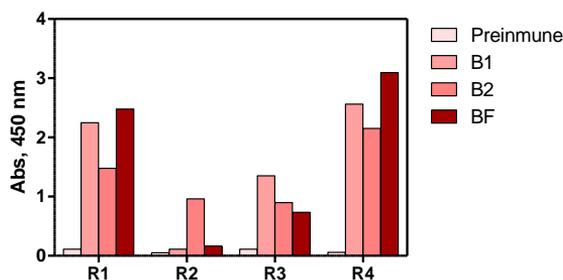
Se utilizaron cuatro ratones para cada inmunógeno. El protocolo de inmunización en ratones consistió en cuatro inoculaciones espaciadas cada 3 semanas, realizando una extracción de antisuero 10 días después de cada inmunización (sección 6.4.3, pág. 193). No obstante, el número de inmunizaciones puede verse ligado a variaciones dependiendo de la respuesta inmune generada por el ratón, evaluada mediante el título de los antisueros.

En el caso de los ratones destinados a la producción de anticuerpos contra la región seleccionada del *kringle* k4.1, se decidió alargar el proceso de inmunización con el fin de incrementar la respuesta inmunológica de los ratones, puesto que, tras la segunda inmunización y correspondiente evaluación del suero (sección 6.6.1, pág. 207), la respuesta del título era considerablemente baja. En la Figura 3.22 puede observarse la evolución del título de los anticuerpos policlonales del antisuero tras cinco inoculaciones.



**Figura 3.22.** Evolución del título de anticuerpos en los antisueros obtenidos tras inmunizar cuatro ratones (R1, R2, R3 y R4) con Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH a Resultados obtenidos mediante un ELISA en formato indirecto, tapizando las microplacas con  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA. La respuesta mostrada corresponde a diluciones 1/64000 de cada antisuero. Después de la primera inoculación, no se extrajo muestra de sangre, puesto que se produce una respuesta de inmunoglobulinas tipo M (IgM) que suele ser muy baja. Es tan solo después de la segunda inoculación, cuando ya se generan inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Por lo tanto, B1 corresponde a la muestra de antisuero obtenida después de dos inoculaciones.

Se procedió de forma semejante con el inmunógeno HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct, salvo que en este caso el título del antisuero resultó ser suficientemente elevado desde un inicio, por lo que no fue necesario realizar inoculaciones adicionales (Figura 3.23).



**Figura 3.23.** Evolución del título de anticuerpos en los antiseros obtenidos tras inmunizar con HCH-SMCC-CysLpak4.2Ct. Resultados obtenidos mediante un ELISA en formato indirecto, tapizando las microplacas con  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. La respuesta mostrada corresponde a diluciones 1/16000 de cada antisuero. Después de la primera inoculación, no se extrajo muestra de sangre, puesto que se produce una respuesta de inmunoglobulinas tipo M (IgM) que suele ser muy baja. Es tan solo después de la segunda inoculación, cuando ya se generan inmunoglobulinas de tipo G (IgG). Por lo tanto, B1 corresponde a la muestra de antisuero obtenida después de dos inoculaciones.

### 3.3.5.3 Fusión celular. Obtención y selección de hibridomas

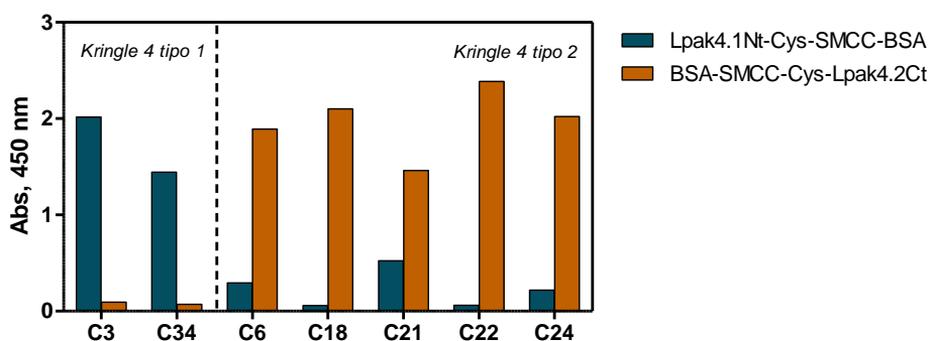
Una vez finalizado el proceso de inmunización, los animales se sacrificaron y se procedió a la extracción del bazo y de los linfocitos para realizar la fusión con las células de mieloma (véase sección 6.4.3, pág. 193). El proceso de obtención de clones celulares capaces de producir un anticuerpo monoclonal con las características requeridas conlleva varias etapas de cribaje en el que se analiza la capacidad productora de anticuerpos de los hibridomas aislados y estabilizados, así como las características de éstos. Estos estudios se realizan mediante ELISAs de tipo indirecto, analizando el sobrenadante de cada hibridoma y su avidéz por diferentes antígenos inmovilizados en las microplacas. El esquema general de todo este proceso se muestra en la Figura 3.24. En cada etapa de cribaje, los antígenos utilizados para realizar la selección de los mejores hibridomas o clones fueron diferentes tal como se explica a continuación.



**Figura 3.24.** Esquema en el que se muestra el procedimiento seguido para la obtención de clones estables capaces de producir anticuerpos monoclonales con la especificidad requerida. Los clones seleccionados se utilizan en la fase de producción, para generar de anticuerpos en suficiente cantidad. Los anticuerpos son finalmente aislados y purificados mediante técnicas cromatográficas de afinidad.

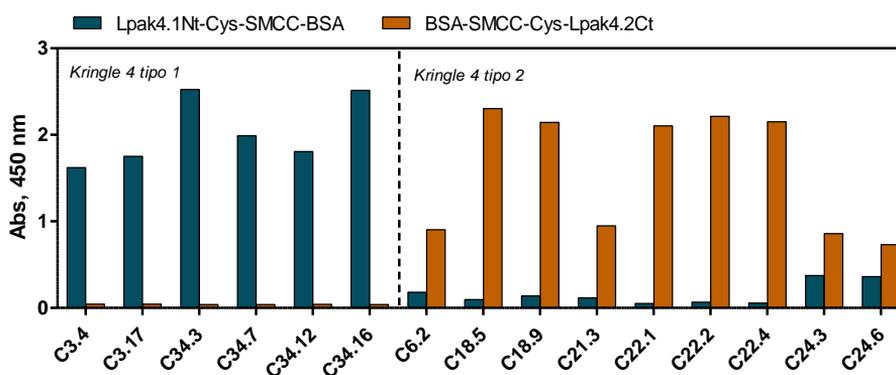
### 3.3.5.4 Selección de hibridomas. Fases de cribado I-III

Inicialmente, el criterio de selección fue seleccionar hibridomas capaces de diferenciar entre las secuencias peptídicas utilizadas como inmunógenos para los *kringles* k4.1 y k4.2. Para ello, se analizó la avidéz de los sobrenadantes hacia los dos bioconjugados peptídicos descritos en la sección 3.3.5.1 con el fin de descartar reactividades cruzadas, lo cual era improbable porque en las regiones seleccionadas eran diferentes (homología cercana al 15%, con tan solo 2 posiciones idénticas); para el k4.1 se había seleccionado la zona N-terminal, mientras que para el k4.2 había seleccionado la región C-terminal (véase Tabla 3.8). A pesar de ello, los hibridomas que presentaron reactividad cruzada lo hicieron de forma muy poco significativa, aun así, fueron descartados. Como consecuencia de estos estudios se seleccionaron, aislaron y estabilizaron dos hibridomas para el *kringle* k4.1 (C3 y C34), mientras que para el *kringle* k4.2 se aislaron cinco hibridomas (C6, C18, C21, C22 y C24). La selección se realizó en base a la señal y especificidad mostrada frente a los dos haptenos de inmunización. Tal y como se muestra en la Figura 3.25, el reconocimiento cruzado es despreciable.



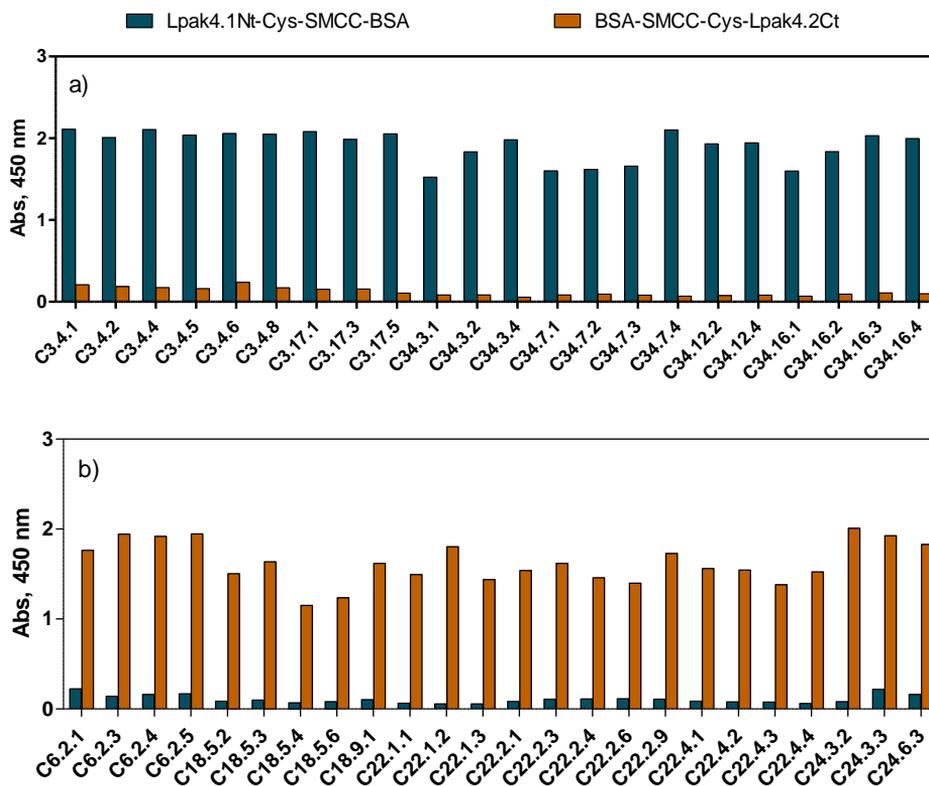
**Figura 3.25.** Respuesta de los hibridomas expandidos y seleccionados (100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante) para cada caso frente a los dos antígenos de tapizado a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Como puede verse en ambos casos la respuesta es específica. La reactividad cruzada que mostraron los hibridomas C6, C21 y C24 fue reducida significativamente tras diferentes etapas de clonaje, donde se aislaron hibridomas más específicos.

Seguidamente se procedió al clonaje de los hibridomas seleccionados (sección 6.4.3, pág. 193), y tras el correspondiente *screening* de las placas de clonaje, se escogieron aquellos hibridomas que presentaron una reactividad cruzada más baja con la secuencia peptídica del otro *kringle*. Como consecuencia se obtuvieron los hibridomas C3.4 y C34.3, C34.7, C34.12, C34.16 Y C34.17 para el *kringle* k4.1, y los hibridomas C6.2, C18.5 y C18.9, C21.3, C22.1, C22.2 y C22.4, C24.3, y C24.6 para el *kringle* k4.2 (Figura 3.26).



**Figura 3.26.** Respuesta de los sobrenadantes de los hibridomas seleccionados (100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante) tras la primera fase de clonaje, frente a los dos haptenos de inmunización utilizados como antígenos de tapizado a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En todos los casos se observa una elevada especificidad, además de una respuesta muy buena frente a su propio hapteno.

Tras dos etapas de clonaje, los hibridomas seleccionados se sometieron a una tercera etapa de clonaje y de nuevo a un segundo screening de especificidad, observando en todos los casos una elevada especificidad (Figura 3.27).

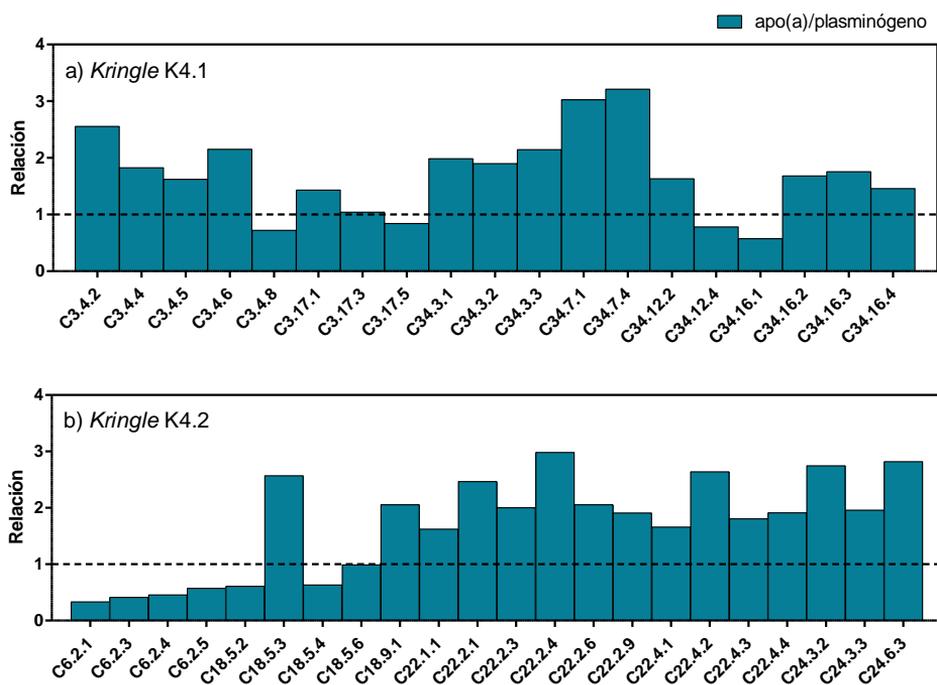


**Figura 3.27.** Respuesta de los sobrenadantes de los hibridomas tras el tercer paso de clonaje, frente a los dos haptenos de inmunización, utilizados como antígenos de tapizado a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . a) para los sobrenadantes generados por hibridomas del péptido del *kringle* k4.1 ( $100 \mu\text{L}$  de sobrenadante) b) para los sobrenadantes generados por hibridomas del péptido del *kringle* k4.2 ( $100 \mu\text{L}$  de sobrenadante). En todos los casos la respuesta es específica.

Una vez aislados estos hibridomas, se decidió realizar un ensayo de especificidad frente al plasminógeno con el fin de descartar aquellos que mostraran mayor afinidad por esta proteína que por la apo(a).

### 3.3.5.5 Caracterización de los clones seleccionados frente al plasminógeno y la apo(a)

Con el fin de seleccionar aquellos clones productores de anticuerpos específicos para la apo(a) que presentaran muy baja o ningún tipo de reconocimiento frente al plasminógeno, los sobrenadantes de los clones seleccionados anteriormente se evaluaron para conocer el reconocimiento específico de la apo(a) y del plasminógeno (véase Figura 3.28). Dada la gran diferencia entre los pesos moleculares de la apo(a) y el plasminógeno (la apo(a) puede llegar a pesar entre 400 y 900 kDa, mientras que el plasminógeno pesa 90 kDa), fue de vital importancia realizar esta caracterización en condiciones de equimolaridad, con el fin de obtener resultados comparables y realizar de este modo una selección de forma fiable.

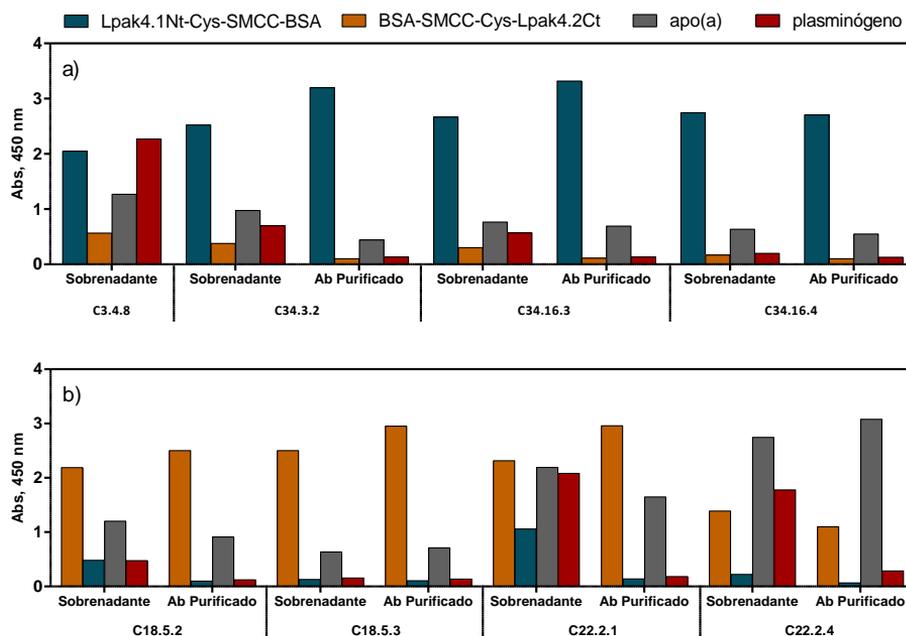


**Figura 3.28.** Relación de las respuestas de los diferentes anticuerpos frente a la apo(a) y el plasminógeno. a) anticuerpos contra Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH. b) anticuerpos contra HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. En cada caso se muestra la relación de la respuesta obtenida para la apo(a) en relación al plasminógeno. En todos los casos se utilizaron 100  $\mu$ L de sobrenadante de cada clon, excepto para el clon 18.9.1 del que sólo se disponía de 50  $\mu$ L. En todos los casos la apo(a) y el plasminógeno se tapizaron a 10 nM.

Siguiendo estas directrices, para el conjunto de clones generados contra el Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH se seleccionaron los clones C3.4.8, C34.3.2, C34.16.3 y C34.16.4 para la producción de anticuerpos monoclonales. En todos ellos, el reconocimiento de la apo(a) es mayor que el del plasminógeno. En cuanto a los clones generados a partir del HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct, en base al reconocimiento positivo de la apo(a) frente al plasminógeno, se escogieron los clones C18.5.2, C18.5.3, C22.2.1 y C22.2.4 para la producción de anticuerpos contra la apo(a).

### **3.3.5.6 Purificación y evaluación de los anticuerpos monoclonales contra el *kringle 4* tipo1 y tipo 2 de la apo(a)**

Una vez seleccionados los clones, los anticuerpos producidos se purificaron según se describe en la sección 6.4.3 en la página 193, mediante cromatografía de afinidad con proteína G y sus propiedades se caracterizaron de nuevo comparándolas con las obtenidas para el sobrenadante y en condiciones de equimolaridad para la apo(a) y el plasminógeno (véase Figura 3.30). En todos los casos puede apreciarse como, tras el paso de purificación, la especificidad de los anticuerpos producidos es sustancialmente mejor, decreciendo el reconocimiento del plasminógeno, lo cual era, junto a la posibilidad de distinguir entre los *kringles* k4.1 y k4.2, uno de los retos más importantes. Si bien es un hecho frecuente que, los anticuerpos una vez purificados, suelen mejorar sus propiedades, no se encontró una explicación racional de porque se observaba este efecto, aunque podría estar relacionado con componentes del sobrenadante que pudieran contribuir mediante interacciones de carácter no específico. Con estos resultados podemos decir que los anticuerpos monoclonales producidos contra secuencias peptídicas seleccionadas para los *kringles* k4.1 y k4.2 son específicos para la apo(a).



**Figura 3.29.** Respuesta de los anticuerpos producidos para el reconocimiento específico de la apo(a) antes y después del paso de purificación por proteína G, frente a la apo(a), el plasminógeno y ambos antígenos de tapizado. a) Anticuerpos monoclonales producidos contra el Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH b) Anticuerpos monoclonales producidos contra el HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. Se evaluaron 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, mientras que los anticuerpos purificados a 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En ambos frente a los antígenos de BSA tapizados a 100 nM, mientras que la apo(a) y el plasminógeno a 10 nM.

### 3.3.6 Desarrollo de una técnica de diagnóstico para la cuantificación de la Lp(a) y del número de repeticiones del *kringle* k4.2

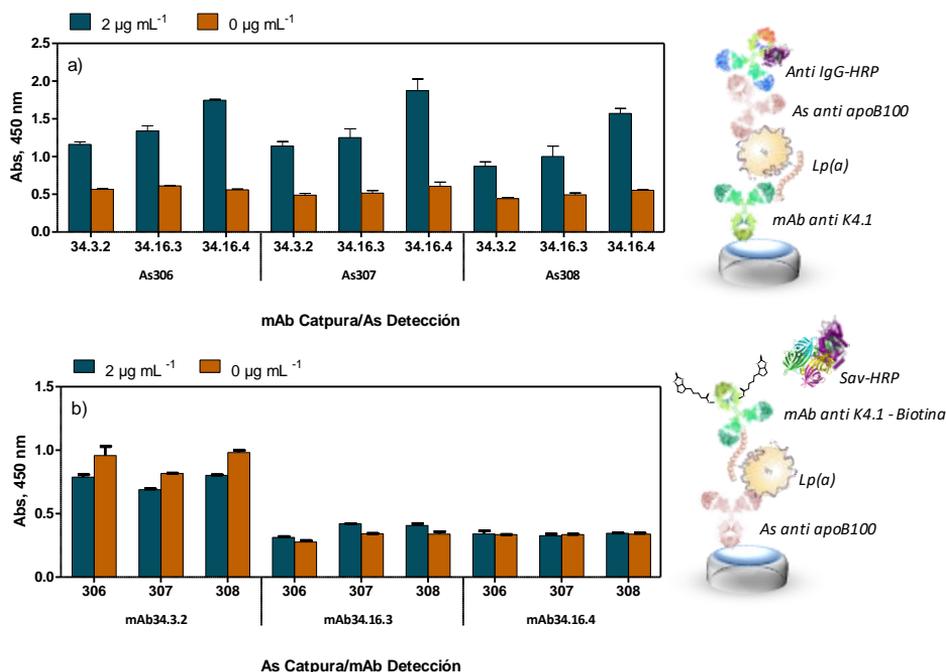
Tal y como se ha descrito en la sección 3.2, se plantearon diferentes estrategias para desarrollar una técnica de diagnóstico para la detección y cuantificación de Lp(a), que además confiriera información sobre el número de *kringles*. La estrategia consistía en combinar dos tipos de medidas, una en las que se cuantificara la Lp(a) sin que el número de *kringles* k4.2 afectara el resultado, y la segunda medida que aportara dicha información. Ello requería desarrollar, por un lado, un ELISA sándwich para la Lp(a) y por otro lado un ELISA sándwich, pero con anticuerpos sensibles al número de *kringles* k4.2. De esta manera, la muestra del paciente se dividiría en dos partes y se realizarían dichos análisis de forma simultánea (Figura 3.6, pág. 46). La combinación de la respuesta del plasma en

ambos ensayos proporcionaría información sobre el riesgo de padecer algún tipo de enfermedad cardiovascular.

### **3.3.6.1 Desarrollo de una técnica de diagnóstico independiente del polimorfismo asociado a la apo(a) para la detección y cuantificación de la Lp(a)**

Para la medida de Lp(a) independientemente del número de *kringles* k4.2 se propusieron dos formatos, ambos basados en el uso de un anticuerpo policlonal contra la apoB100, y un anticuerpo monoclonal contra el *kringle* k4.1, en cualquier caso, insensibles al número de repeticiones del *kringle* k4.2. Esto, de entrada, ya evitaría la discordancia que presentan las actuales técnicas utilizadas para la inmunodetección de la Lp(a) al utilizar anticuerpos sensibles a las diferentes isoformas de la apo(a)<sup>127, 156</sup>.

En la Figura 3.31a, se muestran los resultados del ensayo donde anticuerpos monoclonales anti k4.1 se utilizaron como anticuerpos de captura y los anticuerpos policlonales contra apoB100 para la detección. En todos los sistemas evaluados se observó ruido de fondo, pero en presencia de Lp(a) la señal aumentaba, lo que se atribuyó a una respuesta específica. Este resultado preliminar nos pareció prometedor ya que permitía establecer las bases para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico capaz de cuantificar la Lp(a) mediante el uso de anticuerpos cuya inmunodetección no se viera afectada por el número de repeticiones del *kringle* k4.2. En cambio, el formato donde son los antisueros policlonales anti apoB100 los que se utilizaron como anticuerpos de captura, y los anticuerpos monoclonales anti k4.1 como detección, la señal específica observada fue comparable al ruido de fondo.

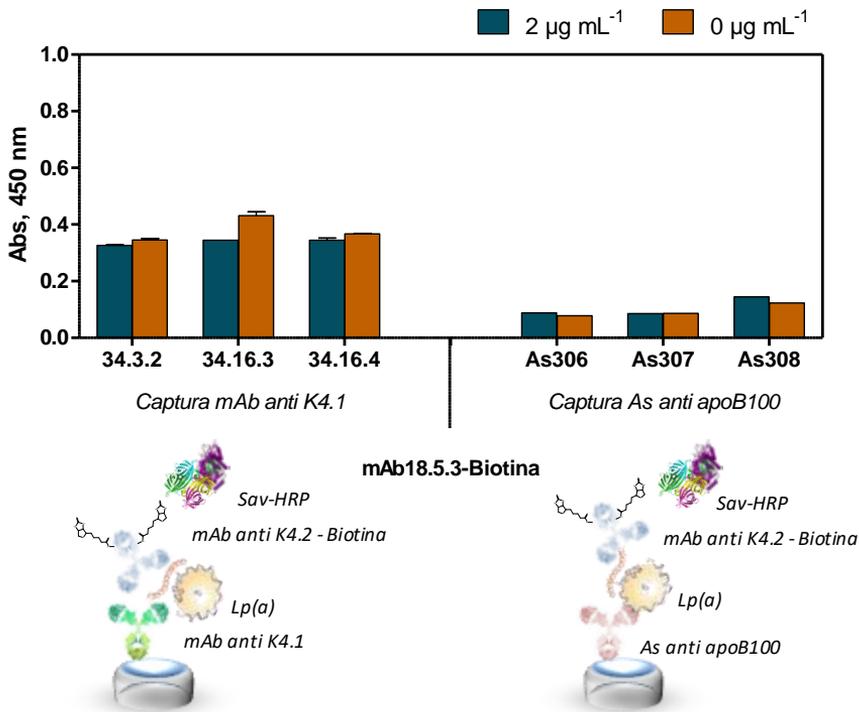


**Figura 3.30.** Resultado de los experimentos de evaluación de diferentes anticuerpos y formatos sándwich para la detección de la Lp(a) (véase sección 3.2). a) Formato donde se utilizan los anticuerpos monoclonales producidos contra el inmunógeno Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH como anticuerpos de captura, mientras que como anticuerpos de detección se utilizan los anticuerpos policlonales contra la apoB100. b) Formato en el que se utilizan los anticuerpos policlonales como anticuerpos de captura, y los anticuerpos monoclonales como anticuerpos de detección. En ambos casos se evaluaron dos concentraciones diferentes de Lp(a), 2 y 0 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.6.2 Desarrollo de una técnica de diagnóstico para la cuantificación del número de repeticiones del *kringle* k4.2

Seguidamente, se abordó el desarrollo de un ensayo para cuantificar *kringles* k4.2 mediante el uso de los anticuerpos monoclonales generados contra el hapteno Lpak4.2Ct y así poder estratificar el riesgo cardiovascular asociado a una determinada isoforma de Lp(a). En una primera instancia se evaluaron como anticuerpos de captura diferentes anticuerpos monoclonales contra el *kringle* k4.1 y los anticuerpos policlonales anti apoB100, y como anticuerpo de detección, el anticuerpo mAb 18.5.3 contra el *kringle* k4.2, biotinilado, (véase Figura 3.8, pág. 51). Al igual que en segundo formato evaluado anteriormente, la señal en ausencia de Lp(a) era del mismo orden que en presencia de esta a 2 µg

$\text{mL}^{-1}$ , (véase Figura 3.31), lo cual nos hizo sospechar sobre la posibilidad de que en todos los casos estuviéramos viendo respuestas no específicas, particularmente en el caso en que los anticuerpos anti k4.1 o anti k4.2 se utilizaban como detección (véase Figura 3.30 b, Figura 3.31).



**Figura 3.31.** Resultados del estudio preliminar donde se muestra que, en todos los casos, los anticuerpos monoclonales producidos, no son capaces de detectar la Lp(a). Tanto los anticuerpos de captura como de detección biotinilados se evaluaron a  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . a) En este caso, se utilizaron anticuerpos de captura anti k4.1, 34.3.2, 34.16.3 y 34.16.4, y el anticuerpo 18.5.3 anti k4.2 como anticuerpo de detección b) Se utilizaron los antisueros anti apoB100 como anticuerpos de captura a una dilución 1/000, mientras que el anticuerpo 18.5.3 anti k4.2 como anticuerpo de detección a una concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para entender lo que estaba pasando se plantearon las siguientes hipótesis, las cuales fueron objeto de estudio tal como se verá en las siguientes secciones,

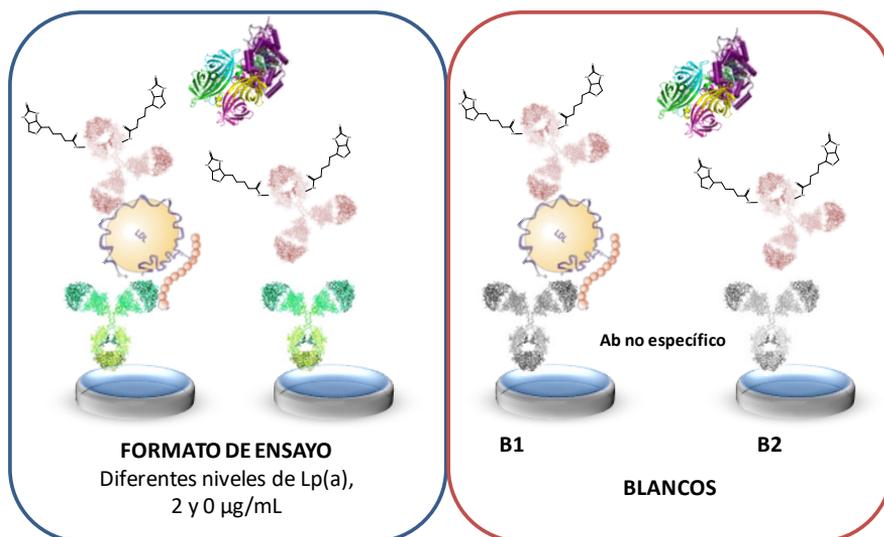
- **La Lp(a) se adsorbe de forma inespecífica a la microplaca.** La señal obtenida en presencia de Lp(a) en la Figura 3.30a, no es fruto de una captura específica. Si así lo fuera, en la Figura 3.30b, deberíamos ver señal también en presencia de Lp(a), ya que los anticuerpos

monoclonales *a priori*, deberían ser capaces de interactuar con su correspondiente epítipo, en cambio no hay respuesta.

- **Los anticuerpos policlonales anti apoB100 no son capaces de capturar la Lp(a).** Mientras que en el formato donde los anticuerpos As306, As307 y As308 se utilizan como anticuerpos de detección sí que se observa señal en presencia de Lp(a), cuando éstos se utilizan como anticuerpos de captura, no se observa señal diferente del ruido en presencia de Lp(a).
- **Falta de accesibilidad al reconocimiento de los *kringles* en la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales anti k4.1 y anti k4.2.** El epítipo de la apo(a) correspondiente a la secuencia peptídica a partir de la cual se han producido los anticuerpos monoclonales se encuentra eclipsado por la interacción no covalente apo(a)-apoB100 o por el propio anticuerpo anti- apoB100.

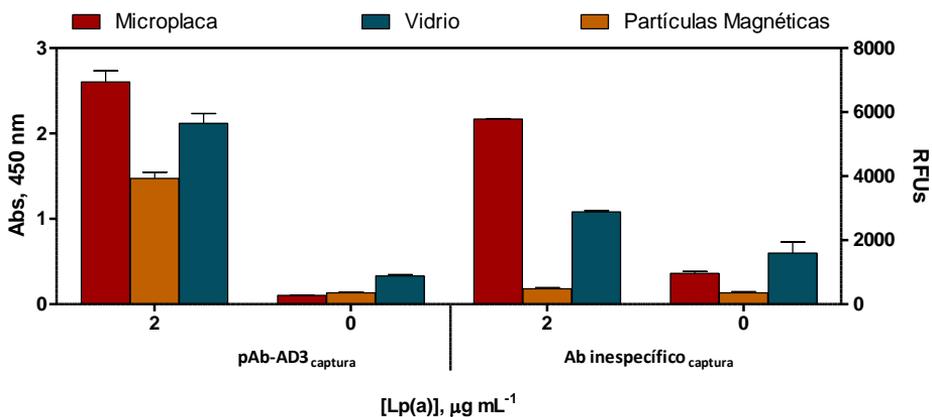
### 3.3.6.3 Evaluación del efecto del material sobre el que se inmovilizan los anticuerpos de captura

Con el fin de comprobar la primera hipótesis, se evaluaron diferentes tipos de materiales y superficies de ensayo: microplacas de poliestireno, partículas magnéticas (MP) y vidrio. El objetivo era determinar si la posible adsorción inespecífica de la Lp(a) podía minimizarse al cambiar el material. En estos experimentos se utilizó el anticuerpo pAbAD3 producido contra una secuencia específica de la apo(a) como anticuerpo de captura y el anticuerpo pAb306 biotinilado (a partir de ahora pAb306-B) anti apoB100 producido en el grupo como anticuerpo de detección. Esta combinación fue la misma que se utilizó para el desarrollo del inmunoensayo en placa para la detección de la Lp(a) descrito en la sección 3.3.3, página 55, por lo que se utilizó como control positivo para los experimentos realizados. Paralelamente, para evaluar la existencia de adsorciones inespecíficas sobre la superficie ensayada, se utilizó como blanco de captura un anticuerpo inespecífico. En la Figura 3.32 se muestra un esquema de los diferentes sistemas evaluados.



**Figura 3.32.** Formatos de ensayo planteados para la evaluación de la adsorción inespecífica de la Lp(a) sobre diferentes superficies como, microplaca de poliestireno, *slides* de vidrio y partículas magnéticas. En todos los casos se utilizó un anticuerpo no específico como blanco de anticuerpo de captura.

En la Figura 3.33 se pueden observar los resultados obtenidos para cada caso.



**Figura 3.33.** Resultados de la evaluación del efecto del material sobre la respuesta específica del ELISA para la Lp(a). Se han utilizado diferentes superficies, poliestireno, vidrio y partículas magnéticas. La señal de fluorescencia del ensayo en vidrio está referenciada al eje derecho en unidades de RFUS. La concentración de anticuerpo pAb-AD3 e inespecífico tapizado sobre la placa de poliestireno fue de 2 µg mL<sup>-1</sup>, mientras que la inmovilizada sobre el vidrio fue de 200 µg mL<sup>-1</sup>. La concentración de MP-pAb-AD3 y MP-pAb<sub>inespecífico</sub> fue de 0.4 mg mL<sup>-1</sup>. En todos los casos se utilizó una concentración de anticuerpo de detección pAb306-B de 2 µg mL<sup>-1</sup>.

Mientras que en la microplaca de poliestireno (barras rojas) y en la superficie de vidrio (barras azules), la Lp(a) se adsorbe inespecíficamente, ya que se observa una señal en presencia de Lp(a) donde se encuentra inmovilizado un anticuerpo de captura inespecífico, al trabajar con partículas magnéticas, la señal inespecífica se reduce considerablemente hasta el punto de no observar ningún tipo de respuesta en ninguno de los dos blancos (barras ocres). Este resultado podría explicarse teniendo en cuenta el carácter hidrofílico de la Lp(a) aportado principalmente por la apo(a)<sup>46, 72</sup> y el carácter hidrofóbico de la capa de poliuretano que recubre las partículas magnéticas, evitando de esta forma que la Lp(a) se adhiera inespecíficamente sobre la superficie de éstas.

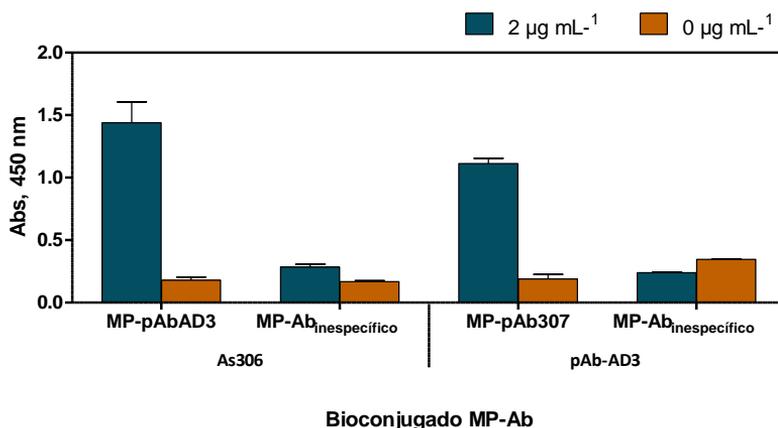
A la vista de los resultados obtenidos, se deduce que muy probablemente, la respuesta obtenida cuando se utilizan los anticuerpos monoclonales como anticuerpos de captura, sea realmente fruto de la adsorción inespecífica de la Lp(a). Por este motivo, se procedió a trabajar con partículas magnéticas a partir de este momento.

#### **3.3.6.4 Comprobación de la capacidad de captura específica de la Lp(a) por parte de los anticuerpos anti apoB100**

Puesto que los estudios anteriores se habían realizado con un anticuerpo comercial como modelo, decidimos comprobar si realmente se observaba el mismo efecto cuando se utilizaban los anticuerpos policlonales anti apoB100 para captura de la Lp(a). Para esto, el As306 anti-apoB100 se unió covalentemente partículas magnéticas de la misma forma que se había hecho con el pAbAD3 (véase sección 6.4.5, pág. 197), y se procedió a evaluar su capacidad de captura mediante ELISAs sándwich, utilizando ambos anticuerpos para la detección. Estos experimentos se realizaron en paralelo con partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpo no específico, comprobando la respuesta en presencia ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y ausencia ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de Lp(a).

En la Figura 3.34 se muestran los resultados obtenidos. Puede observarse como en ambos casos la captura y detección de la Lp(a) por parte, tanto del anticuerpo comercial pAb-AD3 anti apo(a) como del anticuerpo producido contra la apoB100, se realiza de forma exitosa puesto que la señal obtenida en presencia de Lp(a) es mayor que la señal del cero. Con este resultado se descartaba que el

motivo por el cual no se estuviera obteniendo respuesta específica fuera la incapacidad de los anticuerpos anti-apoB100 para capturar la Lp(a).

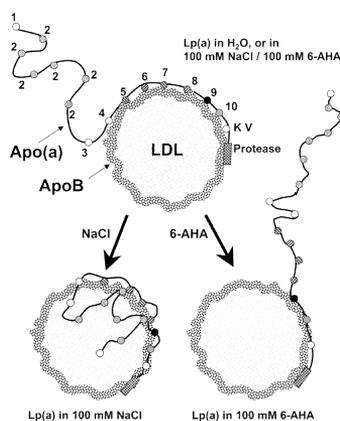


**Figura 3.34.** Magneto-ELISA para la evaluación de los anticuerpos policlonales pAbAD3 anti-apo(a) y pAb307 anti-apoB100, junto con los correspondientes blancos de captura. Para el inmunoensayo donde el pAb-AD3 actúa como anticuerpo de captura se utilizó el pAb306-b anti-apoB100 a una concentración de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  como anticuerpo de detección. Para el ensayo donde el pAb307 actúa como anticuerpo de captura, se utilizó el anticuerpo pAbAD3 como anticuerpo de detección a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.3.6.5 Accesibilidad al reconocimiento de los *kringles* por parte de los anticuerpos monoclonales anti k4.1 y anti k4.2

Finalmente se procedió a realizar una serie de estudios destinados a comprobar la tercera hipótesis planteada, respecto de la accesibilidad de los *kringles* para su reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales generados. Son muchos los trabajos que revelan que más allá de la propia interacción covalente existente entre la apo(a) y la apoB100 a través del puente disulfuro<sup>157-158</sup>, la interacción apo(a)-apoB100 se inicia mediante interacciones no covalentes en las cuales se ven implicados los *kringles* de la apo(a) comprendidos entre el *kringle* 4 tipo 6 y el *kringle* 4 tipo 9<sup>159</sup>. Varios son los estudios que se enfocan en el papel que tienen los diferentes *kringles* de la apo(a) en el ensamblaje con la apoB100 para formar la Lp(a)<sup>160-162</sup>. Por lo general, todos apuntan a que la formación de la Lp(a) se da en dos pasos sucesivos. Inicialmente la apo(a) y la apoB100 interactúan de forma no covalente a través de zonas ricas en residuos Lys presentes en la apoB100. Es en esta interacción inicial donde se ven

implicados los *kringles* de la apo(a) anteriormente mencionados. En una segunda etapa se forma el enlace covalente tipo puente disulfuro entre las dos proteínas, concretamente entre el único residuo libre Cys de la apo(a) presente en el *kringle* 4 tipo 9 de la apo(a) (Cys4054), y el residuo Cys4326 de la apoB100<sup>157, 163</sup>. Estas interacciones no covalentes entre la apo(a) y los residuos Lys de la apoB100 son fundamentales para mantener la estructura nativa de la proteína, no obstante, son sensibles a la presencia de elementos análogos a la lisina, como es el caso del ácido 6-aminohexanoico (6-AHA). (véase Figura 3.35). El efecto de estos análogos aparentemente es máximo en ausencia de sales. La presencia de NaCl favorece la conformación en la que la apo(a) se repliega sobre la LDL.



**Figura 3.35.** Esquema representativo de las diferentes conformaciones que adopta la Lp(a) en agua, presencia de sal y/o 6-AHA. Los números presentes en la parte superior de la molécula representan el tipo de *kringle* 4. Figura adaptada de [76], Copyright año 2000, American Chemical Society

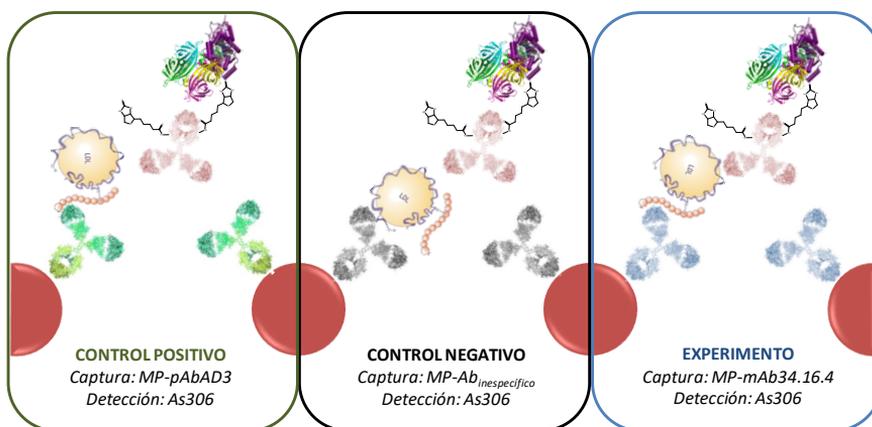
En base a esta información, con el objetivo de favorecer el reconocimiento de los *kringles*, se sometió a la Lp(a) a una serie de tratamientos que se describen a continuación

#### A. Efecto de compuestos análogos de la lisina sobre la interacción apo(a) – apoB100

Se decidió estudiar cual era el efecto del ácido 6-aminohexanoico (6-AHA), el ácido 4-aminobutírico (4-ABA) y la glicina (Gly) sobre la captura de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales anti k4.1. Para realizar estos experimentos se incubó durante la etapa de captura, la Lp(a) en presencia de

cada uno de estos compuestos, con el anticuerpo monoclonal 34.16.4 anti-k4.1 inmovilizado sobre partículas magnéticas.

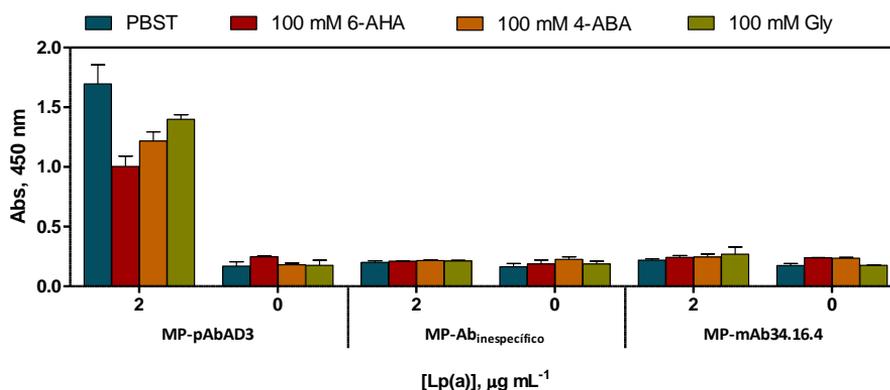
Para realizar este estudio se planteó el diseño experimental descrito en la Figura 3.36. En todos los casos se trabajó a dos niveles de Lp(a), 2 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 3.36.** Diseño experimental llevado a cabo para determinar el efecto del 6-AHA, 4-ABA y la glicina (Gly) sobre la inmunodetección de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales. Como anticuerpo monoclonal se escogió como modelo de ensayo el mAb 34.16.4 anti-k4.1.

No obstante, teniendo en cuenta que el efecto de estos compuestos en el desplegamiento de la apo(a) es máximo en ausencia total de NaCl, inicialmente se decidió comprobar cuál era la respuesta del inmunoensayo frente a la evaluación de diferentes concentraciones de NaCl, comprobándose que el ensayo era robusto en un amplio intervalo de concentraciones de NaCl, no observándose efecto alguno entre 0 y 137 mM, concentración de NaCl correspondiente al PBS-T. Esto permitía realizar los estudios planteados en

ausencia de NaCl para maximizar el efecto de los análogos de lisina, mostrados en la Figura 3.37.



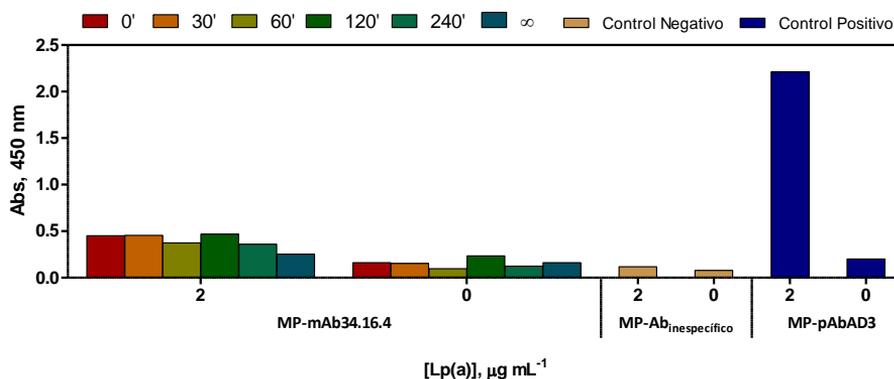
**Figura 3.37.** Gráfico donde se muestra el efecto del 6-AHA, 4-ABA y la Gly sobre la captura de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales 34.16.4 anti k4.1 inmovilizado sobre partículas magnéticas. En todos los casos se utilizó el anticuerpo policlonal pAb306-B como anticuerpo de detección. La concentración de trabajo de los bioconjugados MP-Anticuerpo fue de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que la concentración del anticuerpo de detección pAb306-biotina fue de 1 µg mL<sup>-1</sup> para todos los experimentos.

Como puede observarse, cuando se empleó el MP-pAbAD3 para la captura y pAb306-B para la detección, se obtuvo una respuesta específica en todos los casos, de tal modo que el uso de los diferentes análogos de lisina para esta combinación de anticuerpos, no ejercieron ningún efecto significativo. Cuando se utilizaron anticuerpos no específicos, como era de esperar la señal obtenida en presencia de Lp(a) fue igual a la del ruido de fondo en todos los casos. Sin embargo, cuando la captura se realizaba con los anticuerpos monoclonales anti k4.1 no se observó ningún cambio significativo respecto del control negativo realizado en medio PBST (barras azules), con lo que el uso de estos agentes no condujo a aumentar la respuesta. siendo del mismo orden que el ruido de fondo.

A la vista de los resultados obtenidos, se planteó tratar previamente y durante un cierto tiempo la Lp(a) con estos agentes análogos a la Lys, e intentar determinar si se daba algún cambio en la captura por parte del anticuerpo 34.16.3 anti-k4.1. En segunda instancia, evaluar el efecto de la concentración de estos aditivos. Como modelo de ensayo se escogió el 6-AHA a una concentración de 100 mM en tampón 10 mM PB pH 7,5 y 0.05% Tween. Las diferentes etapas

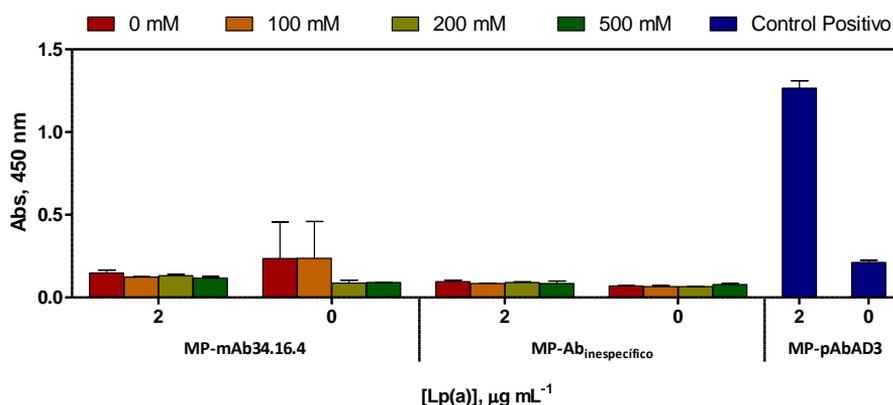
de pretratamiento se realizaron a temperatura ambiente, llevándose a cabo a diferentes tiempos de 0, 30, 60, 120 y 240 minutos, así como a las 16 horas.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3.38. Del mismo modo que en caso anterior, no se observó ningún efecto positivo en la captura de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales, independientemente del tiempo empleado en el pretratamiento.



**Figura 3.38.** Gráfico donde se muestra el efecto del tiempo de pretratamiento de la Lp(a) en medio tamponado en presencia de 100 mM 6-AHA, sobre la inmunodetección por parte de los anticuerpos monoclonales. Tanto el control negativo como el control positivo se realizaron con pretratamiento de Lp(a) a tiempo 0'. En todos los casos se trabajó a una dilución de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> de conjugado a partícula magnética, y a una dilución de 1 µg mL<sup>-1</sup> de anticuerpo de detección pAb360-B.

Finalmente, se intentó verificar si la concentración podía tener un papel relevante, realizando el tratamiento con 6-AHA a 0, 100, 200 y 500 Mm, sin observar tampoco en este caso ningún efecto positivo sobre la detección de la Lp(a) (véase Figura 3.39).



**Figura 3.39.** Gráfico donde se muestra el efecto de la concentración del 6-AHA en la fase de captura de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales. El control positivo se realizó en tampón PBS-T. En todos los casos se trabajó a una dilución de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> de conjugado a partícula magnética, y a una dilución de 1 µg mL<sup>-1</sup> de anticuerpo de detección pAb360-B.

A la vista de estos resultados negativos (ninguna de las condiciones evaluadas mostró mejora alguna sobre la captura de la Lp(a)), se procedió a estudiar cual era el efecto sobre la inmunodetección de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales bajo condiciones desnaturalizantes, confiando en que este tratamiento permitiría liberar la apo(a) haciendo que los *kringles* fueran mucho más accesibles.

### B. Estudios de reconocimiento molecular de la Lp(a) en condiciones desnaturalizantes

Dado que no se obtuvo ningún resultado positivo con la evaluación de los diferentes agentes análogos a la Lys y el consecuente desplegamiento de la apo(a), se decidió abordar la problemática de la inmunodetección de la Lp(a) por parte de los anticuerpos monoclonales desde otro punto de vista. Se planteó la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales producidos a partir de determinadas secuencias peptídicas, no fueran capaces de detectar la Lp(a) debido a la conformación tridimensional del péptido dentro de la propia Lp(a) y al eclipsamiento de los epítopos, fruto del plegamiento descrito anteriormente, de la apo(a) sobre la apoB100.

Varios trabajos describen que aquellos anticuerpos producidos contra un péptido lineal no son capaces de detectar su correspondiente epítipo ya que

este puede verse eclipsado por la propia conformación nativa de la proteína, o bien, por las diferencias conformacionales entre el péptido lineal utilizado como hapteno y la propia secuencia peptídica dentro de la proteína<sup>164-165</sup>. No obstante, sí que está descrito el uso de anticuerpos producidos contra péptidos lineales para el desarrollo de técnicas tipo Western blot, ya que éstas implican la desnaturalización completa de la proteína, exponiendo los epítomos de forma conformacionalmente semejante al inmunógeno utilizado.

Varios son los trabajos que se han enfocado en el aislamiento y caracterización de la apo(a) a partir de la Lp(a) mediante tratamientos con agentes reductores como Ditiotreitól (DTT), y posterior análisis por medio de técnicas tipo Western blot<sup>64-66</sup>. En todos ellos inicialmente se aísla la Lp(a) del resto de proteínas presentes en el suero, por medio de técnicas de ultracentrifugación con gradiente salino. Seguidamente, se somete a la Lp(a) a una etapa de digestión en presencia de DTT, y finalmente se separan las proteínas del crudo de digestión por medio de técnicas electroforéticas tipo SDS-PAGE para evaluarlas por medio de técnicas tipo Western blot.

Siguiendo este razonamiento, se propuso demostrar la viabilidad de los anticuerpos monoclonales producidos contra la Lp(a) a través de técnicas de electroforesis en gel y posterior Western blot.

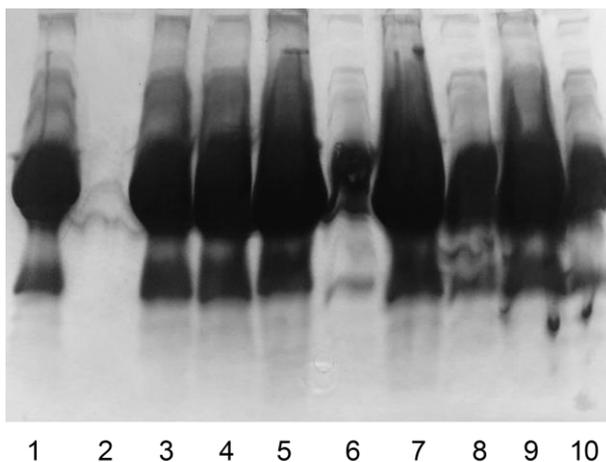
### **3.3.7 Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales mediante Western blot para la detección de la Lp(a)**

#### **3.3.7.1 Optimización de las condiciones de desnaturalización de la Lp(a)**

El primer paso tomado en esta dirección fue el de optimizar las condiciones de reducción de la Lp(a). Según trabajos previamente descritos, condiciones reductoras en presencia de 10 mM DTT a 37 °C durante 15 minutos o bien durante una hora a temperatura ambiente serían suficientes para conseguir romper la interacción apo(a) - apoB100, incluso romper los puentes disulfuro intrakring<sup>64</sup>.

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para romper las interacciones entre ambas apolipoproteínas, se evaluaron el uso de DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME) a dos concentraciones diferentes de 10 y 100 mM, y también en presencia de agentes caotrópicos como la urea. Posteriormente, cada muestra de Lp(a) se evaluó mediante electroforesis en gel en condiciones reductoras.

La Figura 3.40 muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse, en la mayoría de las condiciones estudiadas se pudieron observar dos bandas de mayor intensidad. Mientras que en los carriles 3-10 se realizó una digestión a 37 °C durante 15 minutos, en el carril 1 la digestión se realizó en 10 minutos, pero a una temperatura entre 90-100 °C y con DTT a una concentración 50 mM. Dado que carecíamos de marcadores de peso molecular tan grandes, se decidió incluir la apoB100 como referencia (carril 2), cuyo peso molecular es de 550 kDa.



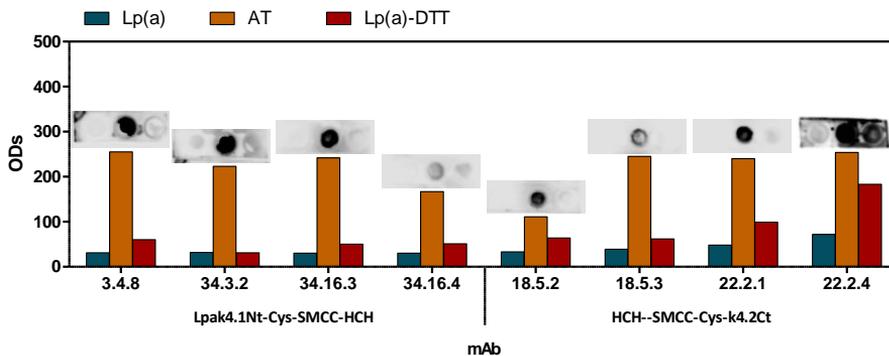
**Figura 3.40.** Diferentes condiciones reductoras para la Lp(a) evaluadas por SDS-PAGE en gel de gradiente a 4-15 %, 100 V 75 minutos, tras el paso de tinción con Coomassie Blue. En todos los casos, excepto en los carriles 1 y 2, el pretratamiento de la proteína se realizó a 37 °C durante 15 minutos. **Carril 1 y 2**, Lp(a) y apoB100 pretratadas con 50 mM DTT 90-100 °C durante 10 minutos, respectivamente. **Carril 3**, Lp(a) tratada con 10 mM DTT. **Carril 4**, Lp(a) tratada con 100 mM DTT. **Carril 5**, Lp(a) con 10 mM de 2-ME. **Carril 6**, Lp(a) con 100 mM de 2-ME. **Carril 7 y 8**, Lp(a) con 8 M Urea con 10 y 100 mM de DTT, respectivamente. **Carril 9 y 10**, Lp(a) con 8 M Urea con 10 y 100 mM de 2-ME, respectivamente. La cantidad de proteína cargada fue de 5.20 µg para cada carril, excepto para los carriles 4, 6, 8 y 10, donde debido al exceso de viscosidad de la muestra tras el paso de digestión, se cargó menos volumen y consecuentemente, menos cantidad de muestra.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió trabajar en condiciones de digestión de 50 mM DTT 10 minutos 90-100 °C, pues parecían conseguir la

disrupción del enlace tiol-tiol entre la apo(a) y la apoB100 de forma eficaz y en menos tiempo, observándose bandas mejor definidas.

### 3.3.7.2 Evaluación de la inmunodetección de los anticuerpos monoclonales mediante técnicas tipo Dot blot

Inicialmente se evaluaron todos los anticuerpos monoclonales a modo de screening, mediante técnicas de Dot blot. El objetivo principal de este paso previo al Western blot fue el de comprobar qué anticuerpos eran capaces de reconocer la Lp(a) después del paso de desnaturalización en presencia de DTT y a alta temperatura (véase sección 6.6.6, pág. 214). Así pues, se evaluó la inmunodetección de la Lp(a), sin ningún tipo de pretratamiento a modo de control negativo, y de los bioconjugados homólogos al inmunógeno (Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA y BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct) como controles positivos. En la Figura 3.41 se muestra una imagen del Dot blot tras el correspondiente escaneado de las membranas de nitrocelulosa, junto con un gráfico donde se expresan las diferentes intensidades de señal cuantificadas.



**Figura 3.41.** Gráfica donde se muestran las diferentes intensidades para cada antígeno y con cada anticuerpo monoclonal, 3.4.8, 34.3.2, 34.16.3 y 34.16.4 para el *kringle* k4.1, y 18.52, 18.5.3, 22.2.1 y 22.2.4 para el *kringle* k4.2, tras escanear las membranas y realizar el revelado con sustrato quimioluminiscente. Se presentan las imágenes escaneadas para cada sistema. En todos los casos se depositaron sobre la membrana 5  $\mu\text{g}$  tanto de Lp(a), como de Lp(a) tratada con DTT, así como de los bioconjugados Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA y BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. Todos los anticuerpos monoclonales se evaluaron a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

En mayor o menor grado, se observa como prácticamente todos los anticuerpos monoclonales mostraron una respuesta para la Lp(a) tras ser tratada con DTT mientras que la Lp(a) no tratada apenas era reconocida. Este hecho dejaba

entrever la posibilidad de mejorar el reconocimiento de la apo(a) una vez se encuentra desplegada y separada de la apoB100.

### **3.3.7.3 Evaluación de la inmunodetección de los anticuerpos monoclonales mediante técnicas tipo Western blot**

Con estos resultados abordamos la evaluación del perfil de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales evaluando el reconocimiento de la Lp(a), la apoB100 y el plasminógeno. De este modo nos asegurábamos de que en el caso de que existiera algún tipo de reactividad cruzada tras el paso de desnaturalización de las proteínas, la pudiéramos observar. Así mismo, se incluyó en estos estudios el pAb306 como referencia. El protocolo seguido se detalla en la sección 6.6.8, página 218.

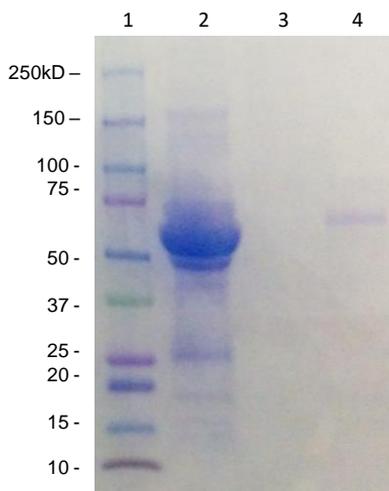
#### **A. Optimización de la carga de proteína para la electroforesis en gel de gradiente SDS-PAGE**

Esta descrito que ciertas apolipoproteínas como la apoB100 y la Apo E plantean problemas en los estudios de electroforesis debido a su baja solubilidad, lo que dificulta su penetración en el gel<sup>166</sup>. Por este motivo se decidió optimizar la carga de proteína, evaluando como se comportaban diferentes cantidades (1, 0.5 y 0.1 µg) de apoB100 en el gel de electroforesis y en la transferencia a la membrana de nitrocelulosa donde se realizaba el Western blot. Como puede observarse, utilizando una concentración de anticuerpo de 4 µg mL<sup>-1</sup>, la señal a 0.5 µg de carga de proteína es considerablemente baja. Así pues, se decidió trabajar a una carga de proteína de 1 µg.



**Figura 3.42.** Ensayo Western Blot para la optimización de la carga de apoB100 en el gel. La transferencia se realizó durante 2 h a 4 °C a 350 mA. Carril 1-3, apoB100 a 1, 0.5 y 0.1 µg, respectivamente. Se trabajó a una concentración de anticuerpo policlonal anti apoB100 de 4 µg mL<sup>-1</sup>.

Seguidamente se comprobó si este comportamiento se podía hacer extensible a la Lp(a), el plasminógeno y la apoB100. En la Figura 3.43 se muestran los resultados de la electroforesis en gel de gradiente SDS-PAGE 4-15% (sección 6.6.7, pág. 216).



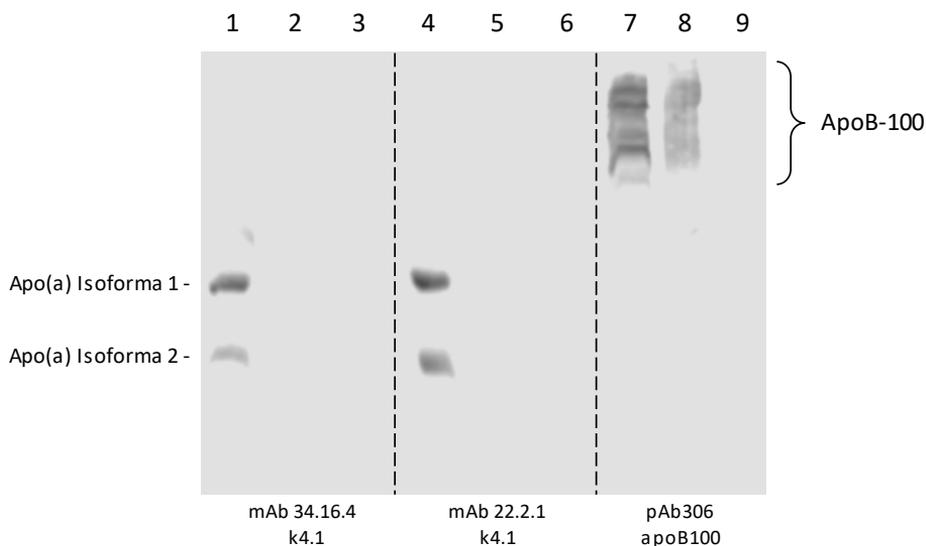
**Figura 3.43.** Evaluación de la Lp(a) (carril 2), apoB100 (carril 3) y plasminógeno (carril 4), por electroforesis en gel de gradiente, SDS-PAGE 4-15% en condiciones reductivas. En todos los casos se cargó 1 µg de proteína. Tras la correspondiente tinción por Coomassie Brilliant Blue G-250, puede observarse, carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, Lipoproteína (a). Carril 3, apoB100, y carril 4, plasminógeno.

En el carril 2 puede observarse el perfil migratorio de la Lp(a) tras su pretratamiento en presencia DTT 50 mM y 90-100 °C. Por lo general, se observan diferentes bandas, hay que considerar que este estándar de Lp(a) no se

encuentra completamente purificado, por lo que contiene proteínas procedentes del suero. Concretamente tiene una concentración proteica total de  $5.1 \text{ g dL}^{-1}$  (cuantificado mediante método Biuret, según casa comercial), mientras que de Lp(a) tan solo una concentración de  $99.2 \text{ mg dL}^{-1}$  (determinada mediante técnicas turbidimétricas, seguido de cuantificación por Biuret, según casa comercial), con lo que hay que tener en cuenta la cantidad extra de proteína que se cargada en el gel cuando ajustamos los cálculos para cargar tan solo  $1 \mu\text{g}$  de Lp(a), siendo de esta forma normal que encontremos más de una banda.

En cuanto al plasminógeno, proteína aislada completamente y de peso molecular alrededor de 90 kDa, se observa una banda discreta entre 100 y 75 kDa. En lo referente a la apoB100, a pesar de que tras la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y la realización del Western Blot, apreciamos señal específica con el anticuerpo policlonal generado contra toda la apoB100, la tinción del gel con Coomassie Brilliant Blue G-250 no muestra ningún rastro de la apoB100, esto es, ni en el carril donde hay Lp(a), ni tampoco en el carril donde se cargó la apoB100. Considerando que la detectabilidad del Coomassie Blue G-250 es de alrededor  $30 \text{ ng}$  de proteína<sup>167</sup> y que a priori la carga de apoB100 es de  $1 \mu\text{g}$ , la tinción por falta de sensibilidad no debería de ser un problema. No obstante, son varios trabajos los que describen las diferentes dificultades que presentan este tipo de apolipoproteínas cuando intentan analizarse por medio de técnicas electroforéticas. Por lo general, la mayoría de estudios documentados coinciden en que la baja solubilidad de la apoB una vez delipidada, así como la facilidad de esta proteína para sobrecargar el carril, necesitando de esta forma una concentración de acrilamida muy baja para facilitar la penetración total en el gel, siendo estos los principales factores que limitan su separación y visualización por métodos de electroforesis<sup>166, 168-169</sup>. Es en el trabajo realizado por Curtiss *et al.*<sup>170</sup> en el cual se caracterizan las diferentes isoformas de la apoB presentes en el suero, mediante la inmunodetección por parte de diferentes anticuerpos monoclonales, donde todas estas dificultades se ponen de manifiesto. Se discute la falta de solubilidad de este tipo de proteínas, y las limitaciones en la eficiencia en el paso de transferencia a la membrana de nitrocelulosa, pero que, a pesar de ese bajo rendimiento de transferencia, la cantidad de proteína fijada en la membrana es suficiente como para poder ser detectada por los correspondientes anticuerpos.

Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de tinción de los geles, que, por lo general en los trabajos citados anteriormente, son mayores de 1 h mientras que en nuestro caso, el tiempo de incubación del gel con Coomassie Brilliant Blue G-250, es de 3 minutos, tiempo suficiente como para poder observar bandas teñidas. A pesar de lo anteriormente expuesto, y tal y como describe Curtiss *et al.* en su trabajo, la cantidad de apoB100 transferida, *a priori* también fue suficiente como para ser detectada por el anticuerpo policlonal. En la Figura 3.44 se muestran los resultados del Western blot.



**Figura 3.44.** Resultado del Western Blot para la caracterización de la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti apo(a). La transferencia se realizó durante 2 h a 4 °C a 350 mA. Carriles 1, 4 y 7: Lipoproteína (a). Carriles 2, 5 y 8: apoB100. Carriles 3, 6 y 9: plasminógeno. En los carriles 1-3 se evaluó el mAb 34.16.4 (anti k4.1) mientras que en los carriles 4-6 el mAb 22.2.1 (anti k4.2). El anticuerpo policlonal pAb306 anti apoB100 se evaluó en los carriles 7-9. La concentración de trabajo de todos los anticuerpos fue de 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La carga de proteína evaluada en todos los casos fue de 1  $\mu\text{g}$ .

Tal y como puede observarse, cuando se utilizaban los anticuerpos monoclonales anti apo(a) (carril 1 para el anticuerpo anti k4.1, y carril 4 para el anticuerpo anti k4.2) pudieron visualizarse las bandas características de la Lp(a). Este resultado es muy positivo ya que pone en por primera vez en evidencia, de forma muy clara, que los anticuerpos generados contra pequeñas secuencias peptídicas de los *kringles* k4.1 y k4.2 son capaces de reconocer la apo(a). Además, este resultado también pone de manifiesto que el estándar de Lp(a) que estamos utilizando, está formado por un pool de pacientes con al menos dos isoformas

diferentes de apo(a). La información referente al número de individuos a partir de los cuales se preparó esta Lp(a) comercial no fue proporcionada por la casa comercial.

En lo que respecta a la especificidad de los anticuerpos, puede observarse como en ningún caso los anticuerpos monoclonales presentan reconocimiento alguno de la apoB100 ni por el plasminógeno (carriles 2 y 3 para el anticuerpo anti k4.1 y 5 y 6 para el anticuerpo anti k4.2). Este resultado también nos permite pues garantizar que la separación de ambas proteínas (apo(a) y apoB100) ha tenido lugar de forma exitosa. Del mismo modo, se puede observar como el anticuerpo anti-apoB100 generado también reconoce de forma específica a esta proteína de la Lp(a). Así, como puede observarse, el anticuerpo policlonal anti-apoB100 (carriles 7, 8 y 9), muestra las mismas bandas tanto para el estándar de apoB100, como para la Lp(a), mientras que en los carriles donde se ha sembrado la apo(a) o el plasminógeno no se observa señal alguna. Este hecho vuelve a confirmar que la separación apo(a)-apoB100 se ha realizado satisfactoriamente.

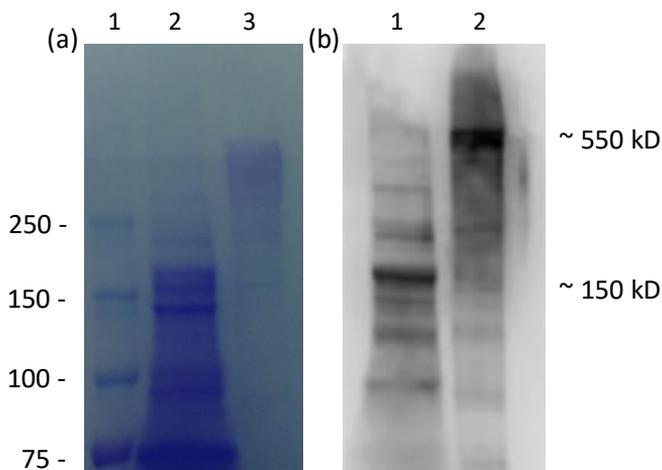
Podemos confirmar, a la vista de los resultados, que los anticuerpos monoclonales generados contra los *kringles* k4.1 y k4.2 son capaces de reconocer de forma específica la fracción de apo(a) de la Lp(a) una vez desnaturalizada, condiciones en las que probablemente la apo(a) se encuentre completamente desplegada. Además lo hacen de forma específica sin mostrar ningún tipo de reconocimiento del plasminógeno a pesar de guardar una homología que en algunos casos va de un 70 a un 100 % entre *kringles*<sup>171</sup>. Estos resultados reafirman los que se obtuvieron en el paso de caracterización de los anticuerpos monoclonales (Figura 3.29, pág. 87) que, tras el paso de purificación, mostraron un mayor reconocimiento de la apo(a) frente al plasminógeno. Respecto al anticuerpo policlonal anti apoB100, en el carril 7, perteneciente a la Lp(a) se aprecia un conjunto de bandas más intensas que el ruido de fondo. Esto puede deberse a que el estándar de Lp(a) utilizado no está completamente aislado de otras proteínas del suero, de tal forma que, a falta de confirmación, el anticuerpo policlonal anti apoB100 podría tener una reactividad cruzada con otras isoformas de la apoB presentes en el suero, como lo son la apoB74 ( $M_r$  407.000  $\pm$  5790), apoB48 ( $M_r$  264.000  $\pm$  8150) o incluso aunque menos probable, con la apoB26 ( $M_r$  144.550  $\pm$  8970)<sup>169</sup>. Teniendo en cuenta esta consideración, el anticuerpo anti apoB100 también sería capaz de reconocer otras lipoproteínas presentes en el suero, como la LDL o la VLDL, por ejemplo. Con esto podemos asegurar que el

anticuerpo policlonal no reconoce ni la apo(a), ni tampoco el plasminógeno, mostrando alta especificidad por la apoB100.

Dado que anteriormente no se había realizado ningún gel de carga, y debido a que los pesos moleculares de estas proteínas son mucho mayores que los presentes en el marcador de pesos moleculares, se procedió a optimizar el tiempo de migración y a estudiar los dos perfiles resultantes. Hay que considerar que tanto la apo(a) como la apoB100 requieren de mayor tiempo de migración, ya que, por su tamaño y comportamiento, no son capaces de penetrar en el gel en el tiempo que, por defecto, realizamos la electroforesis (75 minutos).

### **B. Optimización del tiempo de migración**

Se procedió a evaluar el perfil de migración de las proteínas empleando más tiempo de migración que el utilizado hasta el momento. Se decidió de esta forma detener el proceso de electroforesis una vez la banda de 50 kDa del marcador de pesos moleculares saliera del gel. Con esto, eliminaríamos la posible presencia de IgGs y también albúminas, principalmente y comprobaríamos si a mayor tiempo de migración, tanto la apoB100 como la apo(a) eran capaces de penetrar en el gel. Siguiendo este procedimiento se evaluaron la Lp(a) y la apoB100 y posteriormente se realizó el correspondiente Western blot con el anticuerpo pAb306 anti apoB100. Si observamos el resultado del gel SDS-PAGE tras la tinción y un tiempo de migración de 5h (Figura 3.45 a), para la Lp(a), carril 2, pueden apreciarse bandas de elevado peso molecular (> 100 kDa) que no se observaban anteriormente, cuando la migración de las proteínas se llevaba a cabo durante 1 hora. Del mismo modo ocurre para la apoB100, carril 3, donde se observa una banda, con lo que podemos presuponer que la apoB100 ha conseguido penetrar en el gel con mayor eficiencia. En cuanto a los resultados referentes al Western blot (Figura 3.45 b), el anticuerpo policlonal anti-apoB100 (carril 1 y 2) mostró dos bandas más intensas, una para cada proteína y cada una a un peso molecular diferente. La banda observada en el carril 1, correspondiente a la Lp(a), coincide aproximadamente con el peso molecular de una de las diferentes especies de apoB descritas por John P. Kane *et al.*<sup>169</sup>, concretamente la apoB 26, 144 kDa.



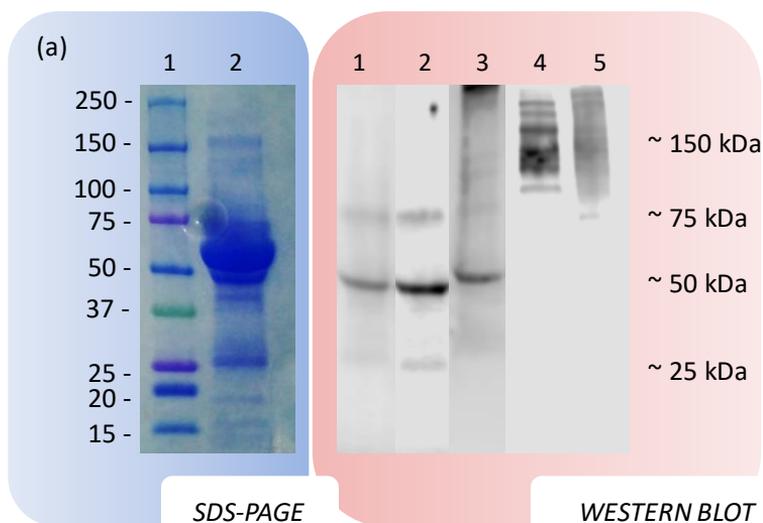
**Figura 3.45.** (a) Resultado de la electroforesis en gel de gradiente 4-15% SDS-PAGE en condiciones reductivas llevado a cabo durante 5 h a un voltaje constante de 100 V. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, Lp(a). Carril 3, apoB100, ambas proteínas se cargaron a 1  $\mu\text{g}$ . (b) Western blot después de 4-15% SDS-PAGE, para la Lp(a) y apoB100 mediante el uso del anticuerpo policlonal 306 anti apoB100 a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En el carril 1 se encuentra la Lp(a), mientras que en el carril 2, la apoB100. En ambos casos las proteínas fueron previamente reducidas.

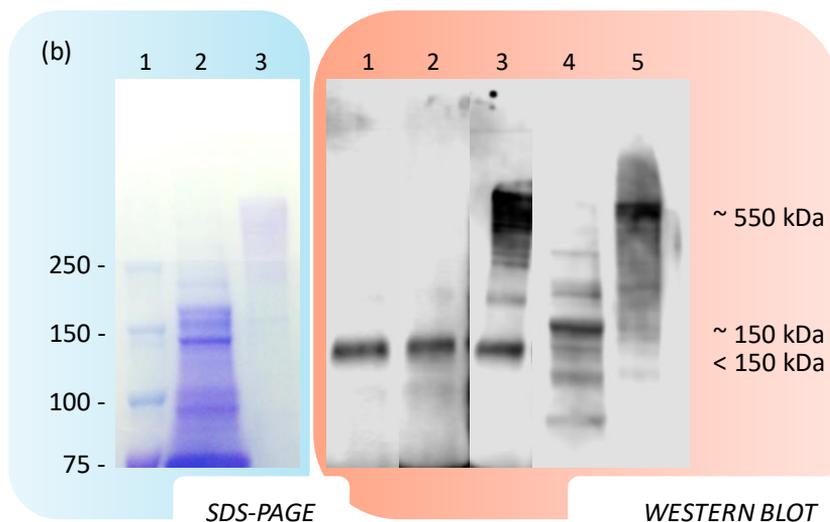
El hecho de encontrar una banda de apoB de peso molecular más bajo podría atribuirse a diferentes fenómenos atendiendo a los diferentes trabajos publicados. Según Kane *et al.*<sup>169</sup>, cualquier fenómeno de proteólisis podría degradar la apoB en sus diferentes subespecies. Hay que considerar que la Lp(a) utilizada en esta tesis no se encuentra completamente aislada, por lo que sería posible que en el medio hubieran enzimas capaces de degradar la apoB100. Adicionalmente a este fenómeno, Kane *et al.* pone de manifiesto que el efecto del calor junto con la presencia de agentes reductores como el SDS, puede producir la presencia de bandas de peso molecular más bajo. Por otro lado, estudios realizados por Chulkova *et al.*<sup>172</sup>, sugieren que la apo(a) ejerce un efecto proteolítico sobre la apoB100, provocando la degradación de esta apolipoproteína y consecuentemente la observación de bandas de peso molecular menores a la que corresponde a la apoB100.

Seguidamente se evaluaron los dos perfiles de migración mediante electroforesis en gel de gradiente SDS-PAGE 4-15% y el subsecuente Western blot. Para esto se utilizaron el anticuerpo policlonal pAb306 anti-apoB100 y el anticuerpo policlonal anti-apo(a) pAbAD3 comercial anti-apo(a). Junto a estos anticuerpos se evaluaron los anticuerpos monoclonales 34.3.2 anti-k4.1 y 18.5.2 anti-k4.2.

No olvidemos que el propósito de este experimento era la caracterización del reconocimiento de los anticuerpos monoclonales producidos contra la apo(a), una vez esta se encuentra desplegada y separada de la apoB100.

En la Figura 3.46 pueden observarse los resultados obtenidos para cada tiempo de migración. En el caso en el que el tiempo de migración de las proteínas es más corto (Figura 3.46 a), todos los anticuerpos generados contra la apo(a) o diferentes péptidos de esta apolipoproteína, presentaban la misma banda a aproximadamente 50 kDa. El anticuerpo monoclonal sensible al número de repeticiones del *kringle* k4.2 (Figura 3.46 a, carril 2, Western blot) presenta una banda más intensa que el resto de los casos. Este resultado es el mismo que el observado anteriormente, pero ahora con el control del anticuerpo comercial AD3. Con esto, podemos decir que las bandas observadas pertenecen a la apo(a), aunque poseen un peso molecular inusualmente bajo. La interpretación de estos resultados la podemos englobar en conjunto con el resultado del Western blot a un mayor tiempo de migración de las proteínas en el paso de electroforesis (Figura 3.46 b).





**Figura 3.46. (a)** Resultado del Western blot tras electroforesis 4-15 % SDS-PAGE a un tiempo de migración de **75 minutos**. SDS-PAGE: Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, Lp(a)-WESTERN BLOT: Carril 1, 2, 3 y 4, Lp(a) con los anticuerpos, 34.3.2 anti-k4.1, 18.5.2 anti-k4.2, pAb-AD3 anti-apo(a) y pAb306 anti apoB100, respectivamente. Carril 5, apoB100 con el anticuerpo pAb306 anti-apoB100. **(b)** Resultado del Western blot tras electroforesis en gel de gradiente 4-15 % SDS-PAGE a un tiempo de migración de 5 horas. SDS-PAGE: Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, Lp(a). Carril 3, apoB100. WESTERN BLOT: Carriles 1, 2, 3 y 4 Lp(a) con los anticuerpos 34.3.2 anti-k4.1, 18.5.2 anti-k4.2, pAb-AD3 anti-apo(a) y pAb306 anti apoB100, respectivamente. Carril 5, apoB100 con el anticuerpo pAb306 anti-apoB100. En todos los casos la carga de proteína fue de 1  $\mu\text{g}$ , y la concentración de los anticuerpos evaluados de 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los carriles 4 y 5 en (a) y (b) pertenecen a experimentos realizados anteriormente.

En este caso el perfil de migración es diferente, observando para todos aquellos anticuerpos capaces de detectar la apo(a), una banda de mayor o menor intensidad situada por debajo de los 150 kDa (Figura 3.46 b, Western blot, carriles 1, 2 y 3), justo después de la apoB100 procedente de la Lp(a) (Figura 3.46 b, Western blot, carril 4). Con esto, podemos decir que la principal isoforma de la apo(a) detectable en este caso, posee una movilidad semejante o más rápida que la apoB100 presente en la muestra. Del mismo modo que en el caso anterior (Figura 3.46 a), las bandas que revelan los anticuerpos corresponden a un tamaño molecular inusualmente pequeño para la apo(a).

Con toda esta información y a la vista de los resultados obtenidos, podemos confirmar que un aumento en el tiempo de migración en el paso de la electroforesis, favorece la penetración de las apolipoproteínas en el gel. No obstante, el hecho de que después de observar que a ambos tiempos de migración se detectan bandas de la apo(a) con todos los anticuerpos anti apo(a)

utilizados, nos lleva a pensar que al igual que con la apoB100, la apo(a) ha sufrido algún tipo de fenómeno de oxidación y/o proteólisis tras el paso de desnaturalización y reducción con DTT. Por este motivo, y tal y como describe Gaubatz *et al.*<sup>60</sup>, observamos bandas correspondientes a la apo(a) comprendidas entre 25 y 400 kDa.

Por su parte, los anticuerpos producidos en esta parte de la tesis han demostrado ser específicos. Si bien los anticuerpos policlonales son capaces de detectar tanto la apoB100 como la Lp(a) en condiciones normales y reductoras, los anticuerpos monoclonales tan sólo son capaces de detectar su correspondiente epítipo una vez la Lp(a) ha sido completamente reducida, y consecuentemente, la apo(a) se encuentra completamente desplegada. Con esto podemos decir que la inmunodetección de la apo(a) por parte de estos anticuerpos producidos contra péptidos lineales está determinada principalmente por dos factores; el eclipsamiento del epítipo debido a la configuración tridimensional de la proteína, interacción apoB100-apo(a) y plegamiento de la apo(a) sobre la apoB, junto con la propia configuración del epítipo en la conformación de la proteína.

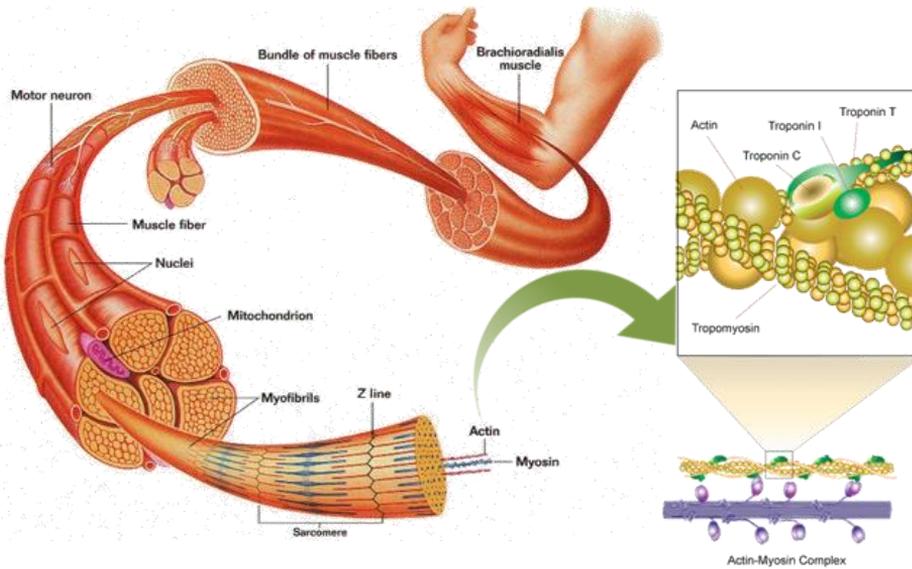
A la vista de estos resultados, podemos asegurar que los anticuerpos monoclonales podrían constituir una herramienta útil de diagnóstico para la estratificación del riesgo cardiovascular asociado, tanto a la concentración de Lp(a) como al número de repeticiones del *kringle* k4.2. Aunque por falta de tiempo no hemos podido alcanzar el objetivo inicialmente planteado, los inmunorreactivos producidos y el conocimiento generado en esta tesis doctoral pueden ser la base para desarrollar una herramienta de diagnóstico muy potente que permitiría detectar el riesgo de padecer ECVs.

## **4 Troponina I Cardíaca**

---

## 4.1 Introducción

La troponina I (TnI) es una proteína muscular que forma parte de un complejo trimérico junto con dos subunidades más, la troponina C (TnC) y la troponina T (TnT), llamado complejo ITC, que se encuentra localizado en el filamento fino del complejo actina-tropomiosina de las células contráctiles, y cuyo rol principal es la regulación de la contracción, tanto del músculo cardíaco como del esquelético mediante la captación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>173</sup>(Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Esquema representativo de la composición del músculo y la localización del complejo trimérico de troponina en las fibras de tropomiosina. Figura adaptada de <http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/metabolomics/enzymeexplorer/learningcenter/structural-proteins/troponin.html>

Tan sólo la troponina T y la troponina I tienen cierto interés clínico, ya que a diferencia de la troponina C, poseen isoformas cardiospecíficas. Mientras que para la troponina T se han descrito varias isoformas cardíacas (cTnT), la troponina I presenta una única isoforma específica del músculo cardíaco (cTnI) expresada en el miocardio. Por su parte, todas las subunidades del complejo ITC presentan dos o más isoformas relacionadas con el tejido muscular esquelético.

Ante episodios de necrosis cardíaca, se ha demostrado que inicialmente es la cTnT la que es liberada al torrente sanguíneo, y con posterioridad, la cTnI y el complejo ternario ITC. Los complejos ternarios tienen un tiempo de vida media

corta, ya que rápidamente se disocian en cTnT y en el complejo binario cTnI-TnC<sup>174</sup>. En el caso de la cTnI, la forma mayormente liberada es el complejo binario cTnI-TnC, aunque también es posible encontrarla libre como cTnI. La proporción de cTnI y del complejo binario cTnI-TnC presente en sangre tras el infarto y necrosis del miocardio varía con el tiempo, siendo mayor la liberación del complejo en las fases más tardías del proceso. Una vez liberada la cTnI y sus formas complejadas, éstas pueden sufrir procesos de fosforilación, defosforilación o degradación proteolítica<sup>175</sup>. Está documentado que la zona más estable de la cTnI frente a las posibles modificaciones que pueda sufrir es la que esta comprendida entre los aminoácidos 30-110<sup>176</sup>. Por este motivo, el *Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage* de la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) recomienda que los anticuerpos utilizados para el desarrollo de técnicas inmunoquímicas destinadas a la detección de esta proteína reconozcan principalmente su región central, resultando de este modo poco o nada afectados por la formación de complejos u otro tipo de modificaciones *in vivo*<sup>173, 177</sup>.

La troponina I cardíaca es una proteína formada por 210 aa y con un elevado punto isoelectrónico de alrededor 9.9, lo que implica que, a pH fisiológico, la mayor parte de sus residuos se encuentran cargados positivamente. Es importante atender a diferentes aspectos particulares que conciernen la estructura de esta proteína (Figura 4.2), así como los cambios significativos que puede llegar a sufrir, si nuestro objetivo principal es su detección mediante el uso de anticuerpos. De este modo podemos destacar,

1. La región N-terminal de la cTnI, comprendida entre los aa 1-30, es considerada como región cardiospecífica ya que no está presente en su isoforma esquelética (sTnI). Del mismo modo, la región N- y C-terminal son las más antigénicas de la cTnI<sup>178</sup>
2. La presencia en su estructura de aminoácidos sensibles a la fosforilación como las Ser<sub>23/24</sub> y las Ser<sub>43/45</sub> por parte de la Proteína Quinasa A (PKA)<sup>173, 179-180</sup>
3. Formación del complejo IC/ITC. Ciertas regiones de la cTnI están directamente relacionadas con la formación tanto del complejo binario IC, como del ternario ITC. De este modo, las regiones comprendidas entre los residuos 34-71 de la zona N-terminal, así como la región del dominio C-terminal 147-163, se encuentran implicadas en la interacción

con la TnC. Mientras que la región aa80-136 de la cTnI es responsable de la unión con la cTnT<sup>173, 181</sup>.

4. La región comprendida por los residuos 128-147 corresponden al péptido inhibidor, y la región C-terminal comprendida entre los aa164-210, responsables de la unión entre la cTnI y el complejo actina-tropomiosina<sup>181</sup>
5. La cTnI puede verse implicada en fenómenos de oxidación-reducción en sus residuos Cys<sub>80/97</sub>, pudiéndose llegar a formar un puente disulfuro y por lo tanto un cambio conformacional significativo.
6. La interacción con otras moléculas con carga negativa como es el caso de la heparina, debido al elevado punto isoeléctrico de la cTnI, puede llegar a interferir en su inmunodetección<sup>182</sup>.
7. Adicionalmente a todos los factores expuestos anteriormente, también se describe el efecto sobre la detección de la cTnI que tienen la presencia de autoanticuerpos, así como posibles restos de fibrina resultantes de una coagulación incompleta, pudiendo dar lugar a la obtención de falsos positivos<sup>183-184</sup>.



**Figura 4.2.** Secuencia de aminoácidos que componen la cTnI. Se remarcan entre ellos aquellos que poseen una carga positiva a pH fisiológico, así como las diferentes regiones de la proteína involucradas en interacciones con otros componentes del complejo ITC.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, requiere de un gran esfuerzo y supone un gran reto el poder desarrollar técnicas de detección inmunoquímicas para la cTnI.

Tradicionalmente, el diagnóstico de infarto de miocardio se ha establecido de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS en los que se requerían 2 de los 3 siguientes requisitos: síntomas indicativos de isquemia, elevación de la concentración del biomarcador CK-MB y determinados cambios electrocardiográficos. No obstante, aproximadamente la mitad de los pacientes que padecen un SCA y no presentan criterios de infarto, tienen concentraciones de troponina que indican necrosis miocárdica<sup>185</sup>. Este hecho es uno de los que han llevado a modificar los criterios de diagnóstico de infarto de miocardio adoptados por la *European Society of Cardiology* (ESC) y el *American College of Cardiology* (ACC), que recomiendan remplazar la CK por las troponinas, biomarcadores de referencia, como método de elección para el diagnóstico de lesión miocárdica<sup>186</sup>.

Es por este motivo que la sensibilidad de los ensayos para la cTnI se ha ido mejorando a lo largo de los años transformándose en ensayos de alta sensibilidad (hs-cTnI), capaces de distinguir entre un leve infarto de miocardio y el ruido de fondo analítico a valores muy bajos de troponina, y que ya han sido incluidos como ensayos de rutina, mejorando así la precisión del diagnóstico clínico. Esta nueva generación de ensayos ha permitido establecer siguiendo las directrices de la ESC, así como del ACC, las condiciones en que deben obtenerse los límites de referencia para la troponina con el fin de dictaminar la existencia de un infarto de miocardio. De este modo, cualquier valor de cTnI superior al percentil 99 de una población de referencia ( $0.06 \text{ ng mL}^{-1}$ ), definiría un infarto agudo de miocardio (IAM), siempre que este valor se haya obtenido con una imprecisión analítica igual o inferior al 10%<sup>186-188</sup>. Así pues, se estima que los ensayos enfocados en la detección de cTnI están destinados a mejorar la detección en etapas tempranas del IAM, así como la estratificación del riesgo cardiovascular de forma precoz.

#### **4.1.1 Estado del Arte. Precedentes y Objetivos**

##### **4.1.1.1 Inmunoensayos en la literatura**

El principal reto a la hora de abordar la inmunodetección de la troponina I cardíaca reside en la producción de los anticuerpos y por tanto los epítomos de

la proteína que estos acabarán reconociendo. Se recomienda que al menos uno de los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo esté generado contra una región estable de la cTnI. Del mismo modo, el inmunoensayo desarrollado debería de ser capaz de detectar tanto la cTnI libre, como la asociada, ya sea en su forma de complejo IC, como en su forma de complejo ternario, ITC<sup>189</sup>. En este sentido se han desarrollado diferentes métodos enfocados a la detección y cuantificación de la troponina, como por ejemplo inmunoensayos basados en sustratos quimioluminiscentes<sup>190</sup>, fluoroinmunoensayos<sup>175, 177, 183-184, 191</sup> y ensayos colorimétricos en microplaca tipo ELISA<sup>192-194</sup>. Todos estos inmunoensayos se resumen en la Tabla 4.1, donde también se describen los diferentes epítomos contra los que están producidos los anticuerpos utilizados en cada caso, así como la detectabilidad alcanzada y el tiempo total de ensayo.

Gran parte de los inmunoensayos aquí resumidos hacen uso de anticuerpos generados contra la región central de la cTnI, siendo tan solo los inmunoensayos descritos por Hyytiä *et al.*<sup>191</sup> y Eriksson *et al.*<sup>183</sup> los que hacen uso de anticuerpos capaces de reconocer las regiones N- y C-terminal de la proteína, que a pesar de ser sensibles a la acción de las proteasas una vez la troponina es liberada al torrente sanguíneo, es cierto que son las regiones más inmunogénicas de esta proteína, además de cardioespecíficas como es el caso de la región N-terminal. Hay que remarcar el hecho de que en el trabajo de Eriksson y colaboradores, se discute la existencia de un potencial interferente que bloquea los epítomos centrales de la cTnI, sugiriendo que son los propios autoanticuerpos, o incluso regiones eclipsadas por la formación del complejo ternario, los principales causantes de esta interferencia. Proponiendo de esta forma la combinación de anticuerpos producidos contra regiones terminales con anticuerpos producidos contra regiones más estables para el desarrollo de técnicas inmunoquímicas de diagnóstico.

De entre todos los inmunoensayos colorimétricos descritos, el desarrollado por Le Moal *et al.*<sup>194</sup> es el único capaz de alcanzar una detectabilidad muy baja trabajando en plasma y mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer dos regiones diferentes de la proteína, combinados como anticuerpos de detección. Por su parte, el fluoroinmunoensayo desarrollado por Hyytiä *et al.*<sup>191</sup> también es capaz de detectar cTnI a niveles muy bajos trabajando también en plasma y haciendo uso de una combinación de anticuerpos contra la región C-terminal y contra la región central de la cTnI. A pesar de la

detectabilidad alcanzada en todos los inmunoensayos descritos, todos requieren de un tiempo excesivo para obtener una respuesta cuantificable (en algunos casos mayor a 3h), considerando el estado de emergencia en el que se atiende a los pacientes en el departamento de emergencias<sup>195</sup>.

**Tabla 4.1.** Características de los diferentes inmunoensayos descritos en la literatura para la detección de cTnI.

Método	Captura	Detección	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	t <sub>ensayo</sub> (min)	Ref.
<b>Ensayo Quimioluminiscente</b>					
	(41-49)	(41-49)	0.027	15	190
<b>Fluoroinmunoensayo</b>					
	Región Central	(41-49) <sup>b</sup>	0.1	63	175
	(34-37) <sup>a</sup>	(56-61) <sup>a</sup>	-	63	177
	(35-55)/(20-35)	(80-95)/(185-200)	0.02	125	183
	(41-49)/(100-x)	(100-x)	-	-	184
	(190-196)	(41-49) <sup>c</sup>	$4.1 \cdot 10^{-4}$	75	191
<b>ELISA</b>					
	cTnI <sup>d</sup>	cTnI <sup>d</sup>	1.9	195	192
	cTnI <sup>e</sup>	(81-7)/(21-14)	0.1	115	193
	(91-94)	(31-34)/(15-26)	$7 \cdot 10^{-3}$	135	194

<sup>a</sup> Epítomos correspondientes a los anticuerpos utilizados para la detección total de cTnI libre. En este trabajo se presenta otro ensayo para la detección de cTnI en presencia de EDTA. <sup>b</sup> Se utilizan dos anticuerpos generados contra zonas diferentes. Uno contra la región estable de la cTnI (30-110) y otros contra las regiones N- y C-terminales. <sup>c</sup> Nanopartículas de poliestireno Fluoro-Max<sup>TM</sup> que contienen Eu<sup>3+</sup>. <sup>d</sup> Anticuerpos monoclonales producidos contra toda la cTnI. Screening no detallado.

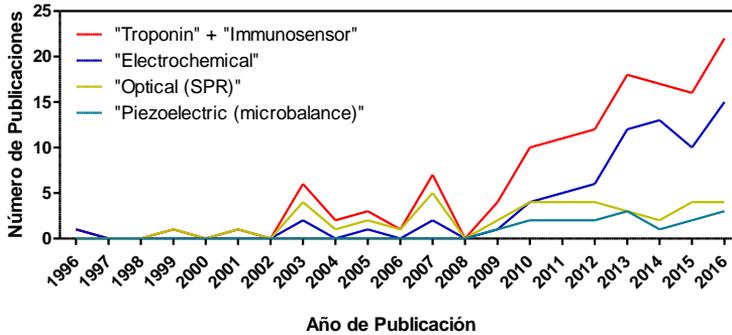
<sup>e</sup> Anticuerpo policlonal de cabra producido contra toda la cTnI

De esta forma es como el desarrollo de inmunosensores para la detección de cTnI se ha visto incrementado desde el 2002, aumentando de forma considerable a partir del 2008.

#### 4.1.1.2 Inmunosensores electroquímicos en la literatura

Si realizamos una búsqueda en el *Web of Science* mediante la introducción de dos palabras clave “Troponin” e “*immunosensor*”, acotando la búsqueda desde el año 1990 hasta la fecha actual, nos encontramos que el número de inmunosensores desarrollados para la detección de cTnI aumenta a partir del año 2006, alcanzando cada vez un mayor número de trabajos publicados,

pasando de un único trabajo publicado al inicio de la década de los 2000, a los casi 30 del pasado año 2016 (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Evolución del número de trabajos científicos publicados relacionados con el desarrollo de inmunosensores para la detección de cTnI. A su vez se muestra la evolución a lo largo de las 3 últimas décadas, del número de trabajos publicados en relación a la cTnI y utilizando diferentes tipos de transducción como la electroquímica, óptica (principalmente SPR) y piezoeléctrica. Datos obtenidos de *Web Of Science*.

Si después refinamos la búsqueda con la finalidad de diferenciar cada publicación dependiendo del método de transducción utilizado, podemos observar como es a partir del 2008, como el incremento del número de publicaciones relacionadas con la inmunodetección de la cTnI coincide firmemente con el aumento en el número de trabajos publicados basados en transducción electroquímica. Posibles razones que den explicación a esta diferenciación pueden ser, su capacidad de miniaturización, rápida respuesta y sensibilidad, bajo coste y fácil manejo. Debido a todo este tipo de prestaciones, los biosensores electroquímicos han sido ampliamente explotados desde entonces, transformándose de esta forma en una herramienta analítica efectiva y práctica para el diagnóstico de diferente tipo de enfermedades, entre ellas las cardiovasculares, y en particular para la detección de la cTnI<sup>196-197</sup>. Los principales biosensores electroquímicos utilizados en la detección de biomarcadores cardíacos son sensores que integran un elemento de reconocimiento inmovilizado sobre un tipo determinado de material. Fruto de este fenómeno de reconocimiento se genera normalmente una señal electroquímica medible. Dependiendo del método de transducción escogido, podemos encontrar biosensores amperométricos, potenciométricos e impedimétricos. Tanto los biosensores amperométricos como potenciométricos requieren de un mediador para generar una respuesta y por lo tanto son técnicas que necesitan de un

marcaje. El caso más común para los sensores amperométricos, es la utilización de una enzima, que mediante el sustrato adecuado, es capaz de generar una corriente que puede ser registrada. Para el caso de los biosensores potenciométricos, el uso por ejemplo, de nanopartículas metálicas como marcaje, puede generar bajo unas determinadas condiciones, un potencial medible. Por otro lado, los biosensores impedimétricos, están basados en la transferencia de carga generada en la superficie del electrodo y no requieren de ningún elemento de marcaje. Este tipo de biosensores únicamente dependen de los diferentes elementos inmovilizados y de los diferentes fenómenos de biorreconocimiento que ocurren en la superficie del sensor.

Las principales limitaciones que se describen en la literatura relacionadas con el desarrollo de inmunosensores electroquímicos, son básicamente dos, la compatibilidad del material utilizado con la matriz a evaluar con el fin evitar adsorciones inespecíficas, y la presencia de falsos positivos fruto de la presencia de interferentes en la matriz. Por ejemplo, O'Regan *et al.*<sup>198</sup> desarrolla un sensor amperométrico en formato sándwich, basado en la inmovilización por adsorción pasiva de los anticuerpos de captura sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono, alcanzando una detectabilidad para la detección de cTnI de 1-2 ng mL<sup>-1</sup>. No obstante, observan una sobrestimación en los valores de cTnI cuando analizan muestras que contienen anticoagulante. Del mismo modo, la capacidad de reutilización del electrodo es un estudio pendiente de realizar, siendo en este caso más frágil debido a que la inmovilización del anticuerpo sobre el electrodo se realiza de forma pasiva. Por contra, Horak *et al.*<sup>199</sup>, basándose en el mismo principio de transducción, desarrolla un inmunosensor formato sándwich, haciendo uso de un material polimérico comercial denominado Vacrel®8100 para la fabricación del chip, derivatizado con polietilenimina ramificada (PEIR) y lineal (PEIL) para la inmovilización covalente de los anticuerpos de captura. Observando que el polímero lineal es susceptible al número de lavados, mientras que el PEIR alcanza valores de detectabilidad de 25 pg mL<sup>-1</sup> con un CV de 10%, obteniendo una respuesta cuantificable en 4 minutos. Otra estrategia válida para la inmovilización de los anticuerpos de captura es la que desarrolla Ko *et al.*<sup>200</sup>, en la que tras recubrir el electrodo de oro con polidimetilsiloxano (PDMS), éste es bofuncionalizado mediante proteína G para la inmovilización de forma orientada de los anticuerpos de captura. La detección amperométrica se lleva a cabo mediante anticuerpos de detección marcados con fosfatasa alcalina. A pesar de la detectabilidad alcanzada en las

trabajos publicados, el tiempo requerido para realizar el ensayo es también demasiado largo, considerando el contexto clínico.

Siguiendo estrategias de inmovilización semejantes a las descritas, mediante la derivatización de un electrodo con un polímero y la consecuente inmovilización covalente del anticuerpo de captura, se encuentran en la literatura diferentes inmunosensores basados en transducción potenciométrica. Este es el caso de Purvis *et al.*<sup>201</sup> y Zhuo *et al.*<sup>31</sup>, donde ambos hacen uso de electrodos de oro derivatizados con polipirrol y PDMS, respectivamente. Inmovilizando covalentemente los anticuerpos de captura sobre estos polímeros, y alcanzando límites de detección, tras 280 minutos, de  $0.004 \text{ ng mL}^{-1}$  en tampón, para el segundo caso, mediante el uso de anticuerpos de detección marcados con quantum dots (QD). En este caso, el tiempo también es un factor limitante.

Son los inmunosensores impedimétricos los que presentan mejores detectabilidades alcanzadas en cortos intervalos de tiempo. Las estrategias de inmovilización de los anticuerpos son semejantes, no obstante, este tipo de inmunosensores no está basado en formato sándwich, reduciendo el número de etapas y de esta forma el tiempo de ensayo. Por ejemplo, Lee *et al.*<sup>202</sup> es capaz de alcanzar una detectabilidad para la cTnI de  $250 \text{ fg mL}^{-1}$  en 5 minutos, haciendo uso de electrodos de oro funcionalizados con una nanored de polianilina sobre la cual se han enlazado de forma covalente los anticuerpos de captura, y midiendo la capacitancia del sistema presente entre las diferentes nanoredes. Siguiendo una estrategia semejante, Tuteja *et al.*<sup>203</sup> hace uso del grafeno y sus propiedades como su elevada conductividad eléctrica, biocompatibilidad y buenas propiedades electroquímicas, como sustrato sobre el que inmovilizar los anticuerpos de captura tras derivatizar los electrodos de grafeno con la 2-aminobencilamina. De esta forma es capaz de alcanzar límites de detección de  $0.002 \text{ ng mL}^{-1}$  en 10 minutos.

En general, el desarrollo de biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores cardíacos está en continuo crecimiento, constituyéndose como un área de interés en el campo del análisis clínico. Sin embargo, aun hay algunas barreras que superar, como son la reutilización de los chips y su integración en dispositivos lab-on-a-chip, así como la reducción en el coste de los materiales utilizados para su desarrollo y su biocompatibilidad con determinados fluidos como plasma, sangre o suero. Del mismo modo, en determinados casos, factores

como el tiempo de ensayo, precisión y facilidad en el manejo de estas herramientas, son características aun por optimizar antes de pasar al ámbito clínico.

**Tabla 4.2.** Principales características de los inmunosensores electroquímicos descritos en la literatura para la detección de cTnI.

Formato de Ensayo	Método de Transducción	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	tensayo (min)	Ref.
S: SPCEs/Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>detección</sub> -AP	Amperométrica	1-2	180	198
S: SPGEs/PPy/Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>detección</sub> -HRP	Potenciométrico	-	20	201
S: MCPES/Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>detección</sub> -AuNPs/Ag	Potenciometría (VRA)	0.2	120	204
S: GE/PDMS/proteína G/Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>detección</sub> -AP	CV	0.148	200	200
S: PDMS/Au <sub>composite</sub> /Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>detección</sub> -QD	Potenciométrico (SWV)	0.004	280	31
C: SPGEs/Ab <sub>captura</sub>	Impedimétrico	0.2	-	205
C: GE/PANIN/pAb <sub>captura</sub>	Impedimétrico	$0.25 \cdot 10^{-3}$	5	202
S: PEIR/Ab <sub>captura</sub> /Ab <sub>det</sub> -B/GOx-A	Amperométrico	0.025	4	199
C: Grafeno/2-ABA/pAb <sub>captura</sub>	CV/Impedimétrico	0.01	10	203
S: SPGEs/GQDs/PAMAM/pAb <sub>captura</sub>	CV/DPV	0.002	10	206
C: GCE/AuNPs/NAC-CdAgTe Qdot/pAb <sub>captura</sub>	Impedimétrico	0.0017	30	207

S: Sándwich; C: Captura; SPCEs: Electrodos Serigrafados de Carbono; AP: Fosfatasa Alcalina; SPGE: Electrodo Serigrafado de Oro; PPy: Polipirrol; HRP: Peroxidasa de Rábano Picante; MCPES: Electrodo de Pasta de Carbón Modificados; AuNP: Nanopartículas de Oro; VRA: Voltamperometría de Redisolución Anódica; GE: Electrodo de Oro; PDMS: Polidimetilsiloxano; CV: Voltamperometría Cíclica; QD: Quantum Dot; SWV: Voltamperometría de Onda Cuadrada; PANIN: Nanored de Polianilina; PEIR: Polietilenimina Ramificado; B: Biotina; GOx: Glucosa Oxidasa; A: Avidina; 2-ABA: 2-Aminobenzilamina; 2-aminobencilamina; GQDs: Quantum dots de Oro; PAMAM: Poliamidoamina; DPV: Voltamperometría de Pulso Diferencial; GCE: Electrodo de Carbono Vidrioso; NAC: N-acetil-L-cisteína.

### 4.1.1.3 Inmunoensayos comerciales

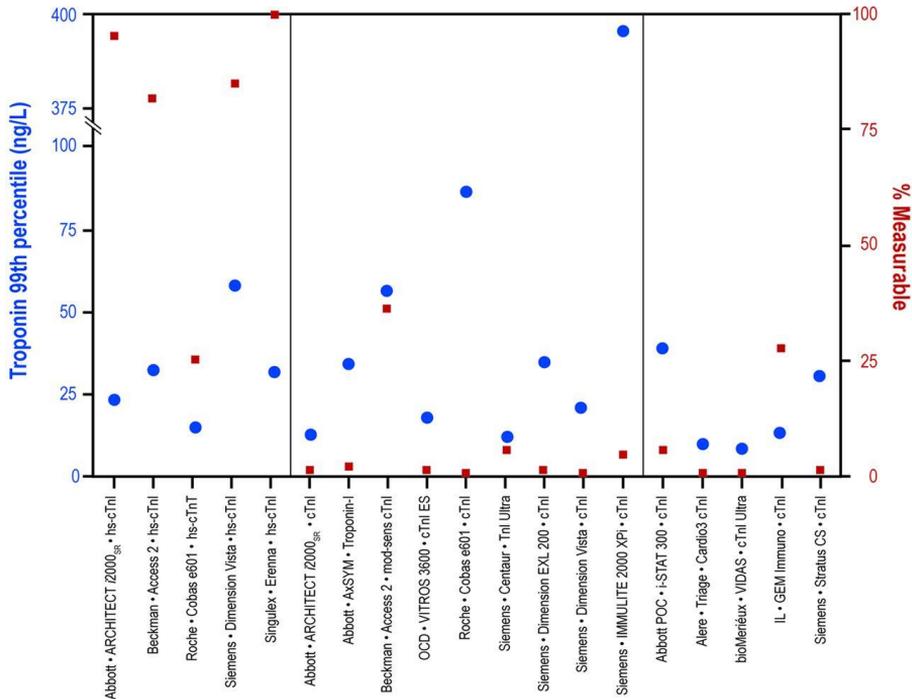
Existen diferentes inmunoensayos comerciales para la detección de cTnI basados en diferentes plataformas analíticas (Tabla 4.3). Se pueden encontrar inmunoensayos basados en el uso de más de un anticuerpo tanto en la fase de captura, así como en la de detección. Las diferentes herramientas de diagnóstico comercializadas se apoyan en gran variedad de tecnologías, formatos y combinaciones, haciendo uso tanto de anticuerpos monoclonales como de policlonales. Desafortunadamente, la estandarización de los resultados sigue siendo un reto por superar, ya que es posible encontrar datos dispares entre diferentes plataformas analíticas para la detección de la misma muestra<sup>208</sup>. En este sentido, en la literatura existen diferentes estudios enfocados a comparar el uso de los múltiples ensayos comerciales disponibles, poniendo en evidencia la dificultad, aun existente a la hora de realizar una interpretación fiable de los resultados, teniendo en cuenta el historial clínico del paciente y el método utilizado para la detección y cuantificación del biomarcador<sup>209-211</sup>.

Considerando la idea que defienden varios autores, de que los métodos de detección de troponina de alta sensibilidad (hs-cTnI) deben de ser capaces de detectar cTnI en la mayoría de los individuos sanos, se han definido tres grupos diferentes; aquellos inmunoensayos de alta sensibilidad capaces de detectar cTnI en un 50-75% de la población sana, aquellos que lo hacen en un rango del 75-95% y por último, los que consiguen detectar troponina en más de un 95% de los sujetos de referencia. En un estudio realizado posteriormente a esta consideración por Apple *et al.*<sup>212</sup>, se evaluó el porcentaje de valores detectables obtenidos para la troponina, para una misma población de referencia, mediante el uso de 19 métodos comerciales. Tan solo dos de estos ensayos fueron capaces de detectar la troponina I en más del 95% de individuos (Figura 4.4), mientras que otros dos lo hicieron por encima del 80% de los sujetos de referencia.

**Tabla 4.3.** Principales características de los inmunoanálisis comerciales para la detección de cTnI.

Ensayo	Formato/Ensayo	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	p99 <sup>a</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	tensayo(min)
<b>Inmunoanálisis de Alta Sensibilidad (hs-TnI)</b>				
Abbott Architect hs-cTnI	MP/CLIA	0.001	0.016	-
Beckman Coulter Access2/UniCel Dxl AccuTnI+3 hs-cTnI	MP/CLIA	0.02-0.03	0.02-0.03	13.25
Siemens Dimension Vista hs-cTnI	LOCI	0.015	45	12
Singulex Erenna hs-cTnI	MP/Microplaca/FIA	0.09·10 <sup>-3</sup>	0.09-0.016	180
<b>Inmunoanálisis actuales</b>				
Abbott Architect STAT cTnI	MP/CLIA	0.01	0.012-0.040	-
Abbott AxSYM ADV cTnI (2ª generación)	FIA	<10-20	0.034-0.040	-
Beckman Coulter Access (2ª generación) cTnI	MP/CLIA	0.03-0.05	0.04	13.25
Mitsubishi cTnI PATHFAST	CLIA	0.003	0.020	15
Roche Elecsys cTnI / cobas e601 cTnI	ECLIA	0.16	0.12-0.60	18
Siemens ADVIA Centaur cTnI Ultra	CLIA	0.006	0.012-0.040	15-18
Siemens Dimension Vista cTnI	LOCI	0.015	0.021	12
Siemens Dimension EXL System	LOCI	0.017	0.056	11
Siemens IMMULITE 2000 XPi cTnI	CLIA	0.1	0.2	35
<b>Dispositivos POC</b>				
Abbott i-STAT cTnI	ELISA	0.02	0.08	60
Alere Triage cTnI Cardio2	FIA	0.01	0.02	20
BioMerieux Vidas cTnI Ultra	ELFIA	<0.01	<0.01	20
Radiometer AQT90 Flex Troponin I	FIA Tiempo-Resuelto	0.009	0.023	11-21
Response Biomedical RAMP® Troponin I	FIA	0.03-0.2	<0.01-0.1	<20
Siemens Stratus CS cTnI	FIA	<0.018-0.03	0.04-0.2	14

<sup>a</sup> p99: Valor de cTnI para el percentil 99; MP: Partículas Magnéticas; CLIA: Inmunoensayo Quimioluminiscente; LOCI: Luminiscent Oxygen Channeling Immunoassay; FIA: Inmunoensayo Fluorescente; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELFIA: Enzyme-linked Fluorescent Immunoassay



**Figura 4.4.** Gráfico donde se muestran los valores del percentil 99 para la mayor parte de los análisis comercializados (círculos azules), junto con la proporción de sujetos sanos en los que se detectó troponina I (recuadros rojos). Figura adaptada con permiso de Apple *et al.*<sup>212</sup>

A la vista de los estudios presentes podemos decir que la mayor parte de los inmunoensayos establecidos para medir la cTnI carecen de la sensibilidad analítica recomendable para determinar con exactitud el límite superior de referencia, esto es, el valor del percentil 99 de referencia, que constituye el valor de corte que recomiendan las guías existentes para diagnosticar lesión miocárdica<sup>52, 54, 212</sup>. En este aspecto, Melanson *et al.*<sup>213</sup> ponen en evidencia mediante tres casos hipotéticos, como dependiendo de en que punto se establezca el límite de decisión para la cTnI, es posible pasar por alto ciertas cardiopatías de igual importancia, como es el caso de la miocarditis.

Tal y como se ha visto, son muy pocos los ensayos disponibles capaces de alcanzar la detectabilidad establecida en el percentil 99 con un coeficiente de variación inferior al 10%<sup>214</sup>, y además existe una falta de estandarización en cuanto a los métodos comercializados para la detección de la cTnI. En general, las diferentes casas que han desarrollado técnicas de diagnóstico para la cTnI, han escogido diferentes epítomos para la producción de anticuerpos, con lo que

el valor de corte es diferente para cada caso<sup>214</sup>. Por estos motivos principalmente, la necesidad de desarrollar técnicas de diagnóstico para la estratificación del riesgo cardiovascular mediante la detección fiable y robusta de la troponina cardíaca I, se hace patente.

#### **4.1.2 Precedentes**

Tanto el diseño de haptenos destinados a la producción de anticuerpos que no se vieran afectados por fenómenos de oxidación-reducción de la cTnI, degradación proteolítica, fosforilación, formación del complejo cTnI-TnC o incluso tal y como está descrito, efecto de otras moléculas sobre la inmunodetección de la cTnI, como es el caso de la heparina<sup>182</sup>, como la posterior producción de anticuerpos para la detección de este biomarcador, forma parte de la tesis doctoral de la Dra. Glòria Colom<sup>215</sup>. Por este motivo, en esta tesis no se ha entrado en detalle en los apartados que hacen referencia a esta materia, realizando tan solo una breve descripción del trabajo realizado por la Dra. Glòria Colom que servirá de trasfondo para una mejor comprensión del trabajo realizado.

#### **4.1.3 Objetivos**

En la presente tesis y en concreto en este capítulo, el objetivo principal ha sido el desarrollo de una técnica de diagnóstico fiable y robusta para la detección de troponina I cardíaca en muestras clínicas, capaz de alcanzar la sensibilidad exigida por las guías existentes para diagnosticar lesión miocárdica, y que no se vea afectada por los diferentes fenómenos asociados a la inmunodetección de este biomarcador.

Los objetivos parciales establecidos para alcanzar dicho fin se detallan a continuación,

- Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA para la detección de cTnI
- Producción de anticuerpos contra secuencias de péptidos específicos contra la cTnI
- Evaluación de los anticuerpos producidos contra los péptidos específicos

- Desarrollo de un inmunosensor amperométrico
- Desarrollo de un inmunosensor potenciométrico basado en nanopartículas metálicas de Cadmio

## 4.2 Resultados y Discusión

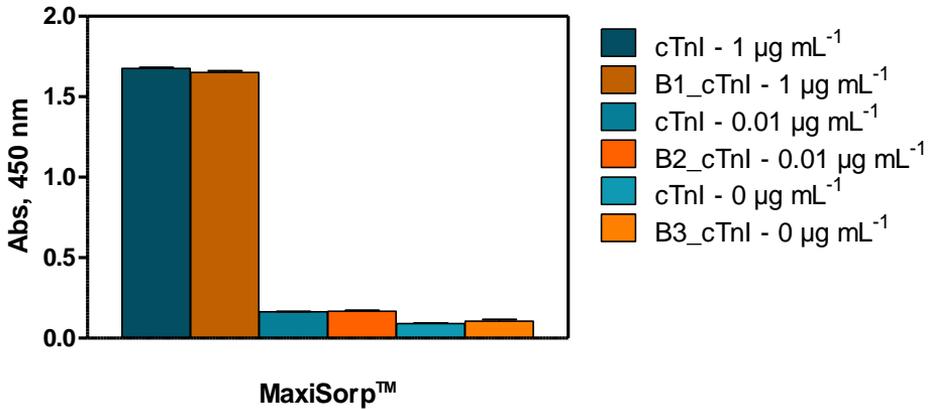
### 4.2.1 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas tipo ELISA para la detección de troponina I cardíaca. Primera aproximación

Para la detección de la cTnI se desarrolló un inmunoensayo ELISA tipo sándwich mediante el uso de dos anticuerpos policlonales producidos contra toda la proteína, As220 y As221. Previamente al desarrollo de este inmunoensayo, ambos anticuerpos se marcaron con biotina (sección 6.4.4, pág. 195). Esta modificación de los anticuerpos se debe principalmente a que ambos han sido producidos en la misma especie, con lo que el uso de un anticuerpo secundario puede conducir a resultados erróneos. Seguidamente se procedió a la optimización de inmunorreactivos y al desarrollo de la recta de calibrado para la detección de cTnI. No obstante, se observó un fenómeno de adsorción inespecífica de la cTnI sobre el propio poliestireno de la microplaca, tal y como se describe en la siguiente sección. Con el fin de garantizar una captura específica de la cTnI por parte de los anticuerpos producidos, se realizó un gran esfuerzo para establecer bajo que condiciones se minimizaba o bien desaparecía este tipo de fenómeno.

### 4.2.2 El fenómeno de la adsorción inespecífica

En el transcurso de la tesis doctoral de la Dra. Colom se observó un fenómeno no deseado de adsorción no específica de la cTnI sobre el propio poliestireno de la microplaca de ELISA (placas MaxiSorp™). Este hecho se puso de manifiesto tras la realización de diferentes blancos y controles mediante los cuales fue posible elucidar que la adsorción inespecífica venía dada por la propia cTnI. De este modo, se evaluaron tres niveles diferentes de cTnI, 1, 0.01 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mediante el tándem de anticuerpos específicos As220 como captura y pAb221-B como

detección. Estas concentraciones de cTnI se evaluaron en paralelo mediante el tándem formado por un anticuerpo no específico como anticuerpo de captura y el mismo pAb221-B como anticuerpo de detección (Figura 4.5).



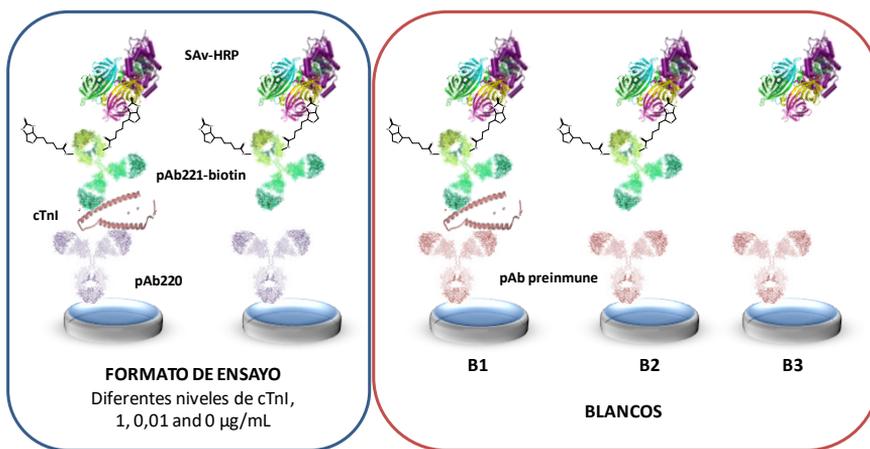
**Figura 4.5.** Gráfica donde se compara la respuesta obtenida a diferentes niveles de cTnI mediante el uso de anticuerpos específicos Ab220 y pAb221-B, (barras azules) con la respuesta obtenida mediante el uso de un anticuerpo no específico como anticuerpo de captura y el pAb221-B como anticuerpo de detección (barras ocre).

La más probable de las explicaciones a este comportamiento es debido su elevado punto isoeléctrico, alrededor de 9.9, siendo una proteína polar con una elevada carga positiva y en la mayor parte de su dominio, hidrófila. Dada la naturaleza hidrófila de la cTnI no es de extrañar su alta adsorción sobre superficies como las MaxiSorp™, cuya superficie de poliestireno está tratada de tal modo que presenta gran afinidad por grupos polares y moléculas hidrófilas. Este fenómeno de adsorción no específica a los diferentes soportes sobre los cuales se desarrollan los inmunoensayos de diferentes formatos ya ha sido descrito en la bibliografía por diferentes autores<sup>191, 193, 216</sup>.

Para intentar minimizar la adsorción inespecífica se plantearon diferentes diseños experimentales con el fin de encontrar condiciones óptimas de ensayo en las cuales la relación señal/ruido fuera máxima y por tanto la adsorción inespecífica de la cTnI, mínima (inferior al cero analítico) llegando a cero. Los experimentos realizados se basan principalmente en el esquema presente en la Figura 4.6, donde el anticuerpo pAb220, previamente purificado por precipitación mediante sulfato de amonio, se utilizó como anticuerpo de captura. Así mismo se utilizó un anticuerpo no específico, también purificado por

sulfato de amonio como blanco de captura en los tres blancos B1, B2 y B3. Todos y cada uno de los blancos fue diseñado de tal modo que en el caso de que se observara señal inespecífica, fuera fácilmente indentificable su origen.

- **Blanco B1.** Se realizan las mismas etapas que en el ensayo específico, solo que en este caso el anticuerpo de captura es inespecífico.
- **Blanco B2.** En este experimento no se adiciona cTnI, solo tampón PBST.
- **Blanco B3.** Tan solo se añade el complejo SAV-HRP, en el resto de etapas se añade tampón PBST.



**Figura 4.6.** Diseño experimental llevado a cabo para evaluar la adsorción inespecífica de la cTnI en diferentes condiciones. En todos los blancos se utilizó un anticuerpo no específico como tapizado.

#### 4.2.2.1 Evaluación de diferentes superficies en microplaca

Siguiendo el diseño experimental propuesto, inicialmente se evaluaron diferentes microplacas con diferente tratamiento de la superficie como se muestra en la Tabla 4.4, y por consiguiente con diferente tipo de afinidad hacia las biomoléculas.

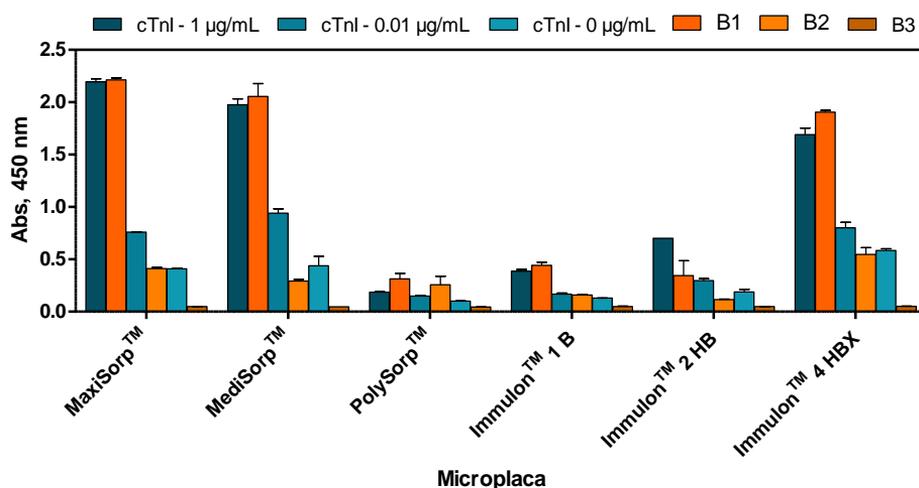
**Tabla 4.4.** Listado de todas las microplacas evaluadas y las diferentes afinidades que presentan.

Microplaca	Superficies <sup>a</sup>
<b>MaxiSorp™</b>	Poliestireno. Alta afinidad por grupos polares y moléculas hidrofílicas
<b>MediSorp™</b>	Poliestireno. Afinidad media por grupos polares y moléculas ligeramente hidrofílicas
<b>PolySorp™</b>	Poliestireno. Baja afinidad por grupos polares. Elevada afinidad por moléculas hidrofóbicas
<b>Immulon™ 1 HB</b>	Poliestireno. Afinidad principalmente por moléculas hidrófobas
<b>Immulon™ 2 HB</b>	Poliestireno. Afinidad por biomoléculas con carácter ligeramente hidrofílico
<b>Immulon™ 4 HBX</b>	Poliestireno. Afinidad por biomoléculas con marcado carácter hidrofílico

*Se resume para cada caso el material del que está hecha la microplaca y el tipo de afinidad que presenta.*

Tras evaluar todas las superficies, se pudo observar una cierta correlación entre la naturaleza meramente hidrofílica de la troponina I y la superficie evaluada (Figura 4.7). Para aquellas superficies recomendadas para trabajar con proteínas hidrofílicas como las MaxiSorp™, MediSorp™ o Immulon 4HBX™ se observó una gran adsorción inespecífica (la señal resultante del blanco B1 y B2 fue comparable a aquella observada en los experimentos realizados con un anticuerpo específico de captura pAb220, en presencia de cTnI a 1 y 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente).

Por otro lado, en aquellas superficies recomendadas para favorecer interacciones de tipo hidrofóbico como son las microplacas PolySorp™ o las Immulon 1B™, la respuesta fue mínima. Fueron finalmente las placas tipo Immulon™ 2HB las cuales poseían un comportamiento intermedio, las que mostraron una mejor relación señal/ruido de fondo y una adsorción inespecífica muy baja por parte de la cTnI, donde la señal inespecífica es comparable al ruido de fondo.



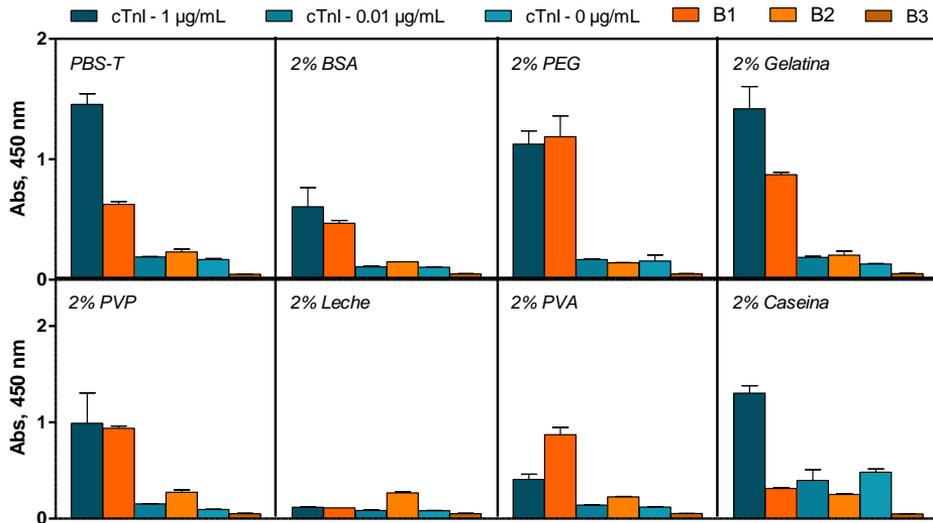
**Figura 4.7.** Gráfica donde se compara la respuesta específica del inmunoensayo en presencia de cTnI a diferentes niveles, incluyendo el 0, y la respuesta inespecífica mediante la evaluación de diferentes blancos, con un anticuerpo no específico como anticuerpo de captura (barras ocre). Mientras que para el sistema específico se utilizó el anticuerpo Ab220 como anticuerpo de captura, y el pAb221-Biotina (pAb221-B), como anticuerpo de detección, ambos producidos contra toda la cTnI (barras azules). En todos los casos, la concentración de trabajo tanto el anticuerpo de captura como el de detección fue de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2 Evaluación de diferentes aditivos sobre la adsorción inespecífica de la cTnI

Con el fin de incrementar aun más la relación señal/ruido del inmunoensayo, se decidió evaluar diferentes proteínas y otros compuestos como aditivos en el tampón de adición de la cTnI. De este modo, se evaluaron albúmina de suero bovino (BSA), polietilenglicol (PEG), gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), leche en polvo, polivinilalcohol (PVA) y caseína. Todos los aditivos se prepararon a una concentración final masa/volumen del 2 % en tampón 10 mM PBS-T pH 7.5 y 0.05 % Tween 20. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando microplacas Immulon™ 2 HB.

En la Figura 4.8 puede observarse como al añadir la cTnI directamente en tampón PBST sin la presencia de ningún aditivo, la señal correspondiente a la concentración máxima de cTnI evaluada es de menor magnitud a la del blanco B1, pero aun significativa. Esto nos indica que parte de la cTnI añadida se une

inespecíficamente a la superficie de poliestireno, y por tanto la captura (y la señal observada) no es totalmente específica.

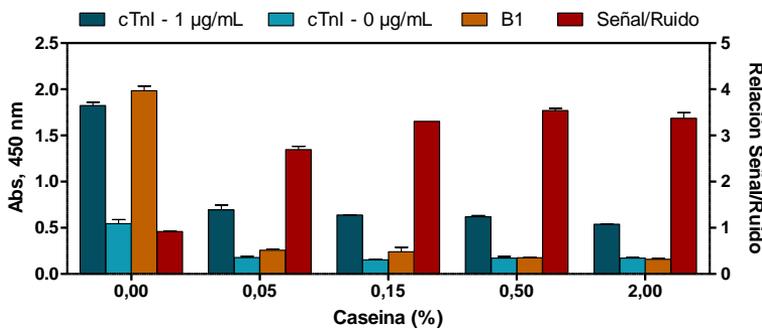


**Figura 4.8.** Resultados obtenidos tras la evaluación de los diferentes aditivos en el tempón de incubación de la cTnI. En todos los casos se evaluaron tres concentraciones diferentes de cTnI, incluyendo el  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , junto con tres blancos anteriormente descritos. Se utilizó el anticuerpo Ab220 como anticuerpo de captura, y el pAb221-B, como anticuerpo de detección, ambos producidos contra toda la cTnI. En todos los casos, la dilución de trabajo tanto el anticuerpo de captura como el de detección fue de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

En cuanto al efecto de los diferentes aditivos evaluados, tanto la BSA como la leche reducen en semejante grado la señal inespecífica como la específica, siendo en el caso de la leche un descenso mucho más acusado. El PVA produce un efecto totalmente contrario al deseado, siendo la señal inespecífica del blanco B1 mayor que aquella que a priori se supone específica. En cambio, puede observarse como el PVP, la gelatina y la caseína son capaces de disminuir la interacción inespecífica de la cTnI sobre la superficie de la microplaca, siendo el efecto de éste último el más significativo, llegando a igualar la señal inespecífica al ruido de fondo del inmunoensayo. El uso de la caseína como agente de bloqueo ha sido descrita anteriormente en varios inmunoensayos también para la cTnI<sup>190, 193, 217</sup>. Podemos decir que la caseína, al tratarse de un conjunto heterogéneo de diferentes unidades de peso molecular que pueden ir desde 19 a 22 kDa<sup>218-220</sup> (recordemos que la cTnI pesa 24 kDa), es capaz de ejercer un efecto bloqueante más efectivo al llegar a espacios donde otras proteínas de mayor tamaño no son capaces de acceder<sup>221</sup>.

#### 4.2.2.3 Evaluación del efecto de la concentración de caseína sobre la adsorción inespecífica de la cTnI

Seguidamente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de caseína, desde 0 al 2% en PBST, sobre la relación señal/ruido (Figura 4.9). Los resultados mostraron que la adsorción inespecífica de la cTnI es inversamente proporcional a la concentración de caseína en el tampón de ensayo. El efecto de la caseína es tal que a una concentración de 0.05% ya es suficiente como para reducir a más de la mitad el efecto indeseado de la adsorción inespecífica. Esto hace posible, tal y como se observa en el gráfico, trabajar a cualquiera de las concentraciones evaluadas. No obstante, se optó por trabajar a una concentración del 0.15% ya que la relación señal/ruido de este sistema en particular, era ligeramente mayor que en el resto de experimentos.



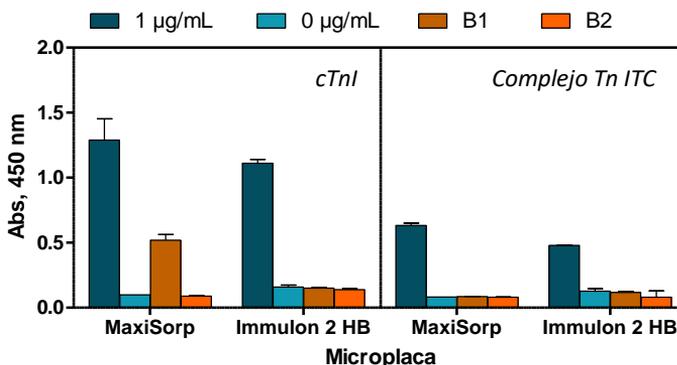
**Figura 4.9.** Resultados obtenidos tras la evaluación de diferentes concentraciones de caseína (% masa/volumen) en el tampón de adición de la cTnI a 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup>. Del mismo modo se evaluó el Blanco B1 (véase Figura 4.6) en presencia de caseína a diferentes niveles. La relación señal/ruido se estableció mediante el cociente de los valores de absorbancia a 1 µg mL<sup>-1</sup> de cTnI y B1. Se utilizó el anticuerpo Ab220 como anticuerpo de captura, y el pAb221-B, como anticuerpo de detección, ambos producidos contra toda la cTnI. En todos los experimentos, la dilución de trabajo tanto el anticuerpo de captura como el de detección, fue de 1 µg mL<sup>-1</sup>

#### 4.2.2.4 Evaluación de la adsorción inespecífica por parte del complejo ternario de troponina ITC

Se decidió evaluar en paralelo y bajo las mismas condiciones, el complejo ternario ITC y la cTnI. Esta decisión se tomó en base a lo descrito por el *National Institute of Standards and Technology* (NIST) donde se demuestra la validez del complejo ternario ITC en lugar de la cTnI como material de referencia<sup>222</sup>. Además,

al igual que la cTnI, el complejo ternario ITC también es considerado según el comité internacional de materiales de referencia, como un standard de referencia válido para el diagnóstico de infarto de miocardio agudo (SRM® 2921).

Puede observarse como en el caso de la cTnI, en presencia de caseína la adsorción inespecífica se iguala al cero analítico únicamente trabajando con las microplacas tipo Immulon™ 2 HB (Figura 4.10). Por contra, el complejo Tn ITC a pesar de presentar una menor señal a la concentración máxima de analito, en ninguno de los casos se observó adsorción inespecífica, haciéndose posible el uso de ambos tipos de microplaca. No obstante, para el desarrollo definitivo del inmunoensayo, se decidió trabajar con la cTnI en presencia de caseína al 0.15 % y con las microplacas Immulon™ 2 HB, dado que la relación señal/ruido obtenida fue aproximadamente el doble que en el caso del complejo ITC.

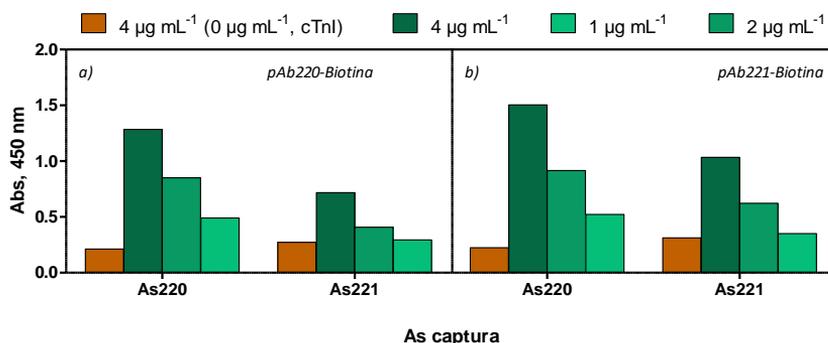


**Figura 4.10.** Inmunoensayos tipo ELISA realizados con ambos biomarcadores a dos niveles de concentración, 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup>, en presencia de caseína al 0.15 %. También se muestran dos blancos B1 y B2 descritos previamente (véase Figura 4.6). En todos los casos la concentración de trabajo del anticuerpo Ab220 de captura fue de 2 µg mL<sup>-1</sup> y la del anticuerpo de detección pAb221-B de 4 µg mL<sup>-1</sup>. Ambas concentraciones fueron optimizadas previamente mediante ensayos tipo ELISA 2D

### 4.2.3 Inmunoensayo tipo ELISA Sandwich para la detección de cTnI

Con el fin de determinar que combinaciones de anticuerpos podían ser candidatos para desarrollar el inmunoensayo tipo sándwich, se planteó un experimento donde el criterio de selección fue la señal máxima a una concentración de cTnI fija de 1 µg mL<sup>-1</sup>, y el ruido de fondo más bajo. Correspondiente a la señal en ausencia de cTnI y a una concentración de

anticuerpo de detección de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se observó que la combinación As220 como anticuerpo de captura, y el pAb221-B como anticuerpo de detección fue la que mayor señal mostró a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cTnI y el que menor ruido de fondo presentaba (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Anticuerpos de captura As220 y 221 frente a a) el anticuerpo de detección pAb220-B b) el anticuerpo de detección pAb221-B, a diferentes concentraciones y a una concentración de cTnI de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En ambos casos, la barra ocre corresponde a un cero de cTnI y a un valor de anticuerpo de detección de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para todos los casos, la dilución de trabajo del As220 y As221 fue de  $1/500$ , mientras que la concentración de anticuerpo pAb220-B y pAb221-B de  $4$ ,  $2$  y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como puede verse en la Tabla 4.5, fue la combinación formada por el anticuerpo 220 como anticuerpo de captura, y el pAb221-B como anticuerpo de detección, la que mejor relación señal/ruido de fondo mostró, y por tanto la elegida para desarrollar el inmunoensayo en placa para la cTnI.

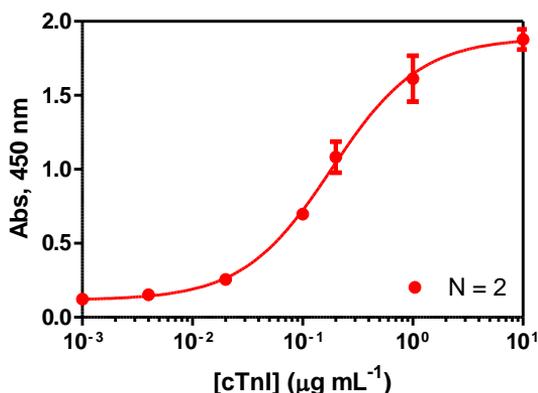
**Tabla 4.5.** Absorbancia máxima a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cTnI y relación señal ruido de todas las combinaciones evaluadas con los anticuerpos 220 y 221.

pAb Detección	As Captura			
	220		221	
	Abs. Máxima	S/N	Abs. Máxima	S/N
pAb220-B	0.851	4.014	0.407	1.491
pAb221-B	0.915	4.085	0.622	1.987

*Todos los experimentos se realizaron un día y por duplicado.*

Seguidamente se procedió a la optimización de las concentraciones tanto del anticuerpo de captura, As220, como del anticuerpo de detección, pAb221-Biotina mediante ensayos ELISA 2D (sección 6.6.4, pág. 209), para finalmente desarrollar la curva de calibrado para la cTnI en tampón  $10 \text{ mM PBS-T pH } 7.5$ .

% Caseína (véase Figura 4.12; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las características analíticas del inmunoensayo se muestran en la Tabla 4.6.



**Figura 4.12.** Curva de calibrado para la cTnI correspondiente al promedio de dos días diferentes, Cada punto se realizó con su correspondiente réplica. Se utilizó el anticuerpo As220 como anticuerpo de captura a una dilución 1/16000, y el pAb221-B, como anticuerpo de detección a una concentración de 2.5 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 4.6.** Parámetros analíticos de la curva de calibrado para la cTnI en 10 mM PBS-T pH 7.5 y 0.15 % caseína 0.05 % Tween

Troponina I Cardíaca	
As de Captura	As220
pAb de Detección	pAb221-B
Abs <sub>máx</sub>	0.13 ± 0.03
Abs <sub>mín</sub>	1.89 ± 0.17
Pendiente	1.28 ± 0.19
R <sup>2</sup>	0.992 ± 0,020
IC50 (µg mL <sup>-1</sup> )	0.173 ± 0. 002
Rango de trabajo (µg mL <sup>-1</sup> )	(0.056 ± 0.011) – (0.489 ± 0.075)
LD (µg mL <sup>-1</sup> )	0.029 ± 0.010

El ELISA tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección As220/pAb221-B. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste sigmoide empleando la ecuación de  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoide y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. Cada punto corresponde al promedio de ensayos realizados en tres días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por duplicado. La curva de calibrado para la cTnI se preparó en 10 mM PBS-T 0.15% caseína (PBS pH 7.5 0.05 % Tween).

En ésta puede apreciarse como desgraciadamente, el límite de detección del inmunoensayo desarrollado, dista considerablemente del límite de detección

definido como el percentil 99 de una población de referencia y establecido por la ESC/ACC<sup>223</sup>,  $0.06 \text{ ng mL}^{-1}$ , así como de las diferentes detectabilidades descritas en los inmunoensayos tipo ELISA presentes en la literatura.

En comparación con el resto de inmunoensayos en formato ELISA descritos en la literatura, el inmunoensayo desarrollado en esta tesis alcanza un límite de detección muy superior al de todos los ensayos descritos, siendo el tiempo de ensayo del mismo orden. En los diferentes trabajos descritos en la Tabla 4.1, la combinación de anticuerpos utilizados para desarrollar el inmunoensayo son anticuerpos capaces de detectar una región específica de la proteína. Del mismo modo, en alguno de los ejemplos descritos, se utilizan más de un anticuerpo de detección. Con estas observaciones, junto con los resultados obtenidos, y con el objetivo de mejorar la detectabilidad del ensayo para la detección de la cTnI se decidió abordar la producción de una segunda generación de anticuerpos, desarrollados contra diferentes partes de la cTnI, intentando evitar de esta forma regiones eclipsadas o degradadas tras la liberación de la cTnI y con la intención de mejorar la detectabilidad del inmunoensayo.

#### **4.2.4 Desarrollo de haptenos y producción de anticuerpos contra péptidos específicos de la troponina. Segunda aproximación.**

Gran parte del trabajo que a continuación se describe, como el desarrollo de haptenos y producción de anticuerpos policlonales contra diferentes secuencias peptídicas de la cTnI y la TnC, forma parte de la tesis doctoral de la Dra. Glòria Colom<sup>215</sup>. De este modo, en este texto tan solo se recoge un breve resumen del trabajo realizado por la Dra. Colom, siendo parte de esta tesis la evaluación de los anticuerpos producidos y su implementación en el inmunoensayo tipo ELISA sándwich para la detección de cTnI.

Considerando todos los aspectos relacionados con la inmunodetección de la cTnI descritos en la sección 3.1, se decidió producir anticuerpos contra diferentes partes de la proteína. Para esto, se realizó un estudio detallado de su estructura seleccionando aquellas secuencias de aminoácidos que resultaban potenciales candidatos para la producción de anticuerpos. Del mismo modo y con la posibilidad de utilizar el completo ternario ITC para realizar la detección de cTnI,

se produjeron anticuerpos contra diferentes partes de la TnC. Los criterios de selección establecidos se basaron en los siguientes aspectos,

- La región N-terminal de la cTnI es cardioespecífica ya que contiene una secuencia de aa que la diferencian de su isoforma esquelética.
- Las serinas Ser<sub>23-24</sub> son susceptibles a ser degradadas por efecto de la PKA, tal y como se ha descrito anteriormente.
- Tanto la región N-terminal como la C-terminal son consideradas una buena opción para la producción de anticuerpos<sup>178</sup>. Esto es debido principalmente a su alta capacidad inmunogénica y también a su especificidad.
- Evitar regiones susceptibles a la degradación por acción de proteasas.
- Si bien la región central de la troponina I es posiblemente la más estable, también hay que considerar que varios de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos generados contra esta región conducen a resultados poco exactos debido al efecto interferente que ejercen determinadas moléculas al interactuar con la cTnI justamente en esta región.

Una vez sintetizados los péptidos, se conjugaron a biomacromoléculas (HCH y BSA) a través de los residuos de cisteína mediante el uso del ácido iodoacetato de succinimidilo (SIA), utilizando aquellos bioconjugados a HCH como inmunógenos y obtención de anticuerpos policlonales, y aquellos bioconjugados a BSA como antígenos de tapizado. Toda esta información se resume en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7.** Secuencias peptídicas e inmunógenos desarrollados para la producción de anticuerpos policlonales contra la cTnI y la TnC.

Proteína	Secuencia Peptídica	Inmunógeno	Antisuero
cTnI	(81-96)	HCH-SIA-Cys(81-96)	As245, 246, 247
	(188-202)	HCH-SIA-Cys(188-202)	As248, 249, 250
	(24-40)	HCH-SIA-Cys(24-40)	As260, 261, 262
	(41-50)	(41-50)Cys-SIA-HCH	As263, 264, 265
TnC	(14-23)	(14-23)Cys-SIA-HCH	As266, 267, 268
	(38-47)	(38-47)Cys-SIA-HCH	As269, 270, 271

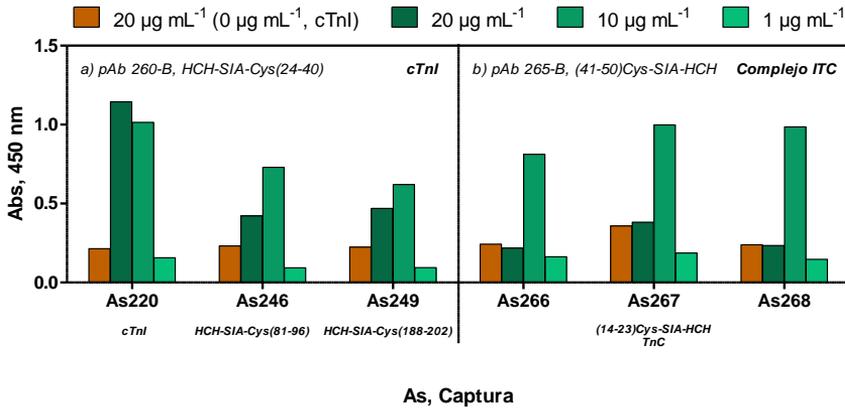
*Entre paréntesis se destacan las diferentes secuencias de aminoácidos escogidos como haptenos para la producción de anticuerpos contra la cTnI y la TnC*

#### **4.2.5 Desarrollo de técnicas inmunoquímicas tipo ELISA para la detección de troponina I cardíaca. Segunda aproximación**

Diferentes ensayos de screening fueron llevados a cabo con el fin de determinar qué pares de anticuerpos mostraban una mayor avidéz en presencia de cTnI y, a su vez una mejor relación señal/ruido. De esta forma, al igual que con los anticuerpos de primera generación, todos los anticuerpos producidos contra diferentes péptidos sintéticos de la cTnI, junto con los As220 y 221, fueron evaluados como anticuerpos de captura y de detección, previo paso de biotinización. Se procedió de modo semejante con los anticuerpos producidos contra diferentes secuencias peptídicas de la TnC, solo que estos anticuerpos fueron evaluados únicamente como anticuerpos de captura, mientras que el resto de anticuerpos biotinilados, como anticuerpos de detección. En este caso, se utilizó el complejo ternario ITC en lugar de la cTnI. El criterio de selección seguido fue exactamente el mismo que el descrito anteriormente (sección 4.2.3).

En total se evaluaron 84 combinaciones con los anticuerpos producidos exclusivamente contra la cTnI y péptidos sintéticos de esta proteína. Mientras que con los anticuerpos producidos contra diferentes regiones de la TnC, se estudiaron un total de 36 combinaciones. En la Figura 4.13 se muestran los resultados de aquellas combinaciones que mostraron mejores resultados según los criterios previamente descritos.

Seguidamente se realizaron ensayos de titración tipo ELISA 2D con el fin de determinar cuales eran las mejores condiciones en cuanto a concentraciones de inmunorreactivos para desarrollar en cada caso la curva de calibrado para la detección de cTnI. En este aspecto, los ensayos de titración para aquellos sistemas que utilizaban anticuerpos producidos contra el péptido (14-23) de la TnC no fueron reproducibles respecto al ensayo anterior, mostrando un elevado ruido de fondo, muy baja señal máxima, y por tanto una relación señal/ruido de fondo muy baja, por este motivo fueron descartados. Las combinaciones escogidas se muestran en la Tabla 4.8.



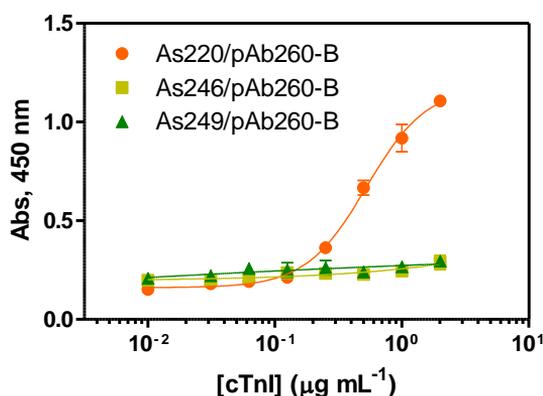
**Figura 4.13.** Combinaciones escogidas para desarrollar la curva de calibrado para la detección de cTnI. En la gráfica, a) diferentes antisueros de captura frente al mismo anticuerpo de detección biotinilado pAb260-B a diferentes niveles, a una concentración de cTnI de 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todos los anticuerpos fueron producidos contra la cTnI. b) Diferentes antisueros de captura producidos contra el péptido sintético (14-23) de la TnC, frente al anticuerpo de detección biotinilado pAb265-B, producido contra el péptido (41-50) de la cTnI, a una concentración de ITC de 0.75 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En todos los casos se evaluaron concentraciones de anticuerpo de detección de 20, 10 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El ruido de fondo se estudió a una concentración de anticuerpo de captura de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en todos los casos.

**Tabla 4.8.** Combinaciones de anticuerpos y concentraciones seleccionadas tras ensayo screening ELISA 2D para el desarrollo de la curva de calibrado para la detección de cTnI.

As Captura, dilución	Inmunógeno	pAb Detección, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inmunógeno
As220, 1/4000	cTnI		
As246, 1/4000	HCH-SIA-Cys(81-96)	pAb260-B, 10	HCH-SIA-Cys(24-40)
As249, 1/4000	HCH-SIA-Cys(188-202)		

Se presentan tres combinaciones formadas por tres anticuerpos de captura producidos contra diferentes haptenos y un único anticuerpo de detección.

Finalmente, se realizaron las curvas de calibrado para la cTnI en tampón PBST-0.15% caseína para cada una de las combinaciones de anticuerpos captura-detección (Figura 4.14). En la Tabla 4.9 se recogen las características analíticas del ensayo cuya única combinación presentó dosis-dependencia a los niveles de cTnI evaluados.



**Figura 4.14.** Curva de calibrado para la cTnI para cada combinación de anticuerpos seleccionada. Cada punto se realizó con su correspondiente dúplica.

**Tabla 4.9.** Parámetros analíticos de las diferentes curvas de calibrado para la cTnI

Troponina I Cardíaca	
As de Captura	As220
pAb de Detección	pAb260-B
Abs <sub>máx</sub>	1.179
Abs <sub>mín</sub>	0.161
Pendiente	1.826
R <sup>2</sup>	0.995
IC50 (µg mL <sup>-1</sup> )	0.525
Rango de trabajo (µg mL <sup>-1</sup> )	0.228 – 0.935
LD (µg mL <sup>-1</sup> )	0.143

El ELISA tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección As220/pAb260-B. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste sigmoide empleando la ecuación de  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoide y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. En cada ensayo, cada concentración se midió por duplicado. La curva de calibrado para la cTnI se preparó en 10 mM PBS-T pH 7.5 y 0.15 % caseína 0.05 % Tween.

Para aquellos inmunoensayos que utilizaban los antisueros 246 y 249 como anticuerpos de captura, no se observó ninguna dosis dependencia a los diferentes niveles de cTnI evaluados, por este motivo, estas combinaciones fueron finalmente descartadas. Tan solo fue el par formado por al As220 como anticuerpo de captura, y el pAb260-B, como anticuerpo de detección, el que mostró dosis dependencia. No obstante, en ningún caso se consiguió mejorar de forma sustancial los resultados obtenidos para la curva de calibrado mediante el tándem formado por los anticuerpos 220 y 221, producidos contra toda la

proteína, donde el valor de la detectabilidad es del mismo orden de magnitud que en la curva As220/pAb260-B.

#### **4.2.5.1 Evaluación de la inmunoreactividad de los anticuerpos producidos contra diferentes regiones de la cTnI**

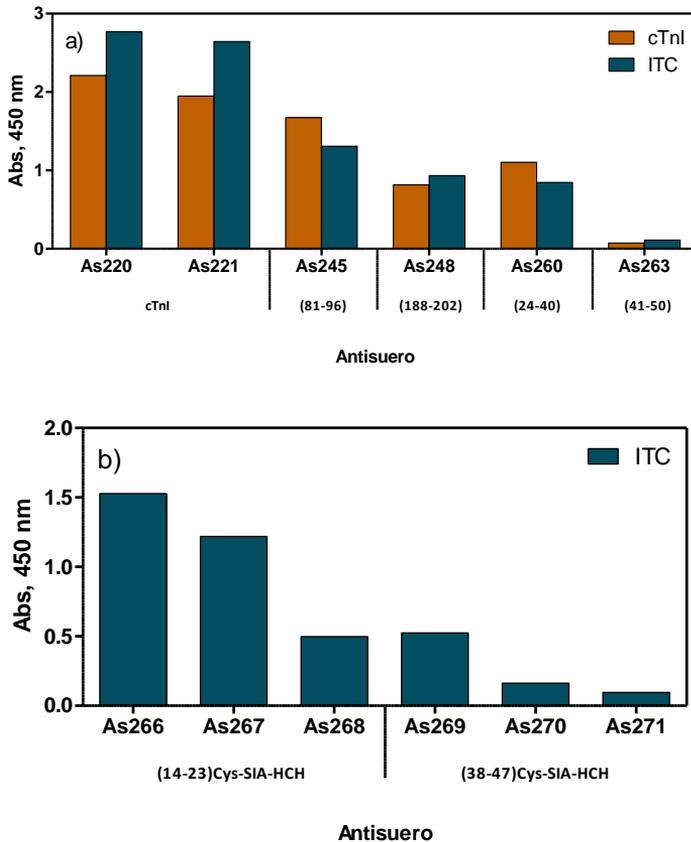
A la vista de los resultados, se decidió analizar la inmunoreactividad de los anticuerpos producidos contra diferentes partes de la cTnI frente a la propia cTnI y el complejo ITC, así como los anticuerpos generados contra diferentes regiones de la TnC, frente al trímero ITC, en todos los casos mediante ensayos tipo ELISA indirectos no competitivos (Figura 4.15). De esta manera se evaluó el reconocimiento de los anticuerpos producidos respecto a la cTnI o el complejo ITC.

Los anticuerpos que mostraron mayor avidéz por ambas proteínas fueron los producidos contra toda la cTnI, As220 y As221. El resto de anticuerpos producidos contra diferentes partes de esta proteína, mostraron menor grado de avidéz, incluso ninguno para el caso de los anticuerpos producidos contra el péptido (41-50) de la cTnI. Este último caso pone de manifiesto que la selección de este péptido no ha dado lugar a ningún anticuerpo útil para el reconocimiento de la cTnI (Figura 4.15 a). Además explicaría los resultados observados cuando se trabajó con los anticuerpos contra la TnC como captura, y el anticuerpo 265 biotinilado como anticuerpo de detección, donde finalmente no se observó ningún resultado positivo pese a lo observado en la Figura 4.13 b.

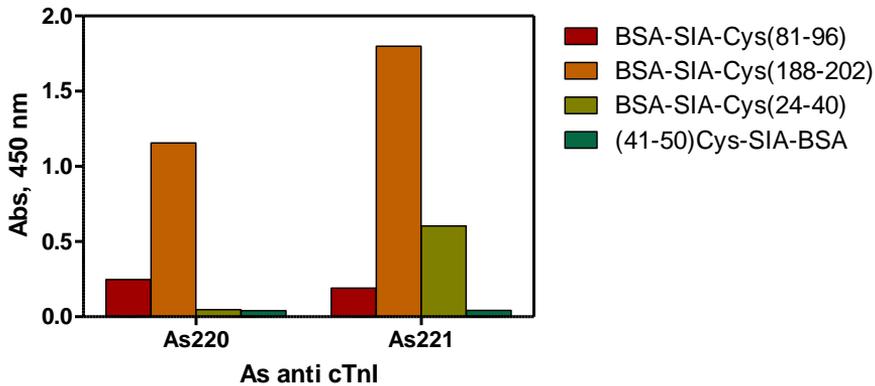
En cuanto a los anticuerpos producidos contra diferentes péptidos sintéticos de la TnC, se observó como aquellos generados contra la región (38-47) presentaron poca avidéz por el complejo ITC, al contrario que aquellos generados a partir del péptido (14-23).

Del mismo modo, se evaluó la inmunoreactividad de los antiseros As220 y 221, frente a los péptidos sintéticos de la cTnI, mediante ensayo tipo ELISA indirecto no competitivo (Figura 4.16). En ellos puede observarse como ambos anticuerpos reconocen con mayor afinidad los péptidos (188-202), y concretamente el As221 el péptido (24-40). Ambos péptidos se encuentran localizados en las zonas C- y N-terminal de la cTnI, respectivamente. Tal y como está descrito, estas zonas de la cTnI son las más inmunogénicas<sup>178</sup>,

confirmándose de este modo mediante los resultados observados en este experimento. Por otro lado, se confirma el caso del péptido (41-50) que no es reconocido por ninguno de los anticuerpos producidos contra toda la cTnI, dando entender que esta secuencia no se encuentra visible para su reconocimiento.



**Figura 4.15** Resultados para la evaluación de la inmunorreactividad de diferentes anticuerpos mediante ensayo ELISA indirecto no competitivo frente a la cTnI y el complejo ITC, ambos tapizados a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . a) Evaluación de los anticuerpos generados contra la cTnI. Se escogió un único antisuero para cada inmunógeno, excepto para el caso de los anticuerpos producidos contra toda la cTnI. La dilución final para cada antisuero mostrada es de 1/16000. b) Evaluación de los anticuerpos generados contra las dos secuencias peptídicas de la TnC. La dilución final para cada antisuero mostrada es de 1/4000.



**Figura 4.16.** Resultado del ensayo ELISA indirecto no competitivo. Tras el tapizado de los antígenos correspondientes a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se evaluaron las diferentes afinidades que presentaban los anticuerpos As220 y As221, producidos contra toda la cTnI. Resultados referentes a una dilución final de antisuero de 1/1000.

Finalmente, a pesar de los esfuerzos invertidos en la producción y evaluación de anticuerpos contra diferentes regiones de la cTnI con el fin de alcanzar y desarrollar un inmunoensayo con una detectabilidad acorde con las directrices clínicas, fueron los anticuerpos producidos contra toda la proteína los que mostraron un mejor perfil de reconocimiento así como una mejor detectabilidad, no obstante aun lejos de los criterios de detectabilidad requeridos para su análisis en pacientes.

Es pues en este punto cuando se planteó mejorar la detectabilidad mostrada por los inmunoreactivos producidos mediante la exploración de diferentes formatos que permitían mejorar el límite de detección. En este sentido se propuso el desarrollo de un inmunosensor electroquímico, mediante la integración de estos elementos de biorreconocimiento con diferentes tipos de nanomateriales, como partículas magnéticas o metálicas. Esta descrito en la bibliografía que la utilización de estos métodos de transducción pueden mejorar la detectabilidad del ensayo de forma substancial<sup>224-225</sup>.

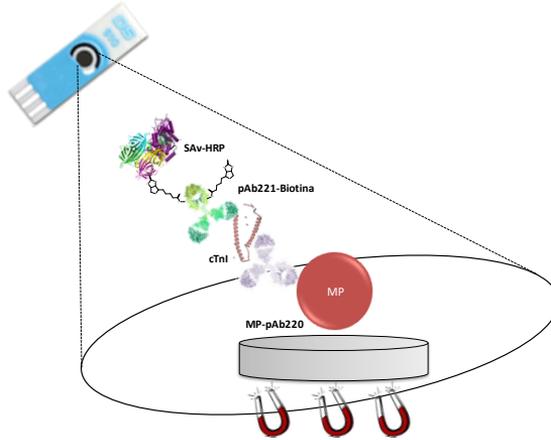
#### 4.2.6 Desarrollo de un inmunosensor amperométrico para la detección de troponina I cardíaca

El objetivo de esta parte del trabajo fue mejorar las prestaciones analíticas del inmunoensayo en términos de detectabilidad y a su vez reducir el tiempo de ensayo, mediante el desarrollo de un inmunosensor amperométrico. El inmunoensayo desarrollado en formato placa mediante el uso de los anticuerpos As220 y pAb221-B, se implementó mediante el uso de partículas magnéticas, en un inmunosensor amperométrico formato sándwich. Este formato ha sido explorado en el grupo de investigación para la determinación de moléculas de bajo peso molecular<sup>226-230</sup> pero nunca antes en formato sándwich.

Los biosensores amperométricos permiten medir una intensidad de corriente generada a partir de un proceso de oxidación o reducción en la superficie de un electrodo y a un potencial constante. La intensidad de la corriente adquirida es directamente proporcional a la concentración de una sustancia electroactiva responsable del proceso redox. La generación de estos compuestos electroactivos se lleva a cabo generalmente a través de un sistema enzimático, que es capaz de convertir la especie inicialmente inactiva desde el punto de vista electroquímico, en un producto susceptible de ser oxidado o bien reducido sobre el electrodo de trabajo, manteniendo un potencial constante respecto al electrodo de referencia. En general, se utiliza un mediador para realizar la medida amperométrica fruto del intercambio de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo, concretamente la 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB)<sup>231-232</sup>. En este caso en particular, se han utilizado electrodos serigrafiados de carbono, integrados por un electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y un electrodo de referencia de plata.

Para el desarrollo del inmunosensor amperométrico se ha implementado el formato desarrollado en placa en el cual se hace uso de los anticuerpos As220 y pAb221-B. En este caso utilizando un bioconjugado a partículas magnéticas del anticuerpo de captura, MP-pAb220 y el bioconjugado de Sav-HRP como trazador enzimático, junto con el sustrato formado por TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mediante el uso de partículas magnéticas, con un imán es posible capturar el complejo MP-pAb220:cTnl:pAb221-B:Sav-HRP sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono, favoreciendo la transferencia electrónica entre las diferentes

especies involucradas, y de esta forma incrementando la sensibilidad y rapidez del método (Figura 4.17).

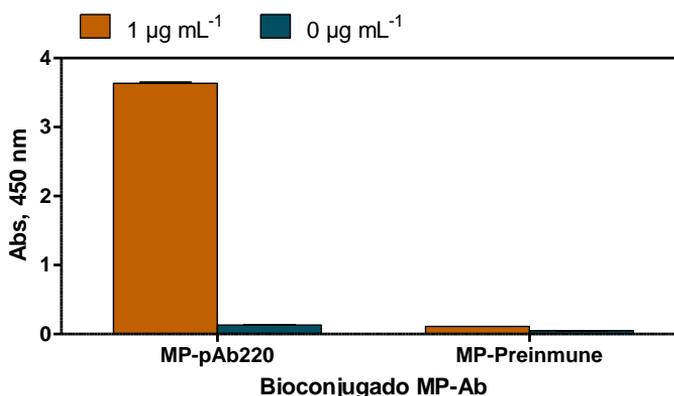


**Figura 4.17.** Esquema donde se representa la captura del complejo MP-pAb220:cTnI:pAb221-B:SAV-HRP sobre el electrodo de trabajo mediante el uso de un imán. La intensidad de corriente registrada en este caso será directamente proporcional a la concentración de enzima, y a su vez, directamente proporcional a la concentración de cTnI en la muestra.

#### 4.2.6.1 Estudio de la adsorción inespecífica de la cTnI sobre las partículas magnéticas

Dada la naturaleza hidrofílica de la cTnI y la tendencia observada a presentar fenómenos de adsorción inespecífica, inicialmente se evaluó la presencia de este tipo de interacciones indeseadas de la cTnI a la superficie de las partículas magnéticas. Se comparó la respuesta obtenida mediante el anticuerpo de captura específico respecto un anticuerpo no específico, ambos inmobilizados sobre partículas magnéticas Chemicell SiMAG® de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Finalmente, se realizó un Magneto ELISA sobre ambos bioconjugados a dos niveles diferentes de cTnI, 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (sección 6.6.5, pág. 213).

Los resultados mostrados en la Figura 4.18 no presentaron ningún tipo de adsorción inespecífica significativa. Este hecho es, posiblemente debido a que las partículas magnéticas poseen un recubrimiento polimérico de sílica que les confiere cierto carácter hidrofóbico (Figura 4.18).



**Figura 4.18.** Evaluación de la adsorción inespecífica de la cTnI sobre las partículas magnéticas mediante ensayo Magneto ELISA. La concentración de MP-Ab utilizada en ambos casos fue de 0.4 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que la concentración de pAb221-Biotina fue de 2 µg mL<sup>-1</sup>. La reacción colorimétrica se detuvo al cabo de 5 minutos.

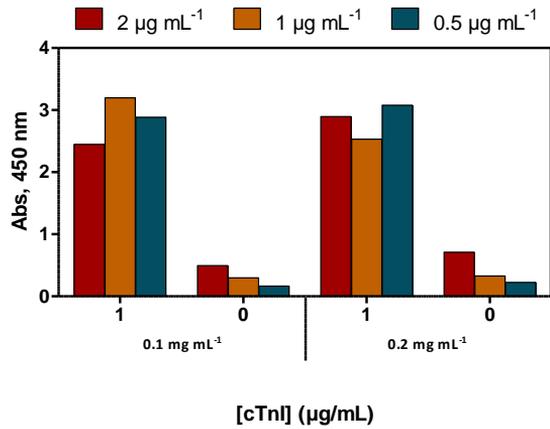
#### 4.2.6.2 Optimización del inmunosensor amperométrico para la detección de cTnI

Se realizaron diferentes ensayos de optimización para el ensayo tipo Magneto-ELISA para la cTnI. Inicialmente, estos ensayos de optimización se realizaron mediante transducción colorimétrica, para una vez estipuladas las condiciones óptimas de ensayo, implementarlas en el inmunosensor amperométrico.

- **Concentración de inmunorreactivos**

Se realizaron ensayos de optimización para la concentración de cada inmunorreactivo por Magneto-ELISA. Inicialmente se evaluaron diferentes concentraciones del bioconjugado MP-pAb220, 0.1 y 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, junto con diferentes concentraciones del anticuerpo de detección pAb221-Biotina, 2, 1 y 0.5 µg mL<sup>-1</sup>, a dos concentraciones diferentes de cTnI, 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 4.19).

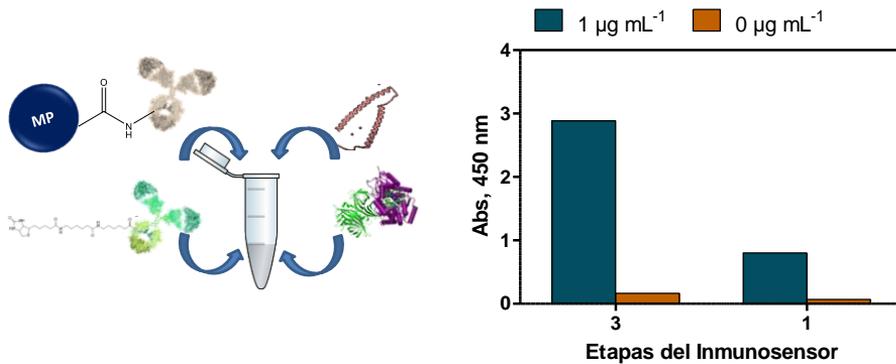
Se seleccionaron concentraciones de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de MP-pAb220 y de 0.5 µg mL<sup>-1</sup> de pAb221-Biotina para desarrollar el inmunosensor amperométrico para la cTnI, puesto que para esta combinación se observó una mejor relación señal/ruido de fondo que para el resto de los casos.



**Figura 4.19.** Optimización de la concentración del bioconjugado MP-pAb220 y pAb221-Biotina a dos niveles diferentes de cTnI, 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup>. Se evaluaron concentraciones de MP-pAb220 de 0.1 y 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que de pAb221-Biotina de 2, 1 y 0.5 µg mL<sup>-1</sup>. En todos los casos se utilizó una dilución del bioconjugado Streptavidin-HRP de 1/6000.

- **Tiempo de incubación**

Seguidamente se evaluó el efecto sobre la señal máxima obtenida, al realizar el inmunoensayo incubando todos los inmunorreactivos en una sola etapa durante 30 minutos (sección 6.7.1, pág. 220), con el fin de reducir el tiempo del inmunoensayo (Figura 4.20).

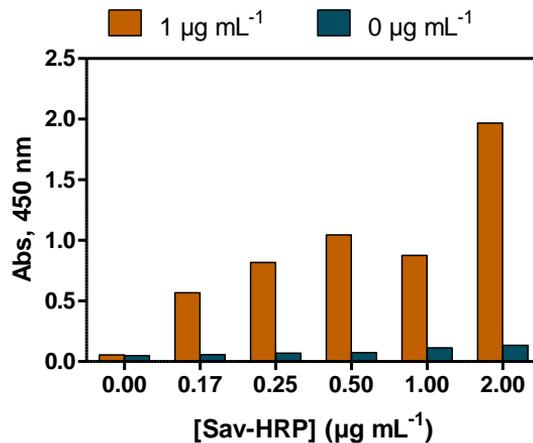


**Figura 4.20.** Esquema del Magneto ELISA formato sándwich realizado en una sola etapa de incubación de 30 minutos. Comparación de la señal máxima y ruido de fondo presentado por el Magento ELISA tipo Sándwich cuando se realiza en una sola etapa de incubación durante 30 minutos o bien de forma secuencial con 3 etapas de 30 min cada una, a temperatura ambiente. En todos los casos se trabajó a una concentración de MP-pAb220 de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> y de pAb221-B de 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

A la vista de los resultados, la señal máxima decrecía considerablemente (de aproximadamente 3 a 1 OD) cuando pasábamos de realizar el inmunoensayo en diferentes etapas, de forma secuencial, a realizarlo en una única etapa. No obstante, el ruido de fondo no se vió incrementado al reducir el tiempo de ensayo, dando lugar a una buena relación señal/ruido de fondo y haciendo posible la realización del inmunoensayo en una sola etapa durante 30 minutos. Además la señal máxima podía verse incrementada optimizando la concentración del trazador enzimático Sav-HRP.

- **Concentración del bioconjugado Estreptavidina-HRP**

Con el fin de incrementar esta señal máxima, se evaluaron diferentes concentraciones del bioconjugado de Sav-HRP, manteniendo la concentración del resto de inmunorreactivos y el tiempo de incubación constantes (véase Figura 4.21).

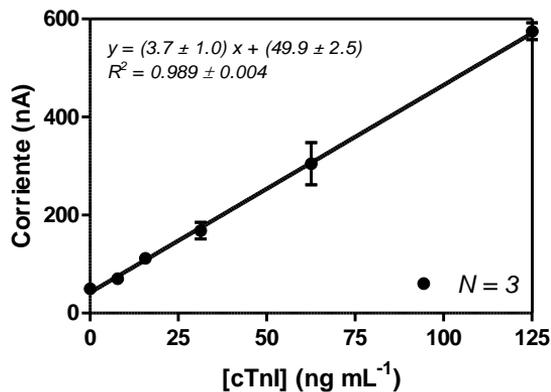


**Figura 4.21.** Optimización de la concentración de Sav-HRP para el Magneto ELISA en formato sándwich en una sola etapa para la cTnI. La concentración del bioconjugado MP-pAb220 es de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> y la concentración de pAb221-B de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se estudiaron dos niveles distintos de cTnI, 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Los resultados de este experimento muestran como es posible incrementar la señal máxima y así la relación señal/ruido trabajando a una concentración de SAV-HRP de 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

- **Establecimiento de la recta de calibrado para la detección de cTnI**

Con estas condiciones finales de ensayo se desarrolló la recta de calibrado para la cTnI en este caso mediante transducción amperométrica (sección 6.7.1, pág. 220). La respuesta amperométrica se registró tras la deposición de cada uno de los puntos sobre un electrodo interdigitado serigrafiado de carbono (Dropsens™) y la adición del correspondiente sustrato transcurrido un tiempo de equilibrio. Los resultados del promedio de la recta de calibrado para tres días se muestran en la Figura 4.22, así como los parámetros analíticos en la Tabla 4.10.



**Figura 4.22.** Recta de calibrado para la cTnI correspondiente al promedio de tres días diferentes. Cada punto se realizó por triplicado. El bioconjugado MP-pAb220 se utilizó a una concentración de 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que el anticuerpo de captura, pAb221-B a 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 4.10 .** Parámetros analíticos de la recta de calibrado para la cTnI en 10 mM PBS-T pH 7.5 y 0.05 % Tween, para N = 3

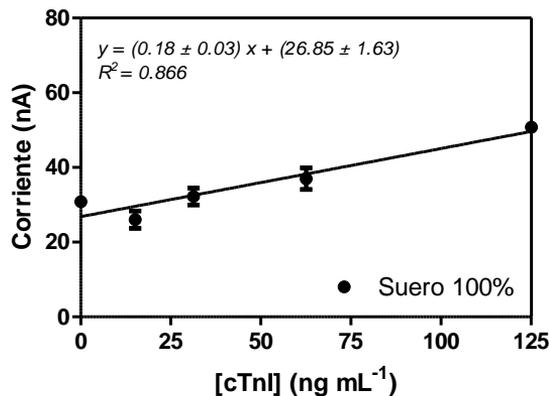
<b>Troponina I Cardíaca</b>	
<b>Pendiente</b>	3.7 ± 1.0
<b>Ordenada</b>	49.9 ± 2.5
<b>R<sup>2</sup></b>	0.989 ± 0.004
<b>LD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	5.3 ± 1.5
<b>LC (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	20.4 ± 6.0

*El inmunoensayo amperométrico tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección MP-pAb200/pAb221-B. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste lineal empleando la ecuación de  $y = a + bx$ , donde  $a$  es la ordenada en el origen, mientras que  $b$  es la pendiente. Cada punto corresponde al promedio de ensayos realizados en tres días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por triplicado. La curva de calibrado para la cTnI se preparó en 10 mM PBS-T (PBS pH 7.5 0.05 % Tween).*

De esta forma, se consiguió reducir en un orden de magnitud la detectabilidad respecto a la alcanzada por el ensayo desarrollado en microplaca tipo ELISA sándwich, y lo que es aun más destacable, se consiguió disminuir el tiempo de ensayo de forma considerable, pasando de 2 horas a un tiempo de 30 minutos. No obstante los valores de detectabilidad seguían siendo demasiado altos considerando el valor de establecido correspondiente al percentil 99 de una población de referencia de  $0.06 \text{ ng mL}^{-1}$ .

- **Evaluación de la robustez del inmunosensor en presencia de suero humano**

Finalmente se realizó una prueba de robustez del inmunosensor en presencia de suero humano. Con el fin de evitar perder detectabilidad en el inmunoensayo, se realizó una recta de calibrado directamente de suero humano sin aplicar ningún tipo de dilución previa. De esta forma, se preparó la recta de calibrado en suero, y se procedió de igual forma que en el caso descrito anteriormente, llevando a cabo el inmunoensayo en una única etapa de 30 minutos. En la Figura 4.23 se muestra la recta de calibrado para este experimento.



**Figura 4.23.** Recta de calibrado para la cTnI en presencia de suero humano. Datos correspondientes a un único día, cada punto con su tríplica correspondiente. El bioconjugado MP-pAb220 se utilizó a una concentración de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que el anticuerpo de captura, pAb221-B a  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . La recta de calibrado se preparó en suero humano comercial.

Puede observarse como, trabajando en estas condiciones, el ensayo pierde sensibilidad y también señal, observándose un efecto matriz no deseado. La detectabilidad del inmunoensayo también se vio afectada, incrementando en un orden de magnitud, pasando de  $5.3 \text{ ng mL}^{-1}$  en PBS-T a los  $25.03 \text{ ng mL}^{-1}$  en presencia de suero humano.

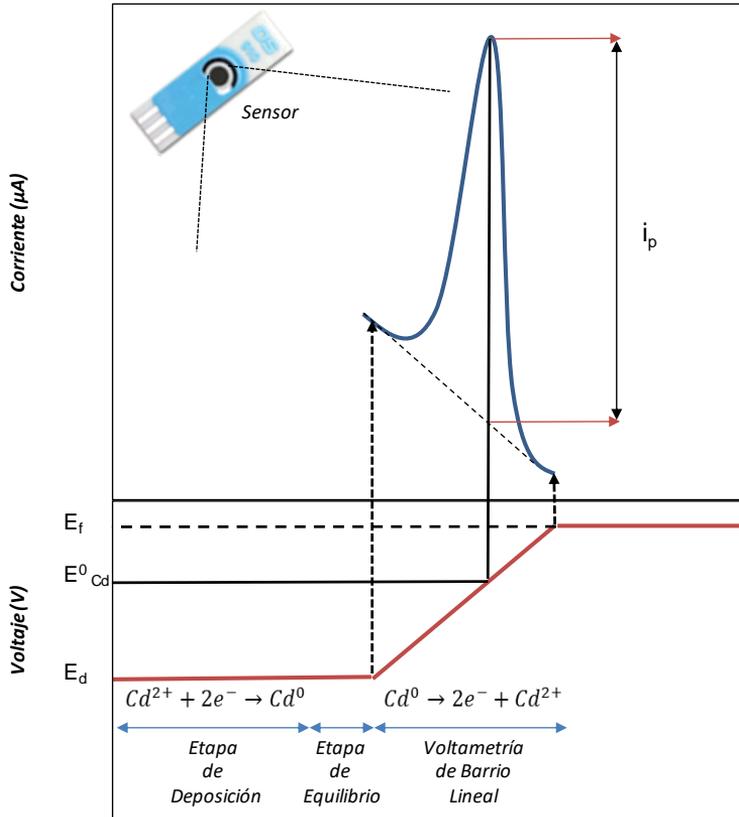
En este punto se decidió explorar otros métodos de transducción que permitiesen la mejora de la detectabilidad del ensayo con los inmunoreactivos producidos y que pudiesen llegar a los criterios establecidos por las guías de la ECS/ACC .

#### **4.2.7 Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico para la detección de troponina I cardíaca**

Con el fin de mejorar la detectabilidad del inmunoensayo y del inmunosensor amperométrico anteriormente descrito y así alcanzar los valores recomendados por las guías ESC/ACC, se planteó el desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico mediante la detección de nanopartículas metálicas de cadmio.

Los biosensores voltamperométrico o potenciométricos, son capaces de medir las alteraciones de potencial que ocurren en la superficie del electrodo a flujos de corriente cercanos a cero. El potencial de electrodo medido se determina respecto a un electrodo de referencia que suele ser de plata/cloruro de plata o bien calomelanos. En este caso, como marcador del evento de bioconocimiento entre el anticuerpo y su correspondiente antígeno se utilizaron diferentes nanomateriales como quantum dots y nanopartículas de cadmio en vez de el revelado mediante un sustrato utilizado anteriormente en el ELISA y en el inmunosensor amperométrico. El hecho que se utilice un marcaje con nanopartículas de cadmio hace que la relación molar cadmio/elemento de bioconocimiento sea muy elevada, amplificando el evento inmunoquímico y a priori mejorando las prestaciones analíticas del ensayo, como por ejemplo, la detectabilidad. Este efecto de amplificación se ve favorecido por la realización de una voltamperometría de redisolución anódica (VRA) ya que mediante la aplicación de un potencial de reducción determinado, es posible depositar todo el cadmio sobre la superficie del electrodo de trabajo, y concentrarlo de este modo. Seguidamente, tras la aplicación de un barrido de potenciales, todo el

cadmio se oxida a su forma catiónica, obteniendo de esta forma un pico de intensidad proporcional a la concentración de cTnI, a un potencial característico de este metal. En la Figura 4.24 se representa de forma esquemática el proceso



descrito.

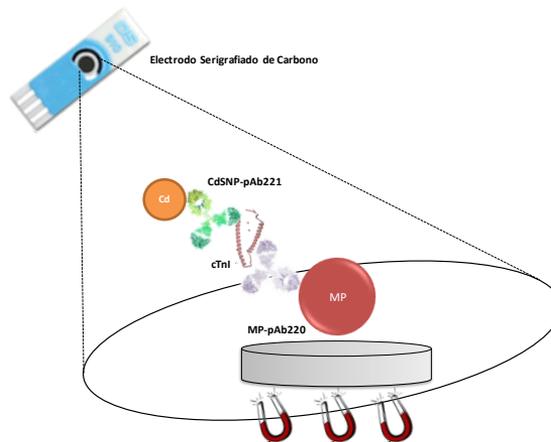
**Figura 4.24.** Esquema general del proceso de ASV (Anodig Stripping Voltammetry) donde tras una etapa de deposición del cadmio sobre el sensor mediante la aplicación de un potencial de reducción ( $E_d$ ), es liberado al aplicar un barrido de potencial hasta un potencial final ( $E_f$ ), mostrando un pico de intensidad relativa, a un potencial característico  $E^0_{\text{Cd}}$ .

En la bibliografía es posible encontrar varios trabajos basados en el uso de este tipo de nanomateriales, cuya amplificación es capaz de mejorar sustancialmente las características analíticas del ensayo, llegando a alcanzar valores de detectabilidad del orden de  $\text{pM}$ <sup>233-237</sup>. Este es el caso de los diferentes trabajos publicados por Valera y colaboradores<sup>238-239</sup>, donde se demuestra como el uso de estas nanopartículas metálicas como marcadores para el desarrollo de un sistema multirespuesta de transducción potenciométrica, permite mejorar la

detectabilidad respecto a la del ensayo en microplaca ELISA de forma significativa, alcanzando en determinados casos el orden de los  $\text{pg mL}^{-1}$ .

#### 4.2.7.1 Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en nanopartículas de CdS

En esta parte de la tesis se abordó el desarrollo de un inmunosensor electroquímico basado en la detección voltamperométrica del cadmio a partir de la síntesis de nanopartículas de sulfuro de cadmio y posterior bioconjugación al anticuerpo de detección pAb221. El formato de ensayo (Figura 4.25) se realizó en base a la utilización de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo pAb220 como anticuerpo de captura, en base a la experiencia obtenida en el desarrollo del inmunosensor amperométrico.

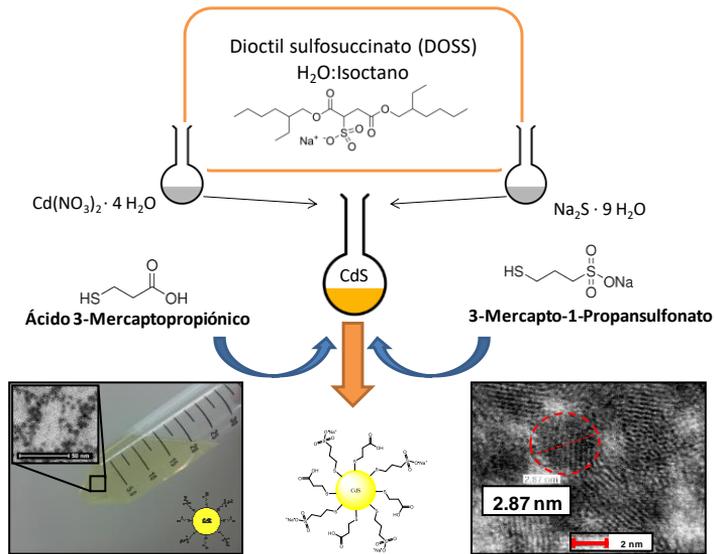


**Figura 4.25.** Esquema donde se representa la formación del complejo MP-pAb220:cTnI:CdSNP-pAb221 sobre el electrodo de trabajo. La intensidad de corriente registrada, tras el proceso de ASV, será directamente proporcional a la concentración de cadmio, y a su vez, directamente proporcional a la concentración de cTnI en la muestra.

#### 4.2.7.2 Síntesis de nanopartículas de CdS

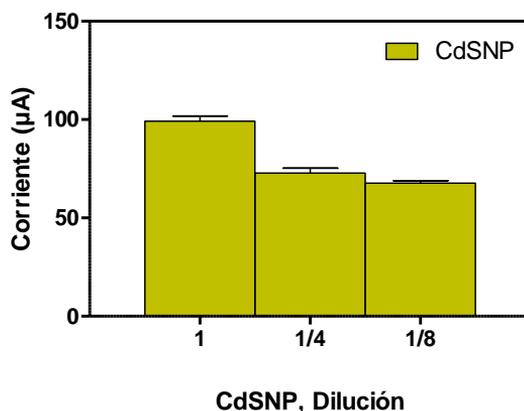
Inicialmente se sintetizaron las nanopartículas de sulfuro de cadmio (CdSNP) siguiendo y adaptando el procedimiento descrito por Agostiano *et al.*<sup>240</sup> y Mirgorod *et al.*<sup>241</sup> basado en la formación de microemulsiones tipo agua-en-aceite que permiten controlar el tamaño de las nanopartículas (sección 6.4.6,

pág. 201). Las nanopartículas de cadmio se funcionalizaron con grupos carboxilo para su posterior conjugación a proteínas mediante la formación de una monocapa autoensamblada mixta (SAM) de ácido 2-mercaptopropiónico y el 3-mercapto-1-propansulfonato, utilizado para evitar la agregación de las partículas (Figura 4.26). Una vez sintetizadas, estas CdSNP fueron caracterizadas mediante microscopia de transmisión electrónica (TEM) y se determinó que su tamaño era alrededor de 3 nm. Del mismo modo, la concentración final de estas nanopartículas fue determinada por técnicas de voltamperometría de redisolución anódica (VRA), resultando ser de  $3,65 \times 10^{16}$  CdSNPs/mL<sup>239</sup>.



**Figura 4.26.** Proceso esquemático donde se representan las diferentes etapas realizadas durante la síntesis de las nanopartículas de CdS. Tras la preparación por separado y posterior mezcla de cada una de las sales en un medio que contiene DOSS como tensioactivo, se forma la SAM derivatizando la superficie de las nanopartículas con grupos carboxilo para su posterior bioconjugación a proteínas. Se representan también dos imágenes adquiridas por TEM donde se muestran el tamaño promedio de estas nanopartículas.

Finalmente, estas nanopartículas fueron caracterizadas electroquímicamente para ver el perfil de la respuesta electroquímica que mostraban tras realizar una voltamperometría de barrido (Figura 4.27).



**Figura 4.27.** Evaluación de la respuesta electroquímica de las nanopartículas de sulfuro de cadmio sintetizados en el laboratorio. Todos los resultados se obtuvieron tras aplicar un potencial de deposición de  $-1.2$  V durante 120 s, y tras realizar el barrido de potenciales de  $-0.6$  a  $-1.2$  V, observando un pico característico para la oxidación del Cd a  $-0.75$  V. En todos los casos, el volumen final depositado en la celda electroquímica fue de  $100 \mu\text{L}$ .

La concentración de nanopartículas para su posterior conjugación al anticuerpo se ajustó mediante absorción UV-Vis. Para esto se buscó aquella dilución de CdSNP que proporcionara una señal óptica de 1 ODs, que en este caso correspondió a una dilución de  $\frac{1}{4}$ .

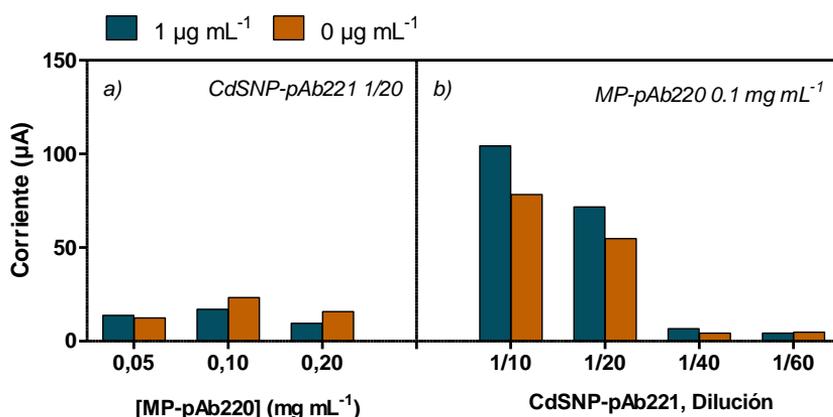
#### 4.2.7.3 Biofuncionalización de las nanopartículas de CdS con en anticuerpo pAb221

Los grupos carboxilo fueron activados mediante EDC/NHS y posteriormente conjugados al anticuerpo de detección pAb221 (sección 6.4.7, pág. 204). El rendimiento de esta conjugación, estimado por medio de la cuantificación de anticuerpo libre no conjugado, fue de  $91.2 \pm 8.3$  % (sección 6.3, pág. 189). Teniendo en cuenta estos resultados, junto con el valor de concentración de CdSNPs/mL podemos decir que cada anticuerpo se conjugó con 3 nanopartículas de CdS.

#### 4.2.7.4 Optimización de la concentración de los diferentes bioconjugados MP-pAb220 y CdSNP-pAb221

Seguidamente se realizaron diferentes ensayos de titración con el fin de determinar las concentraciones óptimas de cada inmunorreactivo (sección 6.7.2, pág. 222). Inicialmente se evaluaron diferentes concentraciones del bioconjugado MP-pAb220 a una dilución fija de CdSNP-pAb221 y a dos niveles de cTnI, 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.28).

Como puede observarse en todos los casos e independientemente de las concentraciones de inmunorreactivo evaluadas, se observó un ruido de fondo comprable a la señal obtenida en presencia de cTnI. Dado que esta señal inespecífica se manifestaba en ausencia de cTnI, se asoció directamente a una interacción no específica entre el bioconjugado a partícula magnética y el bioconjugado CdSNP-pAb221.



**Figura 4.28.** Ensayos de titración para la determinación de las concentraciones de cada inmunorreactivo para el desarrollo de la recta de calibrado para la cTnI. a) Evaluación de diferentes concentraciones del bioconjugado MP-pAb220, 0.05, 0.1 y 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$ , a dos niveles de cTnI, 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y a una dilución constante de CdSNP-pAb221 de 1/20. b) Evaluación de diferentes diluciones del bioconjugado a CdSNP, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/60, a dos niveles de cTnI y una concentración fija de MP-pAb220 de 0.1  $\text{mg mL}^{-1}$ . En ambos casos la señal electroquímica se adquirió tras depositar las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo una vez resuspendidos en tampón 0.1 M AcONa pH 5.4 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Bi(III) y realizar el correspondiente voltamperometría.

#### 4.2.7.5 Evaluación de diferentes tipos de partículas magnéticas sobre la adsorción inespecífica del bioconjugado CdSNP-pAb221

Con el fin de minimizar estas adsorciones inespecíficas se plantearon diferentes estrategias. La primera se enfocó en las partículas magnéticas y en la superficie de éstas. Mientras que la segunda, se centró en la síntesis de las nanopartículas de CdS y en su funcionalización.

En estudios preliminares llevados a cabo por el Dr. Valera con el fin de minimizar estas adsorciones inespecíficas, se llevaron a cabo mediante la utilización de varios tampones así como de aditivos en el tampón en la etapa de reconocimiento de la cTnI sin obtener ningún resultado relevante (datos no incluidos en esta tesis).

Por tanto, se evaluaron diferentes tipos de partículas magnéticas con diferentes recubrimientos poliméricos y por tanto, diferente comportamiento hidropático. En la Tabla 4.11 se muestran las partículas magnéticas evaluadas.

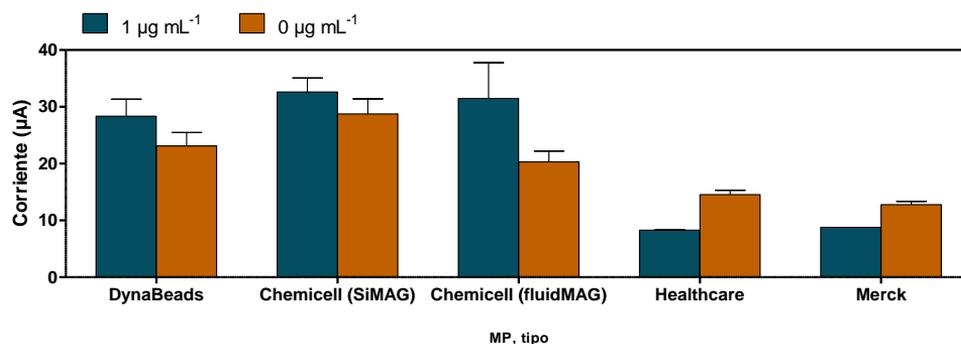
**Tabla 4.11.** Resumen de las principales características que presentan las partículas magnéticas evaluadas en el sensor voltamperométrico para la cTnI.

Casa Comercial	Tipo	Grupo Funcional	$\emptyset$ ( $\mu\text{m}$ )	Recubrimiento	Hidropatía
DynaBeads	MyOne	p-Toluensulfonilo	1	Poliuretano	Hidrofílico
ChemiCell	SiMAG-Carboxyl	Carboxilo	1	Silica, no porosa	Hidrofóbico
	fluidMAG-CMX	Carboxilo	0.2	Dextrano	Hidrofílico
GE Healthcare	Sera-Mag	Carboxilo	1	Poliestireno	Hidrofóbico
Estapor (Merck)	Sera-Mag	Carboxilo	0,7-1,3	Poliestireno	Hidrofóbico

*Se muestran diferentes partículas magnéticas de diferentes tamaños y con diferentes grupos funcionales en la superficie dispuestos para la inmovilización de biorreceptores, este caso, anticuerpos.*

Tras el paso de biofuncionalización de cada una de estas partículas magnéticas con el pAb220 (sección 6.4.5, pág. 197) y con rendimientos superiores al 90% en todos los casos, se procedió a la evaluación de la relación señal/ruido de fondo a dos niveles de cTnI, 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.29). Puede observarse como independientemente de la naturaleza del polímero que recubre las partículas

magnéticas, se sigue observando una adsorción inespecífica por parte del bioconjugado de CdSNP de magnitud igual o mayor a la señal electroquímica observada en presencia de cTnI. Estos hechos nos llevaron a pensar que, independientemente de la superficie de ensayo, el problema residía en el bioconjugado de CdSNP.



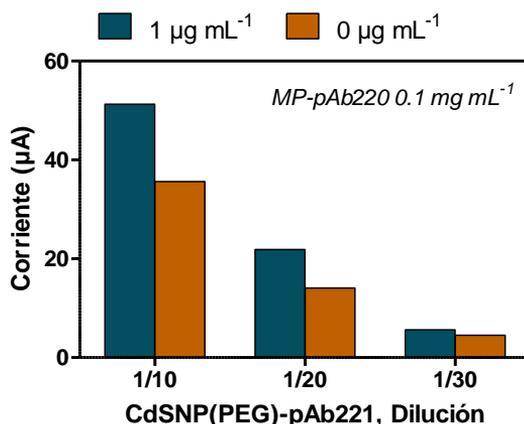
**Figura 4.29.** Resultado de la evaluación de diferentes partículas magnéticas en el sensor electroquímico para la cTnI. La concentración de MP-pAb220 en todos los casos es de 0.16 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que la dilución del bioconjugado CdSNP-pAb221 de 1/20

Aun así, para el desarrollo del inmunosensor potenciométrico, se decidió trabajar con las partículas magnéticas Chemicell SiMAG, ya que, tal y como se demostró en la sección 4.2.6.1, página 148, no presentaban ningún fenómeno de adsorción inespecífica para la cTnI.

#### 4.2.7.6 Efecto del tipo de SAM en la preparación de las nanopartículas de CdS sobre la adsorción inespecífica

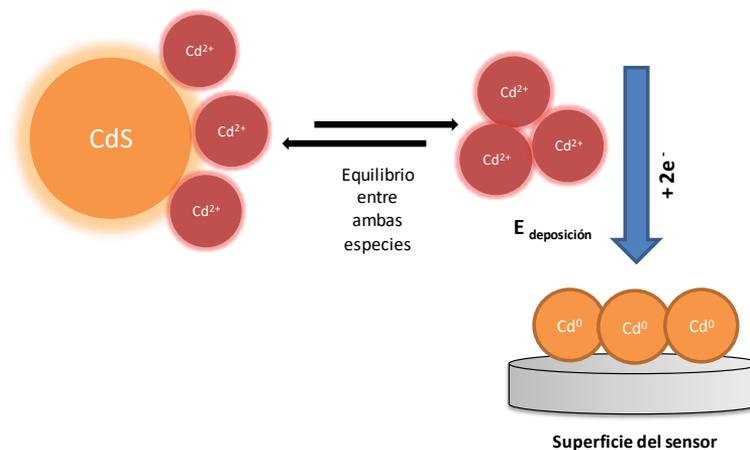
Dada que la fuente de adsorción inespecífica podría venir de las nanopartículas de CdS, se decidió evaluar el efecto provocado al cambiar la capa de funcionalización de las CdSNP. En este caso se propuso el uso de derivados del polietilenglicol, con el fin de disminuir el carácter hidrofóbico que presentan estas nanoestructuras<sup>242</sup> (sección 6.4.6, pág. 201). Una vez caracterizado el nuevo batch de nanopartículas de CdSNP(PEG), se procedió a su biofuncionalización con pAb221, obteniéndose un rendimiento de conjugación del 80 %, lo que implicaba una relación CdSNP(PEG)/pAb221 de 2.7. De nuevo se evaluaron los nuevos bioconjugados al sensor voltamperométrico estudiando en cada caso la relación señal/ruido de fondo a dos niveles de cTnI. Los resultados

obtenidos (Figura 4.30) muestran como de nuevo las adsorciones inespecíficas no se conseguían eliminar completamente.



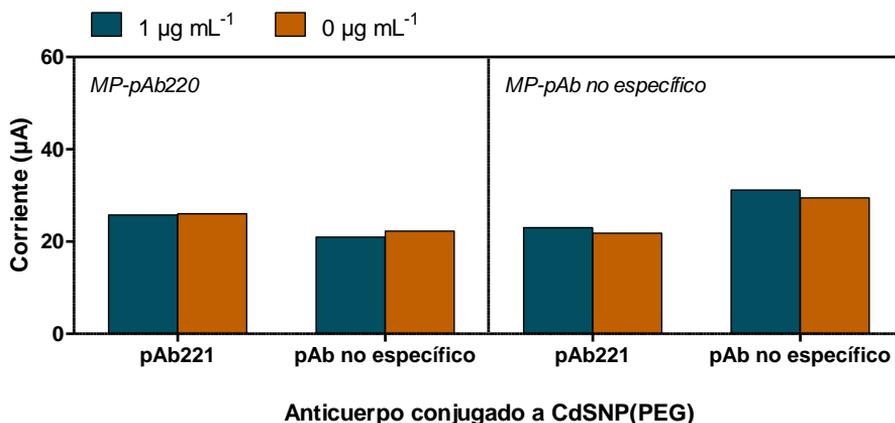
**Figura 4.30.** Evaluación de la relación señal/ruido para el nuevo batch de nanopartículas de CdS preparados y funcionalizados con derivados del PEG. Para todos los casos, se utilizó una concentración de MP-pAb220 de 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, a 3 concentraciones diferentes de CdSNP(PEG)-pAb221 de 1/10, 1/20 y 1/30, y a dos niveles de cTnI, 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup>. Los resultados mostrados corresponden a un día y una sola medida por punto.

A la vista de los resultados obtenidos en los cuales se pone de manifiesto que existe una adsorción inespecífica por parte de las nanopartículas de CdS independientemente de las características que presente la superficie magnética sobre la que se realiza el ensayo, e independientemente del tipo de grupos o moléculas utilizadas en la funcionalización de estas nanopartículas. De este modo, se barajó la hipótesis de que las nanopartículas de CdS fueran liberando iones de Cd<sup>2+</sup> y que éstos fueran los principales causantes de esta señal inespecífica y consecuentemente, del ruido de fondo observado. El equilibrio entre estas dos especies, descrito por Arben *et al.*<sup>243</sup>, es el que hace posible realizar la detección electroquímica de este elemento sin necesidad alguna de realizar una etapa previa de digestión en medio ácido, ya que simplemente aplicando un potencial de reducción, es posible desplazar el equilibrio hacia la reducción del Cd y así depositar la mayor cantidad de este metal sobre la superficie del electrodo, tal y como se muestra en la Figura 4.31.



**Figura 4.31.** Representación esquemática donde se representa el estado de equilibrio entre las nanopartículas de CdS y los cationes de cadmio. Al aplicar el potencial de reducción adecuado, el equilibrio se ve desplazado hacia la reducción y deposición de Cd sobre la superficie del electrodo.

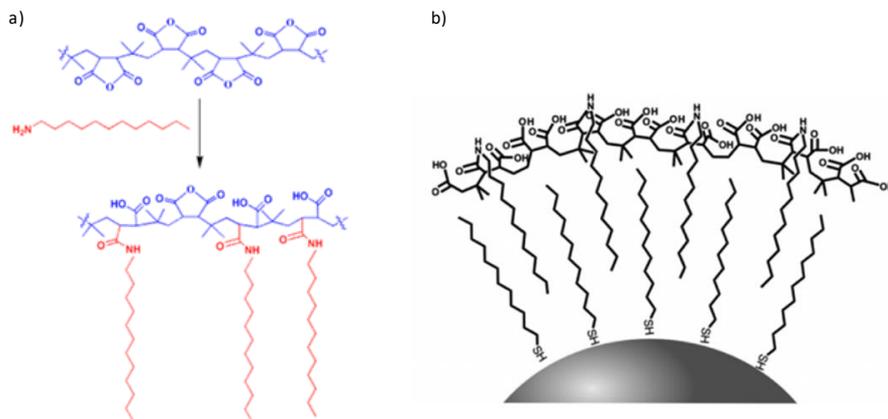
Con el fin de confirmar esta hipótesis y determinar que independientemente de la funcionalización y posterior biofuncionalización de las partículas, tanto metálicas como magnéticas, se observaba señal electroquímica procedente de este cadmio catiónico en equilibrio con el nanocrystal, se planteó un experimento en el cual se hizo uso tanto de bioconjugados con anticuerpos específicos, como inespecíficos. De esta forma, si la magnitud de la señal electroquímica observada en todos los casos es similar, podríamos en parte confirmar esta hipótesis. Para esto, se prepararon de nuevo conjugados de MP-pAb no específico y CdSNP-pAb no específico, siguiendo los mismos protocolos que en el caso de los bioconjugados con anticuerpos específicos y se valoró la respuesta del sensor mediante el uso de estos nuevos bioconjugados, a dos niveles de cTnI, incluyendo el 0. Los resultados del inmunoensayo (Figura 4.32) mostraron que la señal electroquímica en todos los casos era independiente tanto de la especificidad del anticuerpo como de la carga del mismo en las partículas magnéticas. De esta forma se confirmó, que la adsorción inespecífica y el ruido de fondo observado se debe principalmente a las nanopartículas de CdS y en particular a los cationes de cadmio que se encuentran en equilibrio con esta nanoestructura.



**Figura 4.32.** Evaluación de la adsorción inespecífica de las nanopartículas de CdSnP sobre las partículas magnéticas, mediante el uso de bioconjugados con anticuerpos no específicos para la cTnI a modo de blancos. En todos los casos los bioconjugados a MP se evaluaron a una concentración de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que los conjugados a CdSNP(PEG) a una dilución 1/60. Resultados de un solo día con una única réplica.

#### 4.2.8 Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en quantum dots de CdSe/ZnS

Con el fin de evitar la presencia de estos cationes de cadmio y la adsorción no específica observada asociada a ellos, se decidió desarrollar el inmunosensor electroquímico para la cTnI haciendo uso de quantum dots (QDs) de cadmio. Para ello se estableció una pequeña colaboración con el grupo de Biofotónica dirigido por el Profesor Wolfgang J. Parak, de la Universidad de Marburg (Alemania), especializados en la síntesis de este tipo de materiales. De esta forma, se nos proporcionaron QDs de CdSe recubiertos de una capa de ZnS y con un recubrimiento polimérico de PMA<sup>244</sup> (ácido anhídrico de poliisobutileno al-maleico, Figura 4.33, a). Este polímero anfifílico, se caracteriza en su estructura por poseer dos zonas, una hidrofílica y otra hidrofóbica. Siendo la parte hidrofóbica la responsable de la interacción con la parte hidrofóbica del surfactante presente en la síntesis de las nanopartículas, mientras que la parte hidrofílica es la responsable de facilitar la solubilidad de los QDs en medio acuoso. Esa funcionalización de los QDs cuenta con grupos carboxilo para la posterior biofuncionalización a proteínas tal y como se muestra en la Figura 4.33, b.

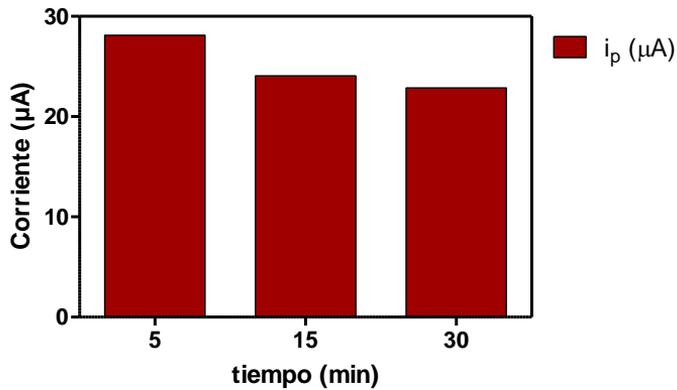


**Figura 4.33.** a) Estructura del polímero sintético PMA-dodecilamina. El ácido anhídrico de poliisobutileno alt-maleico (azul) es modificado con cadenas hidrofóbicas de dodecilamina (rojo). Los anillos anhídrido maléico se enlazan a la cadena hidrofóbica mediante enlace covalente amida. b) Esquema de la estructura de los QDs recubiertos con el PMA<sup>244</sup>.

Estos QDs fueron previamente caracterizados por el grupo del Profesor Parak, mediante técnicas de UV-visible, fluorescencia así como técnicas de DLS para determinar su tamaño y dispersión. De esta forma se determinó que el tamaño de los QDs era de  $15.6 \pm 0.5$  nm con un índice de polidispersidad del 0.5, y se presentaron con una concentración de  $1 \mu\text{M}$  en disolución acuosa.

#### 4.2.8.1 Optimización de la digestión de las nanopartículas de CdSe/ZnS

Dado que en este caso el cadmio se encontraba encapsulado, se hacía necesaria la realización de una etapa de digestión en medio ácido para la liberación de este metal y de este modo hacer posible su detección electroquímica. Con este fin, inicialmente se optimizaron tanto el tiempo de digestión como la concentración de ácido utilizado. Para esto, se evaluó el efecto del ácido clorhídrico a dos concentraciones diferentes, 0.34 y 0.5 M. Del mismo modo, se estudiaron tres tiempos de incubación diferentes, 5, 15 y 30 minutos. Finalmente, cada disolución se resuspendió en el tampón de medida 0.5 M AcONa pH 5.6 y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  en Bi(III) y se realizó la medida voltamperométrica. Los resultados (Figura 4.34) mostraron como el tratamiento con HCl a una concentración de 0.5 M y un tiempo de 5 minutos era suficiente como para generar una respuesta medible y un pico bien definido.



**Figura 4.34 Intensidades de pico** correspondientes a la potenciometría para el  $\text{Cd}^{2+}$  tras digestión en medio HCl 0.5 M a diferentes tiempos de incubación, 5, 15 y 30 minutos. En todos los casos la concentración de QDs fue de 0.1  $\mu\text{M}$ .

Una vez optimizadas las condiciones de liberación del Cd (II), se procedió a la preparación de bioconjugados proteína-QD con el fin de desarrollar el inmunosensor potenciométrico en formato sándwich para la detección de cTnI

#### 4.2.8.2 Biofuncionalización de las nanopartículas de CdSe/ZnS

Seguidamente se optimizó el proceso de bioconjugación de estos QDs a proteína. Llegados a este punto, se decidió conjugar en paralelo QDs al anticuerpo de detección pAb221 antic cTnI y también a Estreptavidina (SAv). Fueron principalmente dos motivos los que nos llevaron a trabajar con dos estrategias a la vez, (i) tal y como se ha demostrado a lo largo de esta tesis, el protocolo de biotinylation de los anticuerpos está bien controlado y caracterizado, de tal forma que el anticuerpo una vez biotinilado, no presenta ningún tipo de desnaturación o modificación en su estructura<sup>245</sup>, y consecuentemente no se observa en ningún ensayo previamente descrito que hace uso de estos anticuerpos, ningún fenómeno de adsorción inespecífica. De esta forma es posible utilizar los anticuerpo biotinilados y los QDs biofuncionalizados con estreptavidina. (ii) El hecho de conjugar los QDs a la estreptavidina hace que el rendimiento de biofuncionalización sea superior ya que la estreptavidina tiene cuatro centros de reconocimiento y el hecho de conjugarlos a QDs hace que sea

más difícil que pierda su funcionalidad. No pasa lo mismo con los anticuerpos, donde el marcaje con QDs es un proceso por optimizar y no está controlado, pudiendo disminuir el rendimiento en su función de reconocimiento. Esto se debe principalmente a que la conjugación a través de los grupos amino del anticuerpo es susceptible a una orientación final aleatoria de la inmunoglobulina.<sup>246-247</sup>

Se evaluaron inicialmente dos relaciones molares COOH:EDC:NHS, 1:50:50 y 1:100:100, y también se estudiaron relaciones molares de proteína:QDs de, 20:1 para el conjugado SAV:QDs y 1:10 para el pAb221:QDs. Las relaciones se establecieron en base a cálculos teóricos descritos por Ma *et al.*<sup>248</sup>, donde es posible determinar el número de proteínas que pueden ser inmovilizadas sobre la superficie de un nanomaterial esférico. En el caso del bioconjugado pAb221-QD, dado que el tamaño del anticuerpo era algo mayor que el de los QDs, se realizó la misma aproximación pero considerando el anticuerpo como la partícula esférica a recubrir con QDs. Finalmente, se obtuvieron los siguientes rendimientos de conjugación para cada caso, y las correspondientes relaciones partícula:proteína (véase Tabla 4.12) (

**Tabla 4.12.** Rendimientos finales de conjugación y relación del número de Estreptavidina/pAb221 por QD según los resultados obtenidos.

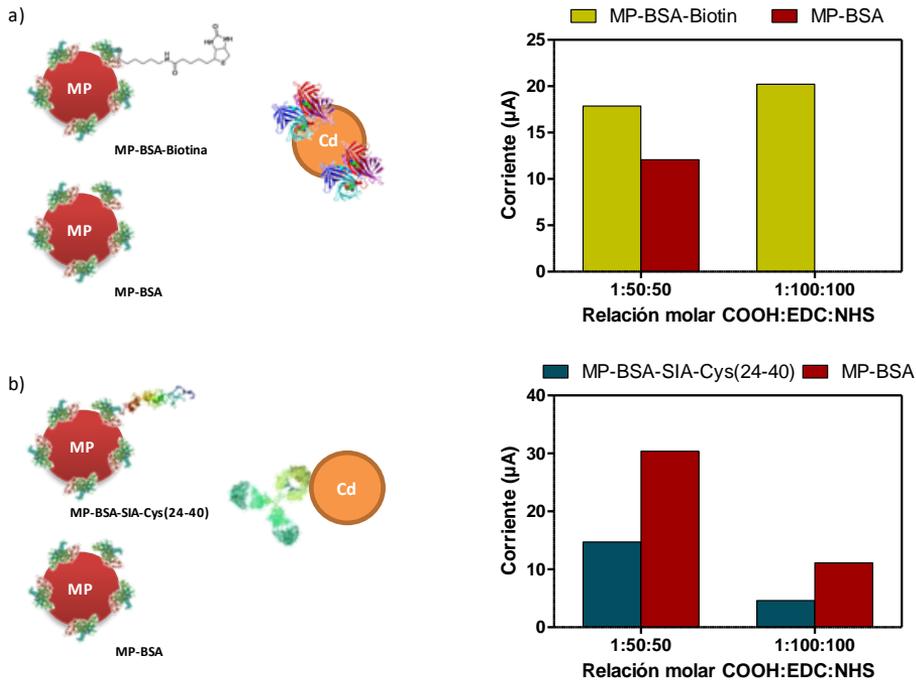
Bioconjugado	Rendimiento (%)	Relación proteína:QD
QDs-SAv	54	1:10
QDs-pAb221	98	8:1

*Se recogen los diferentes rendimientos obtenidos en el proceso de bioconjugación a QDs. La columna "Relación proteína:QD" indica considerando el rendimiento obtenido, cual es la relación final en cada caso de nanopartículas por proteína.*

#### 4.2.8.3 Caracterización electroquímica de los bioconjugados QD-Sav y QD-pAb221

Con el fin de comprobar que el proceso de biofuncionalización de los QDs había sido exitoso, y que además estos bioconjugados eran activos desde el punto de vista electroquímico, se enfrentaron a tres bioconjugados a partícula magnética en cuya superficie se había inmovilizado previamente de forma controlada, BSA, BSA-Biotina y el antígeno BSA-SIA-Cys(24-40) (sección 6.7.2, pág. 222). Este último antígeno se escogió como control, ya que el anticuerpo Ab221 anti cTnI,

presentaba cierto grado de reconocimiento hacia él. Al mismo tiempo, de esta forma podíamos evaluar la especificidad de los bioconjugados producidos. En la Figura 4.35 se muestra un esquema de los controles realizados para la caracterización de los bioconjugados a QDs, junto con los resultados obtenidos en cada caso.



**Figura 4.35.** Evaluación de la actividad de los bioconjugados proteína:QDs preparados a diferentes relaciones molares de EDC:NHS mediante ensayo electroquímico a) Bioconjugado QD-Sav b) Bioconjugado QD-pAb221. En todos los casos, la concentración de MP utilizada fue de  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que la concentración de los conjugados a QDs fue de  $1 \text{ }\mu\text{M}$  (no se diluyeron). Resultados obtenidos tras la digestión en medio ácido  $0.5 \text{ M HCl}$ , 5 minutos y mediante SWV según parámetros de, potencial de deposición  $-1.2 \text{ V}$ , 180 s, barrido de potencial de  $-1.2 \text{ a } -0.6 \text{ V}$ , registrándose picos de oxidación característicos del Cd a un potencial de  $-0.90 \text{ V}$ .

Se observó como los bioconjugados preparados con anticuerpo pAb221 mostraban adsorción inespecífica cuando se enfrentaban a las partículas magnéticas biofuncionalizadas con BSA en ambas relaciones molares. En cambio, para el caso de los bioconjugados a Sav tan solo se observaba este fenómeno para el caso de la conjugación realizada a una relación molar de 1:50:50. Por tanto, se descartaron los bioconjugados con anticuerpos dada su alta adsorción

inespecífica. Del mismo modo se estableció la relación molar COOH:EDC:NHS de 1:100:100 para la preparación de futuros bioconjugados a Sav.

#### 4.2.8.4 Estudio sobre la capacidad de carga de los QDs

Una vez establecidas las condiciones de activación de los grupos carboxilo de los QDs, se procedió a la optimización de la carga de proteína, esto es, a la optimización de la conjugación de Sav-QDs. Para esto, se prepararon bioconjugados a diferentes relaciones molares de QD:Sav de , 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20. Para todos ellos se siguió el mismo protocolo (sección 6.4.7, pág. 204). El rendimiento de conjugación, establecido mediante ensayo en microplaca para la detección de estreptavidina (véase sección 6.5, pág. 206), y la relación molar final QD:Sav se detallan en la Tabla 4.13.

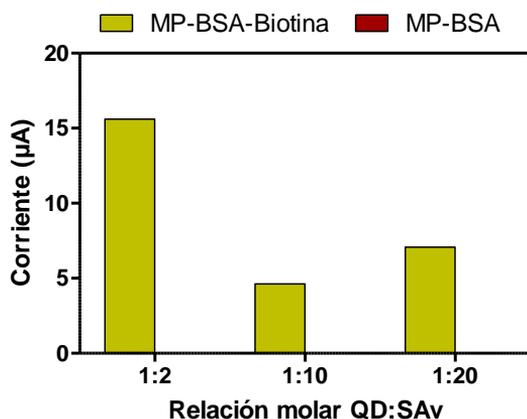
**Tabla 4.13.** Rendimientos finales de conjugación y relación del número de Estreptavidinas por QD según los resultados obtenidos.

Bioconjugado QD:Sav	Rendimiento (%)	Relación final QD:Sav
<b>1:2</b>	99	1:2
<b>1:10</b>	74	1:8
<b>1:20</b>	28	1:10

*Se recogen los diferentes rendimientos obtenidos en el proceso de bioconjugación de Sav a QDs. La columna "Relación final QD:Sav" indica el número de Sav por QD final, considerando el rendimiento obtenido.*

A la vista de las relaciones finales de Estreptavidina/QDs, no es posible incorporar más de 10 Estreptavidinas por QD. Este resultado se repitió en otras conjugaciones realizadas, confirmando que la carga máxima que admitían los QDs era de 10 Estreptavidinas por nanopartícula. Este resultado concuerda con el trabajo publicado por Ma *et al.*<sup>248</sup> en el que considera que la carga máxima teórica de estos QDs es de 8 Estreptavidinas.

Seguidamente, se evaluó la biofuncionalidad y actividad electroquímica de estos bioconjugados mediante el ensayo electroquímico frente a los diferentes bioconjugados MP-BSA y MP-BSA-B. Tal y como puede observarse (Figura 4.36), fue el bioconjugado con una relación de 2 Sav/QD el que mostró una mayor señal electroquímica. No obstante, es remarcable el hecho de que ninguno de los bioconjugados preparados mostró señal inespecífica cuando se evaluaron frente al bioconjugado MP-BSA.



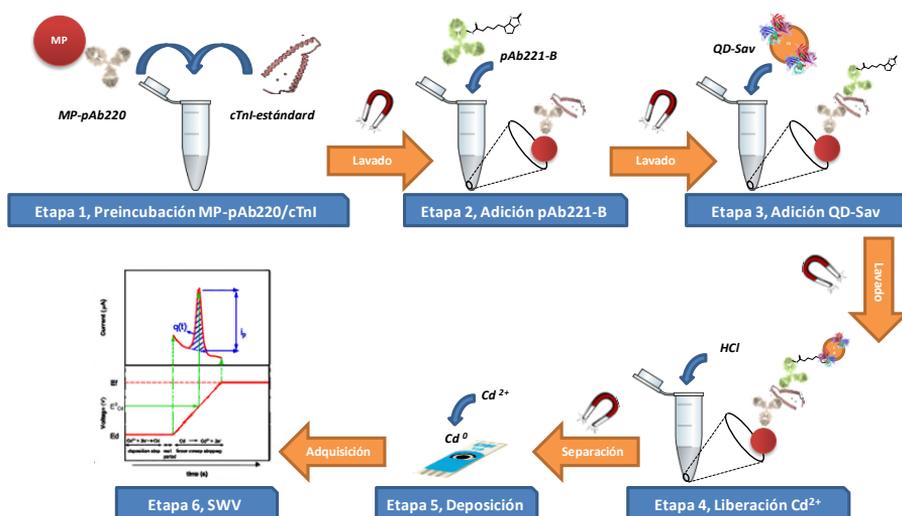
**Figura 4.36.** Evaluación de los bioconjugados QD-SAv, preparados a diferentes relaciones molares QD:SAv y posteriormente evaluados por el sensor electroquímico. En todos los casos se utilizó una concentración de conjugados de MP de  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que los bioconjugados a QD no se diluyeron. La adquisición de la intensidad de corriente se realizó tras la correspondiente digestión en  $0.5 \text{ M}$  en HCl durante 5 minutos. Potencial de deposición  $-1.2 \text{ V}$

A la vista de estos resultados, se decidió utilizar el bioconjugado QD-SAv a una relación 1:2 para desarrollar el inmunosensor potenciométrico para la detección de cTnI, y así determinar si era posible mejorar la detectabilidad de este biomarcador cardíaco mediante la amplificación de la señal electroquímica generada por estos QDs.

#### 4.2.8.5 Curva de calibración para la determinación de cTnI

Los ensayos de titración para determinar las concentraciones óptimas de bioconjugados de MP-pAb220 y pAb221-Biotina se realizaron por Magneto-ELISA (véase sección 6.6.5, pág. 213). Los resultados de estos ensayos mostraban como la concentración óptima de MP-pAb220 era de  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ , mientras que para el conjugado pAb221-Biotina, era de  $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . La concentración de QD-SAv no fue objetivo de optimización, ya que para obtener una señal significativamente diferente del cero, debían de utilizarse a una concentración de  $1 \text{ } \mu\text{M}$ , esto es, sin realizar ningún tipo de dilución previa.

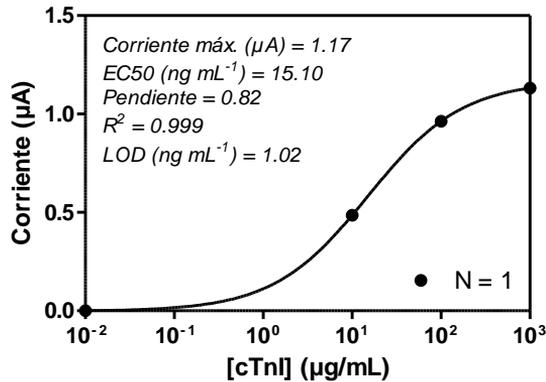
La dosis dependencia del inmunosensor electroquímico se evaluó a concentraciones de cTnI de 1, 0.1, 0.01 y  $0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (sección 6.7.2, pág. 222), siguiendo los pasos que se detallan en el esquema presente en la Figura 4.37.



**Figura 4.37.** Esquema donde se detallan las diferentes etapas seguidas para el desarrollo del inmunosensor voltamperométrico para la detección de cTnI. Inicialmente se realiza una incubación entre el bioconjugado MP-pAb21 y la cTnI (Etapa 1). Seguidamente (Etapa 2), se realiza una incubación con el anticuerpo de detección pAb221-B, para acto seguido (Etapa3), adicionar el bioconjugado QD-Sav. Finalmente, se adquiere la señal electroquímica tras la digestión en medio ácido (Etapa 4-5-6), que es directamente proporcional a la concentración de cTnI presente en la muestra.

Los resultados preliminares mostraron la existencia de dosis-dependencia, de tal forma que la respuesta obtenida en cada caso se ajustaba a una curva logarítmica de 4-parámetros (véase Figura 4.38).

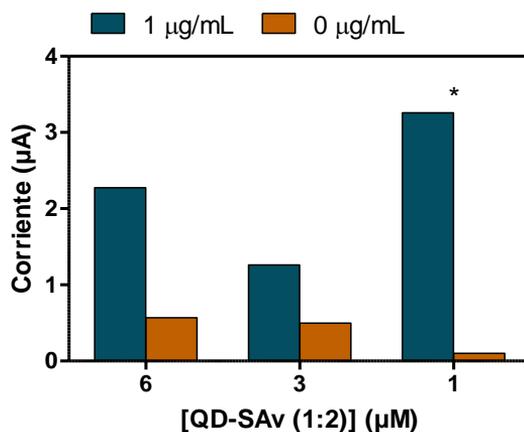
Los resultados preliminares muestran como mediante el uso de estos QD la detectabilidad del ensayo, respecto a la obtenida por ELISA, es un orden de magnitud menor. En comparación con los resultados obtenidos anteriormente, podemos decir que en este caso no se alcanza la detectabilidad esperada mediante la amplificación producida por el Cd<sup>2+</sup>, obteniendo un límite de detección comparable al del inmunosensor amperométrico, pero con un tiempo de ensayo en este caso superior.



**Figura 4.38.** Resultados preliminares de la curva de calibrado para la detección de cTnI mediante inmunosensor electroquímico basado en conjugados de QDs-Sav. Los resultados mostrados hacen referencia a la concentración de Cd presente para cada punto, a su vez directamente proporcional a la cantidad de cTnI presente en la muestra. Resultados referentes a un sólo día y una sola réplica por punto.

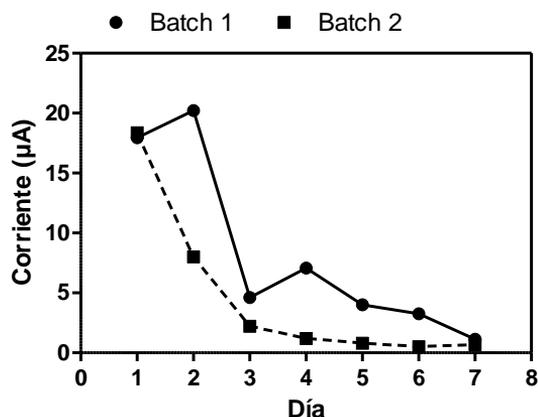
Con el finalidad de reproducir los resultados obtenidos, nos encontramos con diferentes problemas que conciernen estos QDs y que a continuación se detallan,

- La cantidad de conjugado QD-Sav  $1 \mu M$  utilizada en cada ensayo era muy elevada, ya que para la obtención de una señal significativamente diferente del cero, debíamos trabajar sin realizar ningún tipo de dilución previa del bioconjugado QD-Sav. Por este motivo, un último batch de QDs fue preparado por el Prof. Wolfgang J. Parak y colaboradores pero esta vez a una concentración de stock más concentrada, de  $6 \mu M$ .
- Tras la preparación y evaluación electroquímica de diferentes bioconjugados con este nuevo batch de nanopartículas, se observó una pérdida de la actividad electroquímica de los QD con el tiempo. El stock de  $6 \mu M$  de QDs fue perdiendo actividad electroquímica con el tiempo. De tal forma que para alcanzar una señal comparable a la mostrada anteriormente, donde se trabajaba a una concentración de bioconjugado de  $1 \mu M$ , ahora se tenía que trabajar a  $6 \mu M$ , tal y como se muestra en la Figura 4.39.



**Figura 4.39.** Evaluación de la relación señal/ruido con los nuevos bioconjugados QD-SAv (1:2) a una concentración de 6 y 3  $\mu\text{M}$ . En todos los casos se trabajó a una concentración de  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$  de MP-pAb220 y a una concentración de  $2 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de pAb221-Biotina. (\*) Se muestra la comparación con el resultado obtenido para el mismo tipo de bioconjugado preparado anteriormente a una concentración de  $1 \text{ }\mu\text{M}$ .

Por este motivo se decidió evaluar la respuesta electroquímica de este nuevo batch de QD, junto con un batch anterior sin conjugar, con el tiempo (véase Figura 4.40) para así confirmar esta pérdida de actividad electroquímica.

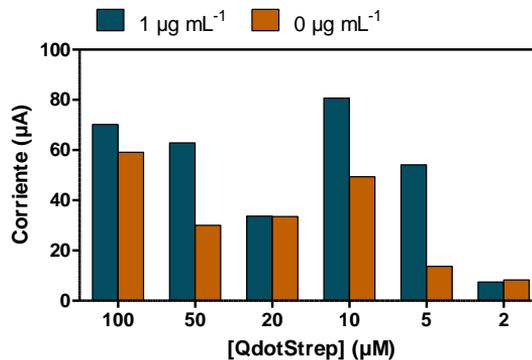


**Figura 4.40.** Evaluación de la respuesta electroquímica de dos batches diferentes de QD (B20160402 y B20160923) a lo largo de 7 días diferentes. En todos los casos la concentración de QD es de  $1 \text{ }\mu\text{M}$ . La respuesta electroquímica se obtiene tras aplicar un potencial de deposición de  $-1.2 \text{ V}$  durante  $180 \text{ s}$ , y tras el paso previo de digestión en medio ácido  $0.5 \text{ M HCl}$  durante  $5 \text{ minutos}$ .

Tras la observación de esta pérdida de actividad electroquímica de los propios QDs sin conjugar con el paso del tiempo, y la falta de reproducibilidad tanto en las diferentes conjugaciones así como ensayos realizados, se decidió dado el poco tiempo del que se disponía, establecer un inmunosensor electroquímico con las mismas características, pero haciendo uso de un conjugado comercial QD-Estreptavidina (QdotStrep585, Molecular Probes).

#### 4.2.9 Desarrollo de un inmunosensor voltamperométrico basado en bioconjugados de QdotStrep comerciales

Dada la experiencia adquirida anteriormente se decidió inicialmente evaluar la respuesta específica del bioconjugado QdotStrep. Para esto se evaluó la respuesta del sensor a diferentes concentraciones del bioconjugado QdotStrep y a dos niveles de cTnI de 1 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con las concentraciones de MP-pAb220 y pAb221-Biotina ya establecidas anteriormente. Se observó (Figura 4.41) una elevada adsorción inespecífica en la mayoría de los casos, debida principalmente a los bioconjugados QdotStrep, puesto que este fenómeno no se observaba en ausencia de cTnI cuando trabajamos con el ensayo colorimétrico, descartando que se tratara del anticuerpo pAb221-B.



**Figura 4.41.** Evaluación de la relación señal/ruido para el inmunosensor de la cTnI mediante el estudio de diferentes concentraciones del bioconjugado comercial QdotStrep 585. Para todos los casos se trabajó a concentraciones de bioconjugados de, MP-pAb220 0.8  $\text{mg mL}^{-1}$ , pAb221-Biotina 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La adquisición de la señal se realizó tras la digestión de los QdotStrept en medio HCl 1 M 5 minutos.

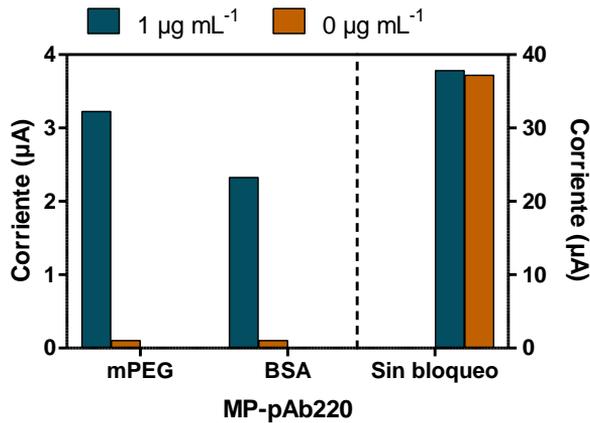
A pesar de esto, fue la concentración de 5 nM de QdotStrep la que mostraba mejor relación señal/ruido, escogiéndose para futuros ensayos de optimización.

Seguidamente, y con la finalidad de disminuir el ruido de fondo, se plantearon 4 estrategias básicas,

- i. Evaluar el efecto de la fuerza iónica en el tampón de adición e incubación de los QdotStrep
- ii. Evaluar el efecto de los aditivos como la BSA, gelatina y caseína en la etapa de incubación de los QdotStrep
- iii. Evaluar el efecto de la adición de una etapa de bloqueo con BSA, gelatina y caseína, previamente a la adición de los QdotStrep
- iv. Evaluar diferentes estrategias de bloqueo de los sitios activos de las MPs durante el proceso de bioconjugación al anticuerpo pAb220

De todas las estrategias propuestas, tan solo se observó un efecto positivo en cuanto a la disminución de la adsorción inespecífica de los QdotStrep mediante la evaluación de diferentes agentes de bloqueo sobre las partículas magnéticas una vez conjugado el anticuerpo pAb220. A pesar de que el protocolo de preparación de este tipo de bioconjugados inicialmente no contemplaba una etapa de bloqueo, en determinadas ocasiones es recomendable incorporar alguna proteína o bien alguna molécula capaz de bloquear los sitios activos de la partícula y que no han sido ocupados por los anticuerpos, con el fin de minimizar interacciones inespecíficas no deseadas. De esta forma, se prepararon dos tipos de bioconjugados, uno bloqueado con BSA al 0.5 % y otro bloqueado con un derivado del polietilenglicol, metil-(PEG)<sub>6</sub>-Amino, de 6 subunidades con un grupo amino en un extremo y un grupo metilo en el extremo opuesto. De esta forma se estudió el efecto que tenía realizar el bloqueo de los sitios activos de la partícula, con una proteína y con una molécula más pequeña e hidrofílica como es el PEG. La preparación de los bioconjugados MP-pAb220<sub>BSA</sub> y MP-pAb220<sub>mPEG</sub> se detalla en la sección 6.4.5, página 197. Una vez preparados los bioconjugados, se caracterizaron mediante la evaluación del anticuerpo no conjugado a las MPs por ensayo Bradford cualitativo (sección 6.3, pág. 189) se determinó que ambos conjugados tenían un rendimiento de conjugación del 98%. Seguidamente, se procedió a la evaluación de la relación señal/ruido mediante inmunoensayo electroquímico (sección 6.7.2, pág. 222).

Tal y como puede apreciarse en la Figura 4.42, los bioconjugados nuevos no presentaron ningún tipo de adsorción inespecífica, aunque una corriente en presencia de cTnI inferior a 1  $\mu\text{A}$ . No obstante, para ambos bioconjugados, la relación señal/ruido fue mejor (7 para el bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub> y 4 para el MP-pAb220<sub>BSA</sub>), que en cualquiera de los casos anteriores.



**Figura 4.42.** Respuesta electroquímica a dos niveles de cTnI para los bioconjugados de MP-pAb220 bloqueados con BSA y m(PEG)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> (eje de ordenadas izquierdo), y también sin bloqueo alguno (eje de ordenadas derecho). En todos los casos se trabajó a una concentración de MP-pAb220 de 0.4 mg mL<sup>-1</sup>, una concentración de pAb221-Biotina de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y una concentración de QdotStrep de 5 nM.

De este modo se decidió trabajar con el bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub>, ya que la relación señal/ruido fue algo mejor que en el caso de los bioconjugados bloqueados con BSA.

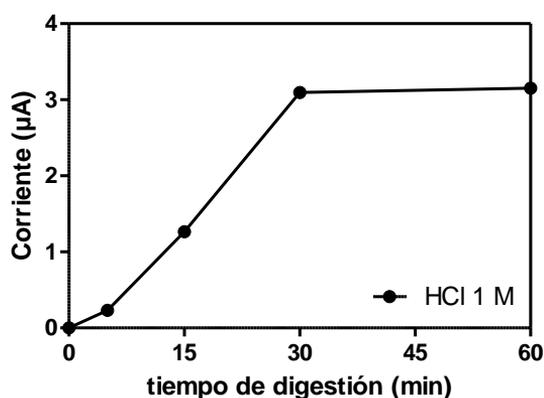
Con el fin de incrementar la señal electroquímica del inmunosensor, se plantearon dos estrategias,

1. Optimizar el tiempo de digestión en medio ácido para la liberación de iones Cd<sup>2+</sup>
2. Incrementar el potencial de deposición de -1.2 a -1.4 V

#### 4.2.9.1 Optimización de la liberación de iones Cd<sup>2+</sup>

Se optimizó de nuevo el paso de liberación de los cationes de Cd<sup>2+</sup>. Para esto, en esta ocasión se evaluaron diferentes tiempos de digestión trabajando a una

concentración constante de HCl de 1 M. Tal y como muestran los resultados (Figura 4.43), a partir de 30 minutos de digestión, la cantidad de cadmio liberado es la misma, de tal forma que por mucho que incrementemos el tiempo de digestión, la cantidad de cadmio liberada es constante, por lo que podemos asegurar que con 30 minutos de digestión en presencia de HCl 1M, todo el cadmio presente en los QdotStrep, es liberado. A la vista de estos resultados, se escogió un tiempo de digestión de 30 minutos para el desarrollo del inmunosensor.



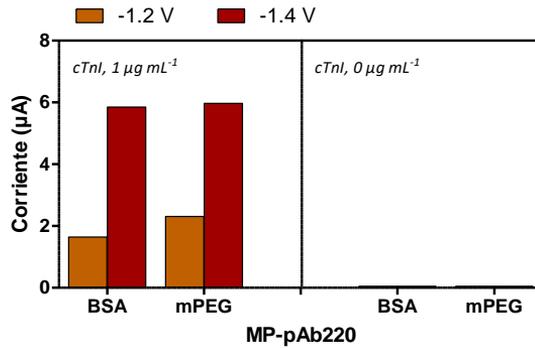
**Figura 4.43.** Evaluación de diferentes tiempos de digestión para la liberación de los iones de cadmio en presencia de HCl 1 M. Los resultados mostrados hacen referencia a la digestión de 10 µL de conjugado QdotStrep a una concentración de 5 nM. Resultados obtenidos tras SWV a un potencial de deposición de -1.2 V durante 120 s.

#### 4.2.9.2 Optimización del potencial de reducción

El segundo paso realizado con el fin de incrementar la señal obtenida en el inmunosensor en presencia de cTnI, fue la evaluación del efecto del incremento del potencial de reducción de -1.2 a -1.4 V. Con esto se pretendía incrementar la efectividad en el paso de deposición del Cd(II) sobre la superficie del sensor.

Con este fin, se realizó un experimento en el cual a dos valores de cTnI de, 1 y 0 µg mL<sup>-1</sup> y a una concentración fija del resto de inmunorreactivos, se valoró la relación señal/ruido en ambas condiciones de deposición y con ambos bioconjugados MP-pAb220, preparados anteriormente. Los resultados (Figura

4.44) mostraron un incremento de la corriente en presencia de cTnI al aumentar el potencial de deposición sin verse comprometida la relación señal/ruido.



**Figura 4.44.** Comparación de la respuesta electroquímica del inmunosensor para la detección de cTnI, tras evaluar el potencial de deposición del Cd<sup>2+</sup> de -1.2 y -1.4 V mediante la realización previa de una etapa de digestión en medio 1 M HCl durante 30 min. En todos los casos, la concentración de bioconjugados MP-pAb220 fue de 0.4 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que de pAb221-B fue de 2 µg mL<sup>-1</sup>, y de QdotStrep de 5 nM.

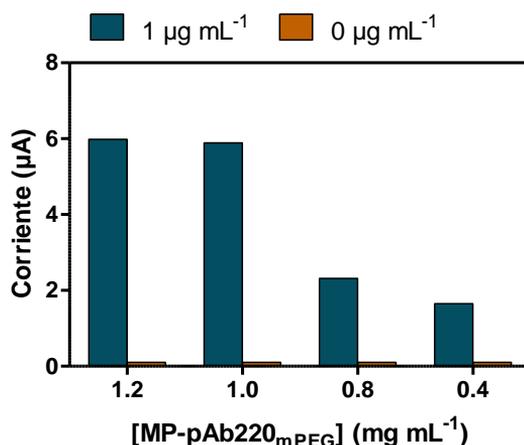
De esta forma se fijaron dos parámetros nuevos a la hora de desarrollar el inmunosensor electroquímico para la detección de cTnI. En primer lugar, el tiempo de digestión de los QdotStrep se fijó a 30 minutos en presencia de HCl 1M, a temperatura ambiente. En segundo lugar, el potencial de deposición se incrementó de -1.2 a -1.4 V.

#### 4.2.9.3 Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos

Una vez optimizadas las condiciones de digestión y deposición del Cd(II) se procedió a realizar diferentes ensayos de optimización de concentraciones tanto de MP-pAb220<sub>mPEG</sub> como de pAb221-B. Se escogió finalmente el bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub> para desarrollar el inmunoensayo, no obstante el bioconjugado MP-pAb220<sub>BSA</sub> a la vista de los resultados, podría haber sido un candidato válido para desarrollar la recta de calibrado.

Los ensayos destinados a la optimización de ambas concentraciones se realizaron siempre valorando los resultados obtenidos tanto en presencia como en ausencia de cTnI, con el fin de poder observar si en algún caso, la relación señal/ruido era muy pequeña. De esta forma, la concentración del bioconjugado

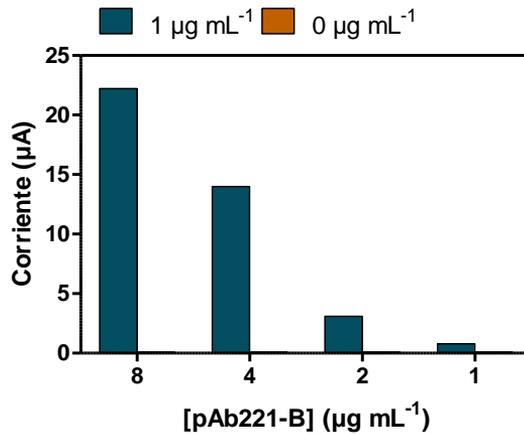
MP-pAb220<sub>mPEG</sub> fue la primera en ser optimizada (Figura 4.45) fijándose a 1.0 mg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 4.45.** Respuesta electroquímica del inmunosensor a diferentes concentraciones del bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub>, 1.2, 1.0, 0.8 y 0.4 mg mL<sup>-1</sup>. En todos los casos se evaluaron dos concentraciones de cTnI y se trabajó a una concentración fija de pAb221-B de 2 µg mL<sup>-1</sup> y QdotStrep585 de 5 nM. En todos los casos el potencial de deposición aplicado fue de -1.4 V durante 180 s, tras realizar la etapa de digestión en medio HCl 1 M durante 30 minutos.

Del mismo modo, manteniendo constante la concentración de MP-pAb220<sub>mPEG</sub> a 1.0 mg mL<sup>-1</sup>, se estableció la concentración óptima del anticuerpo de detección. Para esto se evaluaron diferentes concentraciones de pAb221-B, 8, 4, 2 y 1 µg mL<sup>-1</sup>, y a dos valores de cTnI, incluyendo el 0.

Los resultados (Figura 4.46) muestran como un incremento en la concentración del anticuerpo de detección es capaz de incrementar la señal electroquímica aproximadamente el doble de la que se obtenía anteriormente. Además, es importante remarcar que este incremento de señal específica, ocurre en todo momento sin observarse un incremento del ruido de fondo. El hecho de conseguir mayor señal al incrementar la concentración del anticuerpo pAb221-B pone de manifiesto la importancia del paso de optimización de las diferentes concentraciones de los inmunorreactivos en el desarrollo de este inmunosensor.

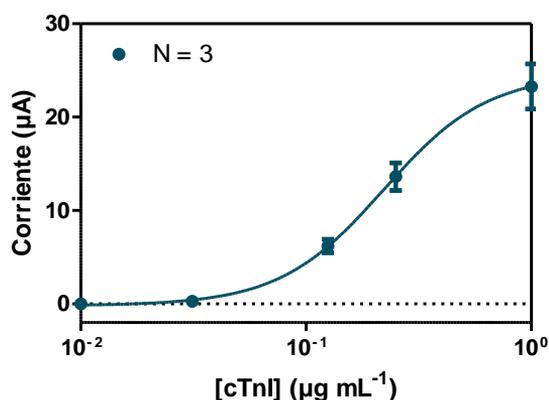


**Figura 4.46.** Respuesta electroquímica del inmunosensor a diferentes concentraciones del bioconjugado pAb221-Biotina, 8, 4, 2 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En todos los casos se evaluaron dos concentraciones de cTnI y se trabajó a una concentración fija de MP-pAb220<sub>mPEG</sub> de 1.0  $\text{mg mL}^{-1}$  y QdotStrep de 5 nM. En todos los casos el potencial de deposición aplicado fue de -1.4 V durante 180 s, tras realizar la etapa de digestión en medio HCl 1 M durante 30 minutos.

A la vista de los resultados se decidió desarrollar la curva de calibrado para la detección de cTnI utilizando las concentraciones de MP-pAb220<sub>mPEG</sub> de 1.0  $\text{mg mL}^{-1}$ , y de pAb221-B de 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.2.9.4 Establecimiento de la curva de calibrado para la detección de cTnI

Finalmente, se desarrolló la curva de calibrado para la cTnI en tampón 10 mM PBS-T pH 7.5, según las condiciones de concentración de inmunorreactivos establecidas previamente, evaluándose 5 estándares de cTnI, incluyendo el punto 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (sección 6.7.2, pág. 222). Los resultados se muestran en la Figura 4.47, mientras que los parámetros analíticos correspondientes a este inmunosensor se encuentran en la Tabla 4.14.



**Figura 4.47.** Curva de calibrado para la cTnI desarrollada en el inmunosensor electroquímico basado en el uso de quantum dots conjugados a estreptavidina. El bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub> se utilizó a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que el anticuerpo de detección, pAb221-B a 8 µg mL<sup>-1</sup>. La concentración de QdotStrep utilizada fue de 5 nM. Datos correspondientes al promedio de tres días diferentes. Cada punto se realizó con su correspondiente dúplica.

**Tabla 4.14.** Parámetros analíticos de la curva de calibrado para la cTnI en 10 mM PBS-T pH 7.5 en el inmunosensor electroquímico.

Troponina I Cardíaca	
Corriente <sub>máx</sub> (µA)	(23.36 ± 6.55)
Corriente <sub>mín</sub> (µA)	(-0.16 ± 0.08)
Pendiente	(1.97 ± 0.04)
R <sup>2</sup>	(0.99 ± 0.01)
IC50 (µg mL <sup>-1</sup> )	(0.208 ± 0.003)
Rango de trabajo (µg mL <sup>-1</sup> )	(0.102 ± 0.003) - (0.421 ± 0.052)
LOD (µg mL <sup>-1</sup> )	(0.069 ± 0.002)

El inmunoensayo voltamperométrico tipo sándwich utilizó la combinación captura/detección MP-pAb200<sub>mPEG</sub>/pAb221-B. Los datos mostrados se extrajeron después de aplicar un ajuste sigmoide empleando la ecuación de  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la intensidad de corriente máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoide y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. Cada punto corresponde al promedio de ensayos realizados en tres días diferentes. En cada ensayo, cada concentración se midió por duplicado. La curva de calibrado para la cTnI se preparó en 10 mM PBS-T (PBS pH 7.5 0.05 % Tween).

A la vista de los resultados y tras compararlos con aquellos obtenidos mediante inmunoensayo en microplaca ELISA, no se cumplieron las expectativas a la hora de mejorar sustancialmente la detectabilidad para así alcanzar los valores establecidos como el percentil 99 de un grupo de individuos sin cardiopatías previas. Considerando los inmunoensayos de transducción potenciométrica

descritos en la literatura que utilizan QD para la detección de troponina I, cabe destacar que éstos hacen uso de diferentes estrategias de inmovilización de los elementos de biorreconocimiento sobre el propio electrodo o sensor, mediante el uso de diferentes materiales poliméricos y obviando el uso de partículas magnéticas. Tal y como se ha descrito anteriormente, la inmovilización del anticuerpo de captura sobre el material es una etapa crucial, debido a diferentes factores entre ellos la biofuncionalidad del anticuerpo una vez inmovilizado y también su orientación, pudiendo mejorar de forma sustancial los diferentes parámetros analíticos del inmunosensor. No obstante, se ha puesto de manifiesto que en gran parte de los trabajos basados en este principio, el tiempo necesario para la obtención de una respuesta medible es excesivamente alto, considerando el recomendado por las diferentes guías clínicas (30 minutos o menos).

En nuestro caso particular partíamos de una posición muy alejada en términos de detectabilidad, hablamos de conseguir una mejora en 4 órdenes de magnitud. A pesar de esto, se han establecido las bases de trabajo para el desarrollo de una técnica de diagnóstico fiable para la detección de troponina I cardíaca, realizando un amplio estudio de los diferentes fenómenos de adsorción inespecífica y estableciendo soluciones eficaces. En este aspecto, dada la falta de tiempo para explorar nuevas estrategias, cabe destacar que aun es posible mejorar el inmunoensayo desarrollado en términos de tiempo, tal y como se ha demostrado en el desarrollo del inmunosensor amperométrico, y de detectabilidad, mediante la integración de nuevos nanomateriales y técnicas de inmovilización direccionales.

## **5 Conclusiones**

---

### **Troponina I Cardíaca**

- Ha sido posible producir anticuerpos capaces de reconocer la cTnI empleando como inmunógenos tanto toda la proteína como diferentes secuencias peptídicas seleccionadas cuidadosamente en base a criterios químicos y clínicos, y utilizadas como haptenos de inmunización. Esto ha permitido desarrollar técnicas inmunoquímicas tanto ópticas como electroquímicas con un LOD de 29 y 5 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente y que desgraciadamente no cumplen con los requerimientos de las Guías Clínicas que exigen que la detectabilidad alcanzada esté en el percentil 99 de una población sana.
- El uso de caseína y microplacas tipo Immulon™ 2 HB ha permitido reducir sustancialmente la adsorción inespecífica de la cTnI a superficies y biomoléculas. Esta propiedad, junto con la detectabilidad requerida para este biomarcador, han sido los principales retos a resolver a lo largo de este período de investigación.
- El desarrollo de un inmunosensor amperométrico para la detección de cTnI que combina el uso de partículas magnéticas y los anticuerpos producidos contra la cTnI, ha permitido disminuir considerablemente el tiempo de detección de este biomarcador cardíaco, respondiendo a las expectativas de las Guías Clínicas para las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de cTnI. Así pues, mientras que el ELISA precisaba de 2 h para proporcionar un resultado, el inmunosensor desarrollado permite detectarlo en tan solo 30 min.
- El uso de nanopartículas semiconductores de Cd<sup>+2</sup> para el marcaje de anticuerpos u otras proteínas en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la detección de cTnI ha puesto de manifiesto una serie de dificultades derivadas de diferentes fenómenos de adsorción inespecífica, pérdida de actividad electroquímica y la liberación de Cd<sup>+2</sup>, causante directo de la señal inespecífica en todos los formatos evaluados.
- El uso de nanopartículas “core-shell” en el que el núcleo de CdSe se encuentra protegido por una capa de ZnS permite disminuir el efecto derivado de los cationes liberados a la solución.
- La utilización de partículas magnéticas recubiertas con un PEG hidrofílico ha permitido disminuir el alto grado de adsorción inespecífica de las nanopartículas semiconductoras sobre las partículas magnéticas en el inmunosensor electroquímico desarrollado.

### **Lipoproteína (a)**

- Ha sido posible producir anticuerpos policlonales específicos para la apoB100 de la Lp(a) y establecer una técnica inmunoquímica en formato sandwich capaz de detectar esta fracción de la proteína con una detectabilidad de  $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Ha sido posible desarrollar una técnica inmunoquímica para la detección de Lp(a) en suero humano mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti apo(a) comercial combinado con un anticuerpo policlonal anti apoB100 desarrollado en esta tesis, con un LOD de  $0.008 \mu\text{g mL}^{-1}$  en suero.
- El análisis de Lp(a) en muestras clínicas con el ensayo antes mencionado ha puesto en evidencia la importancia en la estandarización y calibrado de los inmunoensayos, así como la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan la cuantificación de Lp(a) sin que ésta se vea afectada por las diferentes isoformas derivadas del número de repeticiones del *kringle* 4 tipo 2, así como de obtener información sobre el contenido de este tipo de *kringles*, dada su conocida correlación con el riesgo de sufrir ECVs.
- Se ha puesto de manifiesto el alto grado de homología existente entre los *kringles* de la apo(a) de la Lp(a) y los del plasminógeno, lo que ha planteado un extraordinario reto a la hora de producir anticuerpos específicos para la apo(a).
- A pesar de la complejidad, la realización de una serie de estudios en profundidad sobre las secuencias peptídicas de los diferentes *kringles*, han permitido diseñar haptenos peptídicos contra el *kringle* 4 tipo 1 y el *kringle* 4 tipo 2, que han servido para generar anticuerpos monoclonales específicos para la apo(a). Su caracterización mediante técnicas tipo ELISA y Western blot han permitido demostrar que estos anticuerpos no reconocen el plasminógeno, lo cual constituía uno de los retos de esta tesis doctoral.
- La aparición en el Western-Blot de bandas pertenecientes tanto a la apo(a) y apoB100, de pesos moleculares a priori inferiores a lo esperable, ha puesto de manifiesto la susceptibilidad de la Lp(a) a la degradación y/o oxidación.
- Los estudios inmunoquímicos realizados para detectar la Lp(a) indican un elevado grado de asociación entre la apoB100 y la apo(a), lo cual explicaría el hecho de que los *kringles* de la apo(a) tan solo se detecten en condiciones desnaturalizantes con los anticuerpos generados. Tal como comentan otros

autores, la apo(a) se encontraría total o parcialmente rodeando a la apoB100, eclipsando de esta forma los epítomos hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos anti-k4.1 y k4.2 generados.

## **6 Materiales y Métodos**

---

## 6.1 Tampones

Se describen los tampones comunes de todos los protocolos y métodos descritos en este capítulo. En cada sección se detallan los tampones específicos para el protocolo descrito. Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

PBS es tampón fosfato 10 mM con una disolución salina al 0.8% (137 mM en NaCl, 2.7 mM KCl), pH 7.5. PBST, es PBS con 0.05% Tween 20. Tampón Borato, 0.25 M ácido bórico/borato sódico, pH 8.7. Tampón MES es 0.1 M en ácido 2-morfolino etano sulfónico a pH 5.0. Tampón carbonato/bicarbonato es  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  0.05 M pH 9.6. Tampón citrato es 0.04 M en citrato de sodio a pH 5.5. La solución de sustrato contiene 0.01% en 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y 0.004% en  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 6.2 Equipos

Se describen los distintos equipos comunes utilizados en los diferentes protocolos y métodos descritos en este capítulo.

El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midió mediante pH-metro 540 GLP y conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Germany).

Las microplacas de poliestireno, no tratadas y los tubos de centrifuga tipo eppendorf de 2 mL se adquirieron de Daslab (Barcelona, España). Las microplacas de poliestireno MaxiSorp se adquirieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca). Los tubos de centrifuga de 50 mL Falcon, se adquirieron de VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, España).

Las diferentes etapas de lavado se realizaron con un lavador de placas automático Elx405, de BioTek Instruments (Winooski, USA).

Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrifuga fue adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

La absorbancia en cada caso se adquirió por espectrofotómetro Multiskan GO UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA).

El equipo de purificación de cromatografía de media presión, AKTA prime plus se adquirió de (GE HealthCare, Little Chalfont, UK).

### 6.3 Procedimientos Generales

El reactivo Bradford se adquirió de Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA).

- **Test de Bradford cualitativo**

Se mezclaron 8  $\mu\text{L}$  de cada alícuota recogida tras la purificación por cromatografía de exclusión molecular, con 2  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford. Aquellas gotas que cambiaron de color del rojo al azul indicaban presencia de proteína. De esta forma, se juntaron las alícuotas que dieron positivo y se utilizaron para la conjugación al péptido correspondiente.

- **Test de Bradford cuantitativo**

La recta de calibrado se preparó con el mismo tipo de proteína que se pretendía cuantificar, empezando a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS 10 mM. La recta de calibrado así como las muestras, se añadieron a una microplaca no tratada de 96 pocillos (320  $\mu\text{L}$ /pocillo) por duplicado, y se realizaron diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ , dejando en cada pocillo un volumen final de 160  $\mu\text{L}$ . Seguidamente se añadió el reactivo Bradford (40  $\mu\text{L}$ /pocillo). Finalmente, transcurridos 5 minutos, se adquirió el valor de la absorbancia de cada pocillo a 595 nm.

## 6.4 Preparación de Inmunorreactivos

### 6.4.1 Preparación de inmunógenos y antígenos de tapizado

#### Reactivos e inmunorreactivos

Todos los péptidos descritos y utilizados para la preparación de inmunorreactivos fueron facilitados por la Dra. Miriam Royo (UQC, PCB). La hemocianina de cangrejo herradura (HCH), albúmina de suero bovino (BSA), cisteína (Cys) y el ácido 3-(4-hidroxi-3,5-dimetóxfenil)prop-2-enóico (ácido sinapínico) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri). Sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) se obtuvo de Pierce (Rockford, Illinois), N,N-dimetilformamida (DMF) de Sharlau (Barcelona, España) y el acetonitrilo (ACN) de FisherSci (Leicestershire, UK).

#### Instrumentos y equipos

Bruker Autoflex Smartbeam-II (Bruker, Kalsruhe, Germany) equipo de MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer), fue utilizado para caracterizar los bioconjugados péptido-proteína.

#### Procedimiento Experimental

Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA, Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH, BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct, HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct, (relación molar Lys:sulfo-SMCC:péptido, 3:1:1)

Una disolución de sulfo-SMCC (0.38 mg) en 10 mM PBS pH 7.5 (100  $\mu$ L) se añadió gota a gota sobre cada disolución de proteína (HCH o BSA, 12 mg cada una) en PBS (900  $\mu$ L). La mezcla se dejó a temperatura ambiente (RT) durante 2 h bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, la proteína activada se purificó por cromatografía de exclusión molecular mediante el uso de columnas tipo HiTrap desalting Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), utilizando PBS como eluyente. El procedimiento de purificación por exclusión molecular se usó teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. Las fracciones eluidas (500  $\mu$ L) que dieron positivo en el test cualitativo de Bradford (Sección 6.3), fueron recogidas. Una parte de la disolución purificada (5  $\mu$ L) se reservó para

caracterizar el conjugado por espectrometría de MALDI-TOF (descrito más adelante).

Cada péptido (0.44  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en una mezcla 50:50 de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (100  $\mu\text{L}$ ) y se añadió gota a gota sobre la disolución de proteína activada (6 mg, 2 mL), bajo agitación suave. La mezcla se dejó bajo agitación durante 16 h a 4  $^\circ\text{C}$ . El bloqueo de los grupos maleimido que no reaccionaron tras la conjugación, se realizó mediante la adición de una disolución de Cys-HCl (35.7 mM, 350  $\mu\text{L}$ ) y durante 2 h a RT bajo agitación suave. Finalmente, los bioconjugados se purificaron por diálisis con PBS 0.5 mM (4x 5L) y agua ultrapura (1x 5L), liofilizados y guardados a -20  $^\circ\text{C}$ .

### Caracterización por MALDI-TOF MS

Las densidades de haptenos para cada bioconjugado se obtuvieron mediante la medida del peso molecular de cada bioconjugado. De esta forma, el espectro de masas se obtuvo por cristalización de la correspondiente matriz (ácido sinapínico, 2  $\mu\text{L}$  de 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  en una disolución 70:30 de  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  y 0.1% en  $\text{HCOOH}$ ), seguido de 2  $\mu\text{L}$  de muestra tomada después de cada paso de bioconjugación, o bien 2  $\mu\text{L}$  de la muestra de referencia (BSA, 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  en 50:50 de  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  y 0.1% en  $\text{HCOOH}$ ). Finalmente, tras la evaporación de la disolución depositada sobre la placa, se volvieron a adicionar 2  $\mu\text{L}$  de la matriz. La densidad peptídica ( $\delta$ ) se calculó siguiendo la siguiente ecuación:  $(\text{MW}_{\text{bioconjugado}} - \text{MW}_{\text{proteína}}) / \text{MW}_{\text{péptido}}$ . Los resultados para cada caso se muestran en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Densidades tanto de brazo espaciador como de péptido de la BSA para cada conjugado.

Bioconjugado	$\delta$ (SMCC)	$\delta$ (péptido)	Rendimiento (%)
Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA	8	3	62
BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct	8	3	60

## 6.4.2 Producción de anticuerpos policlonales

### Reactivos e inmunoreactivos

La apolipoproteína B-100 se adquirió de Abcam (Cambridge, UK). Adyuvante de Freund completo e incompleto se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

### **Procedimiento experimental**

- **Inmunización y obtención de los antisueros**

Para cada inmunógeno se hicieron servir tres conejos hembra blancos de la variedad New Zealand con un peso cercano a los 1-2 Kg. Para cada uno de los conejos, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de inmunógeno a una concentración de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  en PBS, llevándose a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  en PBS (100  $\mu\text{g}$  de inmunógeno por animal). La disolución resultante se emulsionó con un volumen igual de adyuvante de Freund completo. La emulsión resultante se inoculó mediante 10 pequeñas inyecciones subcutáneas a ambos lados de la espina dorsal (1 mL por conejo). Transcurrido un mes, se repitió el proceso de estimulación del sistema inmune del animal mediante la inoculación de 100  $\mu\text{g}$  de inmunógeno emulsionado con adyuvante de Freund incompleto. Las inoculaciones se repitieron cada cuatro semanas aproximadamente mediante el uso de adyuvante de Freund incompleto.

- **Purificación de anticuerpos policlonales por sulfato de amonio**

Los anticuerpos policlonales se aislaron la mayor parte de las IgGs presentes en el antisuero mediante la precipitación por adición en baño de hielo de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado hasta una concentración final del 40%. El precipitado se conservó a 4 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se retiró el sobrenadante previo paso de centrifugación (4 °C, 10000 x g 10 min). Seguidamente, el precipitado se resuspendió en PBS 10 mM a un volumen final correspondiente a la mitad del volumen inicial del antisuero.

- **Purificación de anticuerpos policlonales por cromatografía de afinidad de Proteína A**

Los anticuerpos, previo paso de purificación por sulfato de amonio, se purificaron por cromatografía de exclusión molecular mediante el uso de columnas tipo HiTrap desalting Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), utilizando PBS como

eluyente. Las fracciones eluidas (500  $\mu$ L) que dieron positivo tras realización de test de Bradford cualitativo (Sección 6.3), fueron juntadas en tubo tipo eppendorf. Seguidamente, las IgGs se aislaron por medio de cromatografía de afinidad por Proteína A (columnas de 1 ml HiTrap, Amersham Pharmacia Biotech). Los anticuerpos se eluyeron mediante tampón Gly-HCl 50 mM pH 2.7, cada fracción (500  $\mu$ L) se recogió sobre 20  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 1 M con el fin de que el anticuerpo se encontrara en un medio de pH lo más neutro posible. Las fracciones eluidas que dieron positivo tras realización de test de Bradford cualitativo, fueron recogidas en tubo tipo eppendorf. Finalmente, se realizó un cambio de medio a PBS mediante paso por columna Desalting Hitrap de 5 mL, y aquellas fracciones que dieron positivo en test Bradford cualitativo se juntaron de nuevo. La concentración de anticuerpo se estableció mediante ensayo Bradford Cuantitativo (Sección 6.3).

### 6.4.3 Producción de anticuerpos monoclonales

#### Reactivos e inmunoreactivos

Los inmunorreactivos utilizados fueron, los inmunógenos preparados en la Sección 6.4.1. El adyuvante de Freud completo e incompleto, se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

#### Procedimiento experimental

La tecnología de producción de mAbs utilizada se basa en la descrita por Georges Köhler y César Milstein en 1975<sup>249</sup>.

A continuación se describe la metodología de producción de mAbs, mediante las siguientes etapas:

- **Inmunización de ratones**

Ratones BALB/c hembra de entre 8 y 10 semanas de edad fueron inmunizados mediante inyección intraperitoneal con los distintos inmunógenos. En la primera dosis se administraron 200  $\mu$ L de una emulsión 1:1 (v/v) de adyuvante completo de Freund y de 100  $\mu$ g de inmunógeno disuelto en PBS cada 3 semanas, los ratones recibieron un mínimo de dos inmunizaciones adicionales, salvo indicación expresa, en estos casos emulsionando los conjugados con adyuvante

de Freund incompleto. A partir de la segunda inmunización, y diez días después de cada inmunización, se extrajo una muestra de sangre de los ratones inmunizados mediante sangrado submandibular para evaluar el título de la sangre. Transcurridas 3 semanas desde la última dosis, se les administró 100 µg de conjugado en 200 µl de PBS 4 días antes de la fusión celular.

- **Fusión celular**

El procedimiento seguido en la fusión celular fue semejante al descrito por Nowinsky *et al.*<sup>250</sup>. La línea celular del mieloma de ratón P3-X63/Ag 8.653 (ATCC, Rockville, MD) se cultivó en medio DMEM suplementado con glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales 1 mM, gentamicina (25 µg/ml), y suero bovino fetal (15%), (s-DMEM). Las células de mieloma cultivadas en placas Petri y en fase exponencial de crecimiento, se recogieron y lavaron 2 veces con medio s-DMEM sin suero

Los linfocitos B se obtuvieron por homogeneización del bazo del animal inmunizado. Tras lisar los glóbulos rojos por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis eritrocitos (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) los linfocitos se lavaron tres veces con s-DMEM, siendo el último lavado con medio exento de suero.

Las 2 poblaciones celulares así obtenidas se mezclaron en una proporción 4:1 (linfocito:mieloma) y se fusionaron mediante la adición de 1.0 mL de PEG 1500. Al cabo de 1 minuto, la mezcla celular se diluyó lentamente con s-DMEM y se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo, sembrando 100 µl por pocillo. Un día después, a cada pocillo se añadieron 100 µl de medio de selección HAT (medio s-DMEM suplementado con 100 mM hipoxantina, 0.4 mM aminopterina y 16 mM timidina).

- **Selección de hibridomas y clonación**

Aproximadamente a los 10-12 días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante ensayo ELISA indirecto no competitivo (Sección 6.6.2), para detectar la presencia de anticuerpos. Los hibridomas seleccionados se clonaron siguiendo el procedimiento denominado de dilución límite. La clonación se efectuó a densidades celulares de 10 y 2 células/pocillo. Una vez los cultivos mostraron un crecimiento celular aceptable, los sobrenadantes se ensayaron de nuevo mediante ELISA. Se realizaron un mínimo de 2 clonaciones hasta estar seguros de que los hibridoma estaban totalmente clonados.

Una vez identificado el clon, se procedió a su expansión, que consiste en obtener un mayor número de células. Llegados a este punto las células se congelan y se almacenan en nitrógeno líquido, y el medio de cultivo se emplea como fuente de anticuerpos. El proceso de producción se siguió mediante la cuantificación de los anticuerpos presentes en el medio de cultivo mediante ensayo ELISA sándwich de cuantificación (Sección 6.6.3). Una vez obtenida la cantidad de anticuerpo necesaria, se procedió al aislamiento y purificación de éstos.

- **Purificación de anticuerpos monoclonales por sulfato de amonio**

Los anticuerpos se purificaron directamente a partir de los sobrenadantes de cultivo (100-200 ml). Inicialmente se realizó una precipitación salina de los sobrenadantes mediante la adición de una disolución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado (1:1, v/v) en baño de hielo y bajo agitación constante. La suspensión así obtenida se centrifugó durante 30 minutos a 1500 x g. El precipitado obtenido se redisolvió en PBS 10 mM.

- **Purificación de anticuerpos monoclonales por cromatografía de afinidad de Proteína G**

Tras la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , los anticuerpos monoclonales se purificaron por cromatografía de afinidad sobre proteína-G Sepharose (columnas de 5 ml HiTrap de Amersham Pharmacia Biotech) mediante sistema de cromatografía AKTA prime plus (GE HealthCare, Little Chalfont, UK). Tras el paso de elución con tampón Gly-HCl 50 mM pH 2.7, los anticuerpos se recogieron sobre una mezcla de PBS 100 mM y NaOH 5N. Aquellas alícuotas que contenían anticuerpo se juntaron y finalmente se cuantificó la concentración de cada mAb mediante ensayo ELISA de cuantificación formato sándwich (Sección 6.6.3).

#### **6.4.4 Protocolo de biotinización de anticuerpos. Evaluación y caracterización**

##### **Reactivos e inmunorreactivos**

Anticuerpo policlonal AD3 proporcionado por AUDIT Diagnostics (Cork, Irlanda).  
Anticuerpos policlonales y monoclonales producidos en esta tesis (Sección 6.4.2)

y 6.4.3). EZ-link sulfo-NHS-LC-LC-Biotina y la Avidina fue adquirida de Pierce (Rockford, Illinois). El ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzoico (HABA) fue adquirido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

### **Procedimiento experimental**

- **Biotinillización de anticuerpos**

Se trabajó a un exceso molar de 20:1 biotina/anticuerpo, recomendado para una cantidad de proteína de 2 mg, según fabricante. De esta forma se disolvieron 2 mg de IgG en 1 mL de PBS. Se preparó una disolución 10 mM de EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-Biotina (3.35 mg/500  $\mu$ L) en H<sub>2</sub>O Ultrapura. Se añadieron gota a gota y bajo agitación, 27  $\mu$ L de esta disolución de biotina, sobre la disolución de IgG a 2 mg mL<sup>-1</sup>. La mezcla se mantuvo bajo agitación suave y a RT durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, los bioconjugados se purificaron por diálisis con PBS 0.5 mM (4x 5L) y H<sub>2</sub>O Ultrapura (1x 5L). Se conservaron 50  $\mu$ L de cada bioconjugado para su caracterización y finalmente fueron liofilizados y guardados a -20 °C. Se conservaron alícuotas de trabajo a 4 °C.

- **Caracterización de los bioconjugados Ab-Biotina por ensayo HABA**

La relación final biotina/anticuerpo se estableció mediante ensayo HABA. Para esto, se preparó una disolución de ácido 2-(4-hidroxifenilazo) benzóico (HABA) 10 mM disolviendo 4.84 mg de HABA en 1980  $\mu$ L de agua Ultrapura y 20  $\mu$ L de NaOH 1 M. Seguidamente, se preparó una disolución HABA/Avidina, para esto se disolvieron 2.5 mg de Avidina en una disolución 0.3 mM de HABA (150  $\mu$ L HABA 10 mM en 5 mL de PBS).

En una microplaca de poliestireno no tratada, se sembraron 180  $\mu$ L de la disolución HABA/Avidina en tantos pocillos como muestras se tenían y un blanco, cada muestra y el blanco con su correspondiente dúplica. Se realizó la medida de todos los pocillos a una longitud de onda de 500 nm ( $A_{500}$  H/A). La microplaca se agitó justo antes de realizar la medida. Seguidamente, se añadieron 20  $\mu$ L de cada muestra a un pocillo que contuviera 180  $\mu$ L de HABA/Avidina. De nuevo se registró la absorbancia a 500 nm previa agitación ( $A_{500}$  H/A/B). Finalmente se estableció la relación biotina/anticuerpo según los cálculos que a continuación se detallan,

$$mmol \text{ de } Ab/mL = \frac{[Ab](mg/mL)}{MW \text{ Ab } (mg/mmol)} \quad (1)$$

$$\Delta A_{500} = (A_{500H/A}) - (A_{500H/A/B}) \quad (2)$$

$$\frac{mmoles \text{ de biotina}}{mL \text{ de mezcla de reacción}} = \frac{(2)}{(34000 \times b)} \quad (3)$$

Siendo  $b$  el camino óptico, aplicando un valor de 0.5 para las medidas en microplaca.

$$\frac{mmol \text{ biotina}}{mmol \text{ Ab}} = \frac{(3) \times 10}{(1)} \quad (4)$$

Siendo 10 el factor de dilución realizado sobre la disolución original preparada de biotina. Para todos los anticuerpos se incorporaron entre 3 y 4 restos de biotina por anticuerpo.

#### 6.4.5 Protocolo de biofuncionalización de partículas magnéticas con anticuerpos. Evaluación y caracterización.

En esta sección se describen los diferentes protocolos seguidos a la hora de biofuncionalizar las diferentes partículas magnéticas utilizadas en esta tesis con anticuerpos.

##### Partículas magnéticas

Las partículas magnéticas Dynabeads MyOne funcionalizadas con grupos *p*-Toluensulfonilo ( $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ ) se adquirieron de Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Las partículas magnéticas Sera-Mag ( $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ ) se adquirieron de GE Healthcare (Little Chalfont, UK), mientras que las partículas magnéticas Estapor Sera-Mag ( $\varnothing = 0.7\text{-}1.3 \mu\text{m}$ ) de Merk (Darmstadt, Alemania). Las partículas magnéticas SiMAG-Carboxyl ( $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ ) y fluidMAG-CMX ( $\varnothing = 0.2 \mu\text{m}$ ), se adquirieron en Chemicell (Berlín, Alemania). El mPEG-NH<sub>2</sub> con 6 subunidades de PEG, fue adquirido de Polypure AS (Gaustadallee, Noruega).

##### Tampones y disoluciones

Tampón de bloqueo es PBST 0.5 % en BSA. Tampón de conservación es tampón PBST con un 0.1% de BSA. Tampón Borato, 0.1 M ácido bórico/borato sódico, pH 9.5. Tampón MES 0.1 M a pH 5.0, tampón MES 0.05 M pH 6.0. Tampón 3 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### **Instrumentos y equipos**

Las microplacas de poliestireno, no tratadas y los tubos de centrifuga tipo eppendorf de 2 mL, se adquirieron de Daslab (Barcelona, España). Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrifuga adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

### **Procedimiento experimental**

- **Partículas Magnéticas Dynabeads MyOne**

Se conjugaron 0.4 mg de Ab a 10 mg de MP, para esto se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del stock de MP, y tras realizar tres lavados en tampón Borato 0.1 M, se descartó el sobrenadante mediante separación magnética y se resuspendieron las MP en 200  $\mu\text{L}$  de Ab (2 mg/mL) y seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de tampón  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 M. Se incubó la mezcla a RT durante 48 h bajo agitación 750-800 rpm. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con tampón Borato 0.1 M. Las alícuotas se conservaron para cuantificar el rendimiento de conjugación mediante test Bradford cuantitativo (Sección 6.3). Seguidamente el bioconjugado se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de tampón PBST 0.5% BSA y 100  $\mu\text{L}$  de tampón  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 M. Se incubó 24 h a RT bajo agitación 750-800 rpm. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el bioconjugado en tampón PBST 0.1% BSA. 250  $\mu\text{L}$ , conservándose a 4 °C hasta su uso. La concentración de MP final fue de 40 mg mL<sup>-1</sup>.

- **Partículas Magnéticas Sera-Mag HealthCare**

Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de MP Sera-Mag (10 mg) del stock y se realizaron 3 lavados en tampón MES 50 mM pH 6.0. Seguidamente y tras retirar el sobrenadante, las MPs se resuspendieron en 1 mL de 12.5 mM en EDC y 100 mM NHS en tampón MES 50 mM. Las partículas magnéticas se incubaron en este medio durante 30

min a RT bajo agitación 750-800 rpm. Transcurrido ese tiempo, las MP activadas se lavaron 3 veces con tampón MES, y tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de una disolución de Ab  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  preparada en MES 50 mM. Se incubó a temperatura ambiente 60 min, 750 rpm. Seguidamente se retiró el sobrenadante y se conservó para cuantificar el rendimiento de la conjugación por test Bradford cuantitativo. El bioconjugado se resuspendió en 1 mL de tampón MES 50 mM 0.5% mPEG-NH<sub>2</sub>, 2 h, 750 rpm. Finalmente, se intercambió el tampón, resuspendiendo el bioconjugado en 250  $\mu\text{L}$  de tampón PBS 10 mM 0.2 % PEG 6000, conservándose a 4°C hasta su uso. La concentración final de MP fue de  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ .

- **Partículas Magnéticas Sera-Mag Estapor**

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  (10 mg de MP) del stock de MP y se realizaron 2 lavados en medio HCl 2mM. Tras retirar el sobrenadante, las partículas magnéticas se resuspendieron en una disolución 25 mg EDC/ 15 mg NHS en 2.5 mL de tampón PBS 10 mM y se incubaron durante 15 min, 750-800 rpm. Transcurrido ese tiempo, las MP activadas se lavaron 3 veces con tampón PBS 10 mM y seguidamente, se retiró el sobrenadante. De nuevo, las MP se resuspendieron en una disolución de Ab  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  en PBS 10 mM, y se incubaron a temperatura ambiente 2 h, 750 rpm. Una vez pasadas las 2 h se retiró el sobrenadante y se conservó para cuantificar el rendimiento de la conjugación por test Bradford cuantitativo. El bioconjugado se resuspendió en 1 mL de tampón PBS 10 mM 0.5% mPEG-NH<sub>2</sub>, 2 h, 750 rpm. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y el bioconjugado se resuspendió en 250  $\mu\text{L}$  de tampón PBS 0.2% PEG 6000, conservándose a 4°C hasta su uso. La concentración final de MP fue de  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ .

- **Partículas Magnéticas Chemicell SiMAG-Carboxyl**

Se conjugaron 50  $\mu\text{g}$  de Ab por cada 10 mg de MP. De esta forma, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de MPs y tras realizar 2 lavados con tampón MES 0.1 M pH 5.0, se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de EDC a 40 mg/mL. Las MP se

incubaron durante 15 minutos, 750 rpm. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 250  $\mu$ L de una disolución 0.2 mg/mL de Ab. Las MPs se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, 750 rpm. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se conservó para calcular el rendimiento de conjugación mediante test Bradford Cuantitativo. Se prepararon diferentes bioconjugados con estas partículas magnéticas, utilizando diferentes agentes de bloqueo, e incluso sin realizar etapa de bloqueo. De tal forma que para aquellos conjugados en los que no se realizó ningún bloqueo, tras la etapa de inmovilización del Ab, las MPs se resuspendieron en 250  $\mu$ L de PBS 10 mM pH 7.5 0.1% BSA. Para aquellos bioconjugados donde se utilizó BSA como agente de bloqueo, las MPs se resuspendieron en 250  $\mu$ L de PBS 10 mM pH 7.5 0.5 % BSA, mientras que para aquellos bioconjugados donde se utilizó el mPEG-NH<sub>2</sub> como agente de bloqueo, se resuspendieron en 250  $\mu$ L de una disolución PBS 10 mM pH 7.5 0.5% mPEG-NH<sub>2</sub>. En ambos casos, los bioconjugados se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y bajo agitación constante, 750 rpm. Tras la etapa de bloqueo, se retiró el sobrenadante y cada bioconjugado se resuspendió en 250  $\mu$ L de PBS 10 mM pH 7.5. La concentración final de MP en todos los casos fue de 40 mg/mL.

- **Partículas Magnéticas Chemicell fluidMAG-CMX**

Se conjugaron 50  $\mu$ g de Ab por cada 10 mg de MP. De esta forma, se tomaron 400  $\mu$ L de MPs y tras realizar 2 lavados con tampón 0.1 MES pH 5.0, se resuspendieron en 250  $\mu$ L de una disolución de EDC a 40 mg/mL. Las MP se incubaron durante 15 minutos, 750 rpm. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en una disolución en 250  $\mu$ L de una disolución 0.2 mg/mL de Ab. Las MPs se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, 750 rpm. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se conservó para calcular el rendimiento de conjugación mediante test Bradford Cuantitativo. El bioconjugado se resuspendió en 250  $\mu$ L de una disolución de PBS 10 mM pH 7.5 0.1 % BSA, conservándose a 4 °C hasta su uso. La concentración final de MP en este caso fue de 40 mg/mL.

**Tabla 6.2.** Rendimientos de bioconjugación para cada tipo de partícula magnética y anticuerpo. Se indica en que página de este documento se hace referencia al tipo de bioconjugado en cuestión.

MP	Ab	Inmunógeno	Bloqueo	Rendimiento (%)
----	----	------------	---------	-----------------

<b>DynaBeads MyOne</b>	mAb34.16.4	Lpak4.1Nt	0.5% BSA	95
	pAbAD3	apo(a)	0.5% BSA	64
	Preimmune	-	0.5% BSA	60
	pAb220	cTnl	0.5% BSA	98
<b>Sera-MAG (GE)</b>	pAb220	cTnl	0.5% mPEG-NH <sub>2</sub>	97
	pAb220	cTnl	0.5% mPEG-NH <sub>2</sub>	96
<b>fluidMAG-CMX (Chemicell)</b>	pAb220	cTnl	-	92
<b>SiMAG-Carboxyl (Chemicell)</b>	pAb220	cTnl	-	90
	pAb220	cTnl	0.5 % BSA	97
	pAb220	cTnl	0.5% mPEG-NH <sub>2</sub>	97

#### 6.4.6 Protocolo de síntesis de nanopartículas de CdS

##### Reactivos e inmunorreactivos

Diocil Sulfosuccinato de Sodio > 97% (DOSS), Nitrato de Cadmio (Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Sulfuro de Sodio (Na<sub>2</sub>S), 3-Mercapto-1-propanosulfonato de Sodio, ácido 3-mercaptopropiónico, isooctano y la piridina 99.8%, se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri). El etanol 99%, etil éter, hexano y acetato de etilo junto con las sales utilizadas para la preparación de los diferentes tampones, se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

##### Procedimiento experimental

###### • ETAPA 1. Preparación de las partículas de CdS

Los balones destinados a la síntesis de partículas se lavaron con agua regia (HNO<sub>3</sub>:HCl, 1:3), posteriormente se lavó con agua ultrapura abundantemente y

se secaron completamente antes de su utilización. Seguidamente se prepararon, 100 mL de una disolución 0.16 M de DOSS 98:2 Isooctano:H<sub>2</sub>O Ultrapura, 1 mL de una disolución 1 M de Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O Ultrapura y una disolución 1 M de Na<sub>2</sub>S en H<sub>2</sub>O Ultrapura. En un balón de 100 mL se adicionaron 60 mL de tensioactivo DOSS y bajo agitación suave a 600 rpm, se adicionaron 240 µL de la disolución de Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1 M. En otro balón de 100 mL se adicionaron 40 mL de tensioactivo DOSS, y bajo agitación se adicionaron 160 µL de la disolución de Na<sub>2</sub>S 1 M. Ambas emulsiones se dejaron a RT bajo agitación durante 60', con este tiempo se garantizó que las emulsiones de ambos productos estuvieran bien preparadas, cosa que facilitó la producción de partículas de CdS mucho más puras y dispersas. Transcurrido ese tiempo, se juntaron ambas disoluciones en un balón de 250 mL, asegurándose de recoger toda la sal de Cd que haya podido depositarse en el fondo del balón. Finalmente, la mezcla resultante se dejó bajo agitación a RT y en atmósfera de Ar con el fin de evitar la oxidación de los metales, durante 60'.

- **ETAPA 2. Formación de la SAM**

### ***3-Mercapto-1-propanosulfato de sodio/ácido 3-mercaptopropanoico***

Se preparó una disolución 20 mg/mL de 3-Mercapto-1-propanosulfonato de sodio, y una disolución también 20 mg/mL de ácido 3-Mercaptopropanoico, ambas en agua ultrapura. Seguidamente se adicionaron al balón bajo agitación las cantidades indicadas anteriormente, que corresponden a una cantidad total de 80 µmols de cada uno de los compuestos tiolados. La disolución resultante se dejó bajo agitación a RT durante toda la noche, bajo atmósfera inerte de Ar.

### ***m(PEG)<sub>6</sub>-Tiol/ácido carboxílico-(PEG)<sub>7</sub>-Tiol***

Se prepararon las siguientes disoluciones en H<sub>2</sub>O Ultrapura. Una disolución 20 mg/mL de ácido carboxílico-(PEG)<sub>7</sub>-Tiol, y una disolución también 20 mg/mL de m(PEG)<sub>6</sub>-Tiol. Seguidamente se adicionaron al balón bajo agitación 1.83 mL del PEG ácido, y 1.43 mL del mPEG-tiol. La disolución resultante se dejó bajo agitación a RT durante toda la noche, bajo atmósfera inerte de Ar.

- **ETAPA 3. Lavado de las partículas de CdS**

El isooctano se rotavaporó mediante baño de agua a 40 °C y vacío hasta que la aparición de un gel viscoso. Las CdSNP se resuspendieron en una mezcla 1:2 (v/v) de Piridina: Et<sub>2</sub>O, 30 mL y se centrifugaron durante de 60' a 10 °C y 18500 x g. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los nanopartículas de CdS en 15 mL de hexano. Se repitió de nuevo la centrifugación. Tras eliminar el sobrenadante, las CdSNP se resuspendieron en 15 mL de AcOEt. La suspensión resultante se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se repitió el proceso pero en este paso resuspendiendo las partículas en EtOH absoluto. Finalmente se eliminó el sobrenadante y los nanopartículas de CdS se resuspendieron en 6 mL de PBS 10 mM pH 6.0, de la siguiente forma. Las partículas se almacenaron a 4 °C y protegidas de la luz hasta su uso.

- **ETAPA 4. Caracterización de las partículas de CdS**

### **TEM**

El tamaño de los nanopartículas de CdS resultantes, se determinó mediante técnicas tipo TEM, dando lugar a un diámetro de 5 nm.

### **Espectro UV-Vis**

En placa de dilución se tomaron 200 µL de la suspensión de partículas de CdS y se realizaron 3 diluciones seriadas, ½ en PBS 10 mM. Seguidamente de cada pocillo se realizó el espectro de absorción de 300 a 600 nm, estimándose que la concentración de partículas a partir de la cual trabajaremos, será aquella que presente una absorbancia de 1 ODs a 400 nm.

### **Voltamperometría**

Se caracterizó la respuesta electroquímica mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) del nuevo batch de nanopartículas de CdS. Para esto se prepararon diferentes diluciones a partir del batch de CdS en medio PBS 10 mM, ¼ y 1/8, junto con la muestra sin diluir, 50 µL. Seguidamente, se depositó el volumen total de CdSNP sobre el electrodo y se realizó SWV a un potencial de deposición de -1.2 V durante 180 s. Finalmente, se registró un pico al potencial redox característico del Cd a un potencial de -0.90 V.

### **6.4.7 Protocolo de biofuncionalización de nanopartículas metálicas de CdS y Quantum Dots. Evaluación y caracterización.**

#### **Reactivos e inmunorreactivos**

Anticuerpo pAb221 producido contra toda la cTnI y purificado por cromatografía de afinidad Proteína A (Sección 6.4.2). El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisuccinimida (NHS), y la glicina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri). La estreptavidina se adquirió de Molecular Probes, Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

#### **Tampones y disoluciones**

Tampón fosfato 10 mM con una disolución salina al 0.8% (137 mM en NaCl, 2.7 M KCl), pH 6.0. Disolución de  $\text{NaN}_3$  al 2%.

#### **Procedimiento experimental**

- **Preparación de bioconjugados CdSNP-pAb221**

Inicialmente se realizó la dilución correspondiente tras análisis UV-Vis del batch de CdSNP en medio PBS 10 mM pH 6.0. Seguidamente, se preparó una disolución 200 mM de EDC (38.3 mg/mL) y 100 mM de NHS (11.6 mg/mL) en PBS 10 mM pH 6.0. Se trasvasó 1 mL de la disolución EDC/NHS y se dejó la mezcla bajo agitación orbital a RT durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante por centrifugación 20 min RT 10000 x g, y los CdSNP activados, se resuspendieron en 1 mL de una disolución pAb221 a 1 mg/mL. La etapa de conjugación se llevó a cabo a RT durante 150 min y bajo agitación orbital. Seguidamente, se retiró el sobrenadante por centrifugación 20 min, RT y 10000 x g y se reservó para estimar el rendimiento de conjugación mediante test Bradford cuantitativo (Sección 6.3). Los bioconjugados CdSNP-pAb221 se resuspendieron en 1 mL de una disolución de glicina, 10 mg mL<sup>-1</sup> en PBS 10 mM pH 6.0, con el fin de bloquear los grupos carboxilo que no reaccionaron con ninguna amina primaria. Se realizó una incubación a RT y bajo agitación orbital durante 60 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante tras paso de centrifugación y los bioconjugados se resuspendieron en 1 mL de PBS 10 mM pH 7.5 0.05%  $\text{NaN}_3$ , conservándose a 4 °C hasta su uso.

Los resultados del rendimiento de bioconjugación tras la realización del test Bradford cuantitativo (Sección 6.3) fueron del 98 % para los nanopartículas de CdS cuya SAM se realizó con la mezcla 3-Mercapto-1-propanosulfato de sodio/ácido 3-mercaptopropanóico. Mientras que para aquellos bioconjugados preparados con los CdSNP cuya SAM estaba formada por la mezcla ácido carboxílico-(PEG)<sub>7</sub>-Tiol/m(PEG)<sub>6</sub>-Tiol, fue del 80%.

- **Preparación de bioconjugados QD-pAb221**

Inicialmente se procedió a la activación de los grupos carboxilo presentes en la superficie de los QDs. Para un volumen final de conjugación de 500  $\mu$ L, se preparó la mezcla de 100  $\mu$ L de QD (1  $\mu$ M), 150  $\mu$ L de una disolución EDC 100 mM, 150  $\mu$ L de una disolución NHS 100 mM y finalmente 100  $\mu$ L de tampón MES 50 mM pH 5.0. Tanto la EDC como la NHS se prepararon en medio MES 50 mM pH 5.0. La etapa de activación se llevó a cabo durante 60 min a RT y bajo agitación suave. Seguidamente, se retiró el sobrenadante por paso de centrifuga 10 min, RT y 10000 x g. Los QDs activados se resuspendieron en 350  $\mu$ L de tampón MES 50 mM y se sonicaron durante 5 minutos. Seguidamente, se adicionaron 150  $\mu$ L de una disolución de pAb221 1 mg/mL. La mezcla se incubó bajo agitación suave a RT durante 4 h y seguidamente a 4 °C durante 16 h. De esta forma se realizó la conjugación a una relación molar QD:pAb221 de 10:1. A la mañana siguiente, se retiró el sobrenadante por paso de centrifugación (10 min, RT y 10000 x g), conservándose con el fin de estimar el rendimiento de conjugación por test Bradford cuantitativo (Sección 6.3), que fue del 98%. Los bioconjugados se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS 10 mM pH 7.5 0.02% NaN<sub>3</sub>.

- **Preparación de bioconjugados QD-Sav**

Inicialmente se procedió a la activación de los grupos carboxilo presentes en la superficie de los QDs. Para un volumen final de conjugación de 500  $\mu$ L, se preparó la mezcla de 100  $\mu$ L de QD (1  $\mu$ M), 150  $\mu$ L de una disolución EDC 100 mM, 150  $\mu$ L de una disolución NHS 100 mM y finalmente 100  $\mu$ L de tampón MES 50 mM pH 5.0. Tanto la EDC como la NHS se prepararon en medio MES 50 mM pH 5.0. La etapa de activación se llevó a cabo durante 60 min a RT y bajo agitación suave. Seguidamente, se retiró el sobrenadante por paso de centrifuga 10 min, RT y 10000 x g. Los QDs activados se resuspendieron en 440  $\mu$ L de tampón MES 50 mM, y se sonicaron durante 5 minutos. Seguidamente, se adicionaron 60  $\mu$ L

de una disolución de Estreptavidina 20  $\mu\text{M}$ . La mezcla se incubó bajo agitación suave a RT durante 4 h y seguidamente a 4 °C durante 16 h. De esta forma se realizó la conjugación a una relación molar QD:Sav de 1:2. A la mañana siguiente, se retiró el sobrenadante por paso de centrifugación (10 min, RT y 10000 x g), conservándose con el fin de estimar el rendimiento de conjugación por bioensayo en microplaca para la determinación de estreptavidina, que fue del 99%. Los bioconjugados se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de PBS 10 mM pH 7.5 0.02%  $\text{NaN}_3$ .

## 6.5 Bioensayo en microplaca para la determinación de estreptavidina

### Reactivos e inmunorreactivos

Estreptavidina adquirida de Molecular Probes™ (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Bioconjugado BSA-Biotina y HRP-Biotina, ambos preparados en el laboratorio.

### Procedimiento experimental

Se tapizó una microplaca de poliestireno con una disolución de BSA-Biotina a 0.125  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{L/pocillo}$ . La microplaca tapizada se conservó a 4 °C 16 h. A la mañana siguiente, y tras una etapa de lavado 4x 300  $\mu\text{L}$  PBST, se adicionaron tanto la curva de calibrado de estreptavidina, así como las muestras, con sus correspondientes dúPLICAS, 100  $\mu\text{L/pocillo}$  30 min RT 450 rpm. La curva de calibrado de Sav se realizó mediante disoluciones seriadas  $\frac{1}{4}$  partiendo de una concentración 1000 nM y hasta una concentración de 15.625 nM, seguidamente se realizaron 3 diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ , en PBST. La curva de calibrado está formada por 7 concentraciones de Sav y el cero. De cada muestra se prepararon diluciones 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400 en PBST. Transcurrido el tiempo indicado, se realizó de nuevo una etapa de lavado, y seguidamente se adicionó una disolución de HRP-biotina 1/160000 en PBST, 100  $\mu\text{L/pocillo}$ . Se incubaron las placas durante 30 min RT 450 rpm. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100  $\mu\text{L/well}$ ) y tras 30 minutos de incubación

a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 50 µL/pocillo. La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm.

## 6.6 Inmunoensayos

### 6.6.1 Ensayos de titración

La evolución del proceso de inmunización se evaluó mediante ensayos de titración en placa ELISA indirecto no competitivo, evaluando la afinidad de cada antisuero a diferentes diluciones, frente a su correspondiente antígeno, en este caso proteína, tapizada sobre la placa (1 µg mL<sup>-1</sup>, 100 µL/pocillo), 16 h 4 °C o 4 h a RT. Al día siguiente, se lavaron las microplacas 4 veces con PBST (300 µL/pocillo) y se adicionaron de cada antisuero 7 diluciones seriadas ½, empezando por la dilución 1/1000, junto con un blanco (PBST, 100 µL/pocillo). La microplaca se incubó durante 30 minutos a RT. Seguidamente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó a cada pocillo una dilución 1/6000 de anti conejo IgG marcado con HRP (PBST, 100 µL/pocillo). La microplaca se incubó durante 30 minutos a RT. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100 µL/well) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 50 µL/pocillo. La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm.

Tras la evaluación de la sexta sangre (sangre final) fue cuando en todos los casos se alcanzó un título aceptable y los animales se sacrificaron. La sangre fue recolectada en tubos Vacutainer® que contenían gel separado para suero. Los antisueros obtenidos se centrifugaron a 4 °C, 3220 x g durante 10 minutos. Seguidamente se guardaron a -80 °C en presencia de NaN<sub>3</sub> al 0.02%. Inmunoensayo de cuantificación ELISA

### 6.6.2 Ensayos de selección de hibridomas

#### Reactivos e inmunorreactivos

La apolipoproteína B-100 que se adquirió de Abcam (Cambridge, UK), el plasminógeno y apo(a), que se adquirieron de Biopur (Reinach, Suiza), y la lipoproteína (a), junto con los anticuerpos para la Lp(a) (AD1, AD2 y AD3), que fueron proporcionados por AUDIT Diagnostics (Cork, Irlanda). El anticuerpo policlonal anti ratón marcado con HRP (GAM-PO), se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

### **Procedimiento Experimental**

La selección de hibridomas se realizó mediante ensayos de titración en placa ELISA indirecto no competitivo, evaluando la afinidad de cada hibridoma frente a su correspondiente antígeno, en este caso proteína, tapizada sobre la placa ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{L/pocillo}$ ),  $16 \text{ h } 4 \text{ }^\circ\text{C}$  o  $4 \text{ h}$  a RT. Al día siguiente, se lavaron las microplacas 4 veces con PBST ( $300 \mu\text{L/pocillo}$ ) y se adicionaron de cada sobrenadante de cada hibridoma  $50 \mu\text{L/pocillo}$  por cada antígeno, junto con un blanco (PBST,  $50 \mu\text{L/pocillo}$ ). La microplaca se incubó durante 60 minutos a RT bajo agitación a 650 rpm. Seguidamente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó a cada pocillo una dilución 1/6000 de anti ratón IgG marcado con HRP (PBST,  $50 \mu\text{L/pocillo}$ ). La microplaca se incubó de nuevo bajo las mismas condiciones citadas anteriormente. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato ( $100 \mu\text{L/well}$ ) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N,  $50 \mu\text{L/pocillo}$ . La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm.

### **6.6.3 Inmunoensayo ELISA tipo sándwich para la cuantificación de anticuerpos monoclonales.**

#### **Reactivos e inmunoreactivos**

El anticuerpo anti ratón específico de la fracción Fab y producido en cabra (GAM IgG Fab), el anticuerpo policlonal anti ratón marcado con HRP (GAM-PO), se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

#### **Procedimiento experimental**

Se tapizó una microplaca de poliestireno de 96 pocillos con una disolución 1/4000 de GAM IgG Fab, preparada en tampón carbonato/bicarbonato (100

$\mu\text{L/pocillo}$ ) y se incubó 4 h a RT. Transcurrido ese tiempo, se realizó una etapa de lavado ( $4 \times 300 \mu\text{L/pocillo}$ ) y se adicionaron, la curva de calibrado, cada punto por triplicado (a partir del patrón policlonal de ratón producido en el laboratorio,  $400 \text{ ng mg}^{-1}$ , diluciones seriadas 1/2, 8 puntos,  $100 \mu\text{L/pocillo}$  en PBST) y las muestras a tantas diluciones como sea conveniente abarcando diluciones desde 1/200 hasta 1/500000 si fuera necesario ( $100 \mu\text{L/pocillo}$ , también por triplicado y en PBST). Se incubó la placa 30 min a RT y bajo agitación suave (600 rpm). Transcurrido ese tiempo se realizó una nueva etapa de lavado, y seguidamente se adicionó una dilución de anticuerpo secundario GAM-PO 1/6000,  $100 \mu\text{L/pocillo}$  en PBST. Se incubó la placa 30 min a RT y bajo agitación suave (600 rpm). Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato ( $100 \mu\text{L/pocillo}$ ) y tras 3 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N,  $50 \mu\text{L/pocillo}$ . La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm.

#### 6.6.4 Inmunoensayo ELISA tipo Sándwich

##### Reactivos e inmunorreactivos

Los anticuerpos policlonales para la cTnI generados contra toda la cTnI y contra diferentes péptidos de esta proteína producidos por el grupo, así como sus correspondientes bioconjugados biotinilados. Anticuerpos policlonales contra la apoB100 producidos en el grupo, así como los correspondientes anticuerpos anti apoB100 biotinilados. Anticuerpos monoclonales producidos contra diferentes secuencias peptídicas de la apo(a) producidos en el grupo y también biotinilados. Anticuerpos policlonales para la Lp(a) proporcionados por AUDIT Diagnostics (Cork, Irlanda), y sus correspondientes bioconjugados biotinilados. cTnI humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). Complejo ternario ITC humano fue obtenido por Hytest (Turku, Finlandia). La Lipoproteína (a) nativa fue proporcionada por AUDIT Diagnostics (Cork, Irlanda). Anticuerpo secundario IgG de cabra anti conejo marcado con HRP (GAR-PO), anticuerpo secundario de cabra anti ratón marcado con HRP (GAM-PO) y Estreptavidina marcada con HRP (Sav-HRP), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

## **Tampones y disoluciones**

Tampón PBST-caseína es PBST al 0.15% Caseína, preparada a partir de una disolución stock de caseína al 1% preparada en NaOH 0.1 M. Tampón PB 2xS-T 1% leche, es tampón PBS 10 mM con una concentración salina del 1.6% y un 1% en leche en polvo.

## **Procedimiento experimental**

- **Ensayos de titración en placa**

### **A) Anticuerpo de captura**

Inicialmente se evaluó la concentración de saturación para el anticuerpo de captura, para esto, se tapizó una microplaca con diferentes concentraciones de anticuerpo en cada columna de la microplaca en tampón carbonato/bicarbonato (100  $\mu$ L/pocillo). La etapa de tapizado se realizó a 4 °C, 16 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el lavado de la placa 4x 300  $\mu$ L PBST y se adicionaron 100  $\mu$ L/pocillo del correspondiente estándar en el tampón de incubación pertinente y a una concentración constante para toda la placa. Tras 30 min a RT y agitación 450 rpm. Cada etapa de incubación, excepto la de adición del sustrato, se realizó bajo las condiciones de agitación a RT a 450 rpm durante 30 minutos. Seguidamente, se volvió a realizar una etapa de lavado, y se añadieron diferentes concentraciones del anticuerpo de detección en PBST. Una concentración por fila, 100  $\mu$ L/pocillo. La placa se incubó de nuevo y finalmente lavada otra vez. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L/pocillo de una disolución en PBST de anticuerpo secundario IgG anti conejo-HRP (1/6000) o Sav-HRP (1/6000), y se incubó la placa. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100  $\mu$ L/well) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 50  $\mu$ L/pocillo. La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm. Se fijó la concentración de anticuerpo de captura como aquella a la cual se saturaba la señal siendo ésta de alrededor de 1 ODs.

### **B) Anticuerpo de detección**

Se estudió la concentración de saturación del anticuerpo de detección. Para esto, se tapizó una microplaca con una disolución en tampón carbonato/bicarbonato, con el anticuerpo de captura a la concentración establecida en el ensayo anterior). La etapa de tapizado se realizó a 4 °C, 16 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el lavado de la placa 4x 300 µL PBST y se adicionaron diferentes diluciones del analito objetivo preparado en el tampón correspondiente, 100 µL/pocillo. Se dispusieron 7 diluciones de analito y un cero. En total se prepararon tantas curvas como columnas de la microplaca. Tras 30 min a RT y agitación 450 rpm, se volvió a realizar una etapa de lavado, y seguidamente se añadieron diferentes concentraciones del anticuerpo de detección en PBST. Una concentración por columna, 100 µL/pocillo. La placa se incubó de nuevo y finalmente lavada otra vez. Seguidamente se adicionaron 100 µL/pocillo de una disolución en PBST de anticuerpo secundario IgG anti conejo-HRP (1/6000), GAM-PO (1/6000) o Sav-HRP (1/6000), y se volvió a incubar durante 30 minutos.. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100 µL/well) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 50 µL/pocillo. La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm. Se fijó la concentración de anticuerpo de captura como aquella a la cual se saturaba la señal siendo ésta de alrededor de 1 ODs, observando si existía o no dosis-dependencia.

- **ELISA Sándwich. Curva de calibrado**

Se tapizó una microplaca con la concentración estipulada de anticuerpo de captura diluido en tampón carbonato/bicarbonato (100 µL/pocillo). La etapa de tapizado se realizó a 4 °C, 16 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó el lavado de la placa 4x 300 µL PBST y se adicionaron diferentes diluciones del analito incluido en cero, (100 µL/pocillo). Tras 30 min a RT y agitación 450 rpm, se volvió a realizar una etapa de lavado, y seguidamente se añadió el anticuerpo de detección a la correspondiente concentración establecida, en PBST (100 µL/pocillo). La placa se incubó de nuevo y finalmente lavada otra vez. Seguidamente se adicionaron 100 µL/pocillo de una disolución en PBST de anticuerpo secundario IgG anti conejo-HRP (1/6000), GAM-PO (1/6000) o Sav-HRP (1/6000), y se incubó de nuevo durante 30 min. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100 µL/well) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 50

$\mu\text{L/pocillo}$ . La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm. Las curvas de calibrado se ajustaron a la ecuación logarítmica de 4-parámetros, cuya fórmula es:  $y = [(A-B)/1+(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoideal y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. A no ser que se indique lo contrario, los datos mostrados corresponden a un promedio de dos réplicas por punto. La detectabilidad del ensayo se estableció por medio del cálculo de la  $IC_{10}$ , que corresponde a la concentración de analito correspondiente a un 10% de la señal máxima. Las condiciones establecidas para cada uno de los inmunoensayos en placa tipo sándwich desarrollados en esta tesis se describen en la Tabla 2.3.

**Tabla 6.3.** Condiciones establecidas para cada inmunoensayo en placa

Ensayo	Ab Captura	Ab Detección	Incubación del analito	Figura
<b>apoB100</b>	As306	pAb307-B	PBST	
<b>Lp(a) Fuerza iónica y aditivos</b>	As306	pAb307-B	PB-T con diferentes conductividades y aditivos a diferentes concentraciones	
<b>Lp(a)</b>	pAb-AD3	As306	PBST-1% leche	
<b>Lp(a), apoB100 y Plasminógeno</b>	pAb-AD3	As306	PBST-1% leche	
<b>Lp(a)-matriz</b>	pAb-AD3	As306	PBST-1% leche	
<b>cTnI-Microplacas</b>	As220	pAb221-B	PBST/Diferentes microplacas	
<b>cTnI-Aditivos</b>	As220	pAb221-B	PBST con diferentes aditivos	
<b>cTnI-caseína</b>	As220	pAb221-B	PBST con diferentes concentraciones de caseína	
<b>cTnI</b>	As220	pAb221-B	PBST 0.15% Caseína	
<b>cTnI</b>	As220,246,249	pAb260-B	PBST 0.15% Caseína	

### 6.6.5 Magneto ELISA en formato Sandwich

#### Reactivos e inmunorreactivos

Los bioconjugados MP-pAb220 anti cTnI, MP-pAbAD3 anti Lp(a), MP-mAb34.16.4 anti Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-HCH y MP-pAb<sub>inespecífico</sub> fueron preparados en el laboratorio (Sección 6.4.5), junto con los anticuerpos biotinilados, pAb221-B contra la cTnI, pAb306-B contra la apoB100 y mAb18.5.3-B contra el HCH-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. cTnI humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). Complejo ternario I-T-C humano fue obtenido por Hytest (Turku, Finlandia). La Lipoproteína (a) nativa fue proporcionada por AUDIT Diagnostics (Cork, Irlanda). Anticuerpo secundario IgG anti conejo marcado con HRP, anticuerpo secundario anti ratón marcado con HRP (GAM-PO) y Estreptavidina marcada con HRP, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

#### Procedimiento experimental

- **Evaluación de la relación señal/ruido de fondo**

Para los diferentes inmunoensayos realizados con bioconjugados a partículas magnéticas, se evaluaron a concentraciones arbitrarias de MP-Ab y Ab-Biotina, la relación señal/ruido de fondo bajo diferentes condiciones, tanto para la cTnI como para la Lp(a), a dos niveles diferentes de analito. A continuación se describe de forma general cual fue el procedimiento seguido.

Inicialmente se preparó la dilución correspondiente del bioconjugado MP-Ab en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-Ab 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-Ab se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 100  $\mu$ L de bioconjugado por tubo, y se añadió 100  $\mu$ L de analito a una concentración establecida a unos tubos, mientras que a un mismo número de tubos se añadieron 100  $\mu$ L de tampón. El número de tubos dependió del diseño establecido, así como el tampón en el cual se preparaba el analito. Los tubos se incubaron 30 minutos, RT y 750 rpm. Todas las

etapas de incubación, salvo que se indique lo contrario, se realizaron bajo las mismas condiciones a las descritas anteriormente. Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 600  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución correspondiente de anticuerpo de detección en PBST (100  $\mu\text{L}$ /tubo), y se incubaron de nuevo. Tras realizar una nueva etapa de lavado, cada tubo se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de anticuerpo secundario IgG anti conejo-HRP (1/6000) o Sav-HRP (1/6000), y se realizó una etapa de incubación. Finalmente, tras realizar una nueva etapa de lavado, se adicionó la disolución de sustrato (100  $\mu\text{L}$ /well) y tras 30 minutos de incubación a RT y en oscuridad, la reacción enzimática se detuvo. Para esto, se traspasó cada sobrenadante a un pocillo de una placa de poliestireno no tratado, y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N. La absorbancia de cada pocillo se registró a 450 nm.

- **Ensayo de titración**

Las concentraciones óptimas de inmunorreactivos se seleccionaron mediante ensayos de titración de igual forma a la descrita anteriormente en la Sección 6.6.4. En este caso se evaluaron concentraciones de MP-pAb220 de 0.1 y 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$ , y posteriormente, concentraciones de pAb221-B de 2, 1 y 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **6.6.6 Inmunoensayo tipo Dot Blot**

#### **Reactivos e inmunorreactivos**

Los anticuerpos monoclonales contra diferentes secuencias peptídicas de el kringle 4 tipo 1 y el kringle 4 tipo 2 utilizados en esta sección, fueron los producidos en el grupo. La Lp(a) fue proporcionada por Biorbyt (Cambridge, UK). La Lp(a) utilizada es un mezcla de un número indeterminado de pacientes, procedente de suero humano previamente desfibrinado y delipidado. Se utilizaron los bioconjugados preparados en el grupo Lpak4.1Nt-Cys-SMCC-BSA y BSA-SMCC-Cys-Lpak4.2Ct. La BSA. El anti ratón marcado con HRP (GAM-PO) y el Ditiotreitól (DTT) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). El sustrato quimioluminiscente ECL Primer Western Blotting Detection Reagent se adquirió de Amersham, GE Healthcare (Little Chalfont, UK). El resto de sales utilizadas

para la preparación de los diferentes tampones se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

### **Tampones y disoluciones**

Tampón Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 7.5. Tampón Tris-T, es tampón Tris-HCl 20 mM a un 0.05% de Tween 20. Tampón de bloqueo es tampón Tris-T a un 5% en BSA. Tampón de ensayo es tampón TBS-T a un 0.1% de BSA.

### **Instrumentos y equipos**

Las membranas de nitrocelulosa para el DotBlot se adquirieron a DotBlot Albeniz (Navarra, España). El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midió mediante pH-metro 540 GLP y conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Se utilizó un escáner C-DiGit® Blot Scanner de LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Alemania) para la adquisición de los resultados.

### **Procedimiento experimental**

- **Pretratamiento de la Lp(a)**

Se preparó una disolución de DTT 1 M en H<sub>2</sub>O Ultrapura. Seguidamente, se preparó una disolución de 300.8 µL de Lp(a) a 250 µg/mL. Para esto se tomaron 80 µL del stock de Lp(a) a 940 µg/mL, y se añadieron 217.8 µL de H<sub>2</sub>O Ultrapura, y seguidamente se añadieron 3 µL de DTT, de tal modo que la concentración final de DTT fue de 100 mM. La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a 37 °C durante 60 minutos bajo agitación suave.

- **Realización del ensayo tipo Dot Blot**

Se prepararon de cada antígeno, 200 µL de una dilución 250 µg/mL, y también una disolución de 300.8 µL de Lp(a) a 250 µg/mL en H<sub>2</sub>O Ultrapura. Transcurrido el tiempo de digestión, se adicionó de cada inmunorreactivo, 20 µL en cada pocillo de la membrana. Dado que se evaluaron 4 anticuerpos monoclonales por cada inmunógeno, se sembraron en total 8 pocillos con 20 µL de Lp(a)-DTT, 8 pocillos con 20 µL de Lp(a) y 4 pocillos con 20 µL de cada antígeno de tapizado. Una vez sembrada la membrana DotBlot, se dejó secar. Una vez cada pocillo

estuvo seco, se realizó una etapa de bloqueo, para esto se sumergió la membrana en 10 mL de Tampón de Bloqueo durante 60 min RT, bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, la membrana se separó de tal forma que cada fracción de membrana contenía un pocillo donde se había inmovilizado Lp(a)-DTT, un pocillo con un AT y otro pocillo con Lp(a) sin pretratar. Así pues, cada trozo de membrana se incubó con una disolución de 2 mL de anticuerpo monoclonal a 4 µg/mL en Tampón de Ensayo, durante 30 min RT y bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, las membranas se lavaron 3 veces en medio TBS-T, 5 mL (5 min/lavado). Se sumergieron todas las membranas en 12 mL de una disolución de GAM-PO a 1/6000 durante 30 min RT y bajo agitación suave. Seguidamente, las membranas se lavaron inicialmente con 5 mL de tampón TBS-T durante 15 min bajo agitación suave, seguidamente se realizaron dos lavados con 5 mL de TBS-T durante 5 min/lavado, y finalmente se realizó un lavado con TBS 5 mL durante 5 min bajo agitación suave. Tras los diferentes lavados, las membranas se sumergieron en 2 mL de la disolución de sustrato ECL, y se incubaron a oscuras durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se adquirió la señal quimioluminiscente mediante escaneo de las membranas.

### **6.6.7 Electroforesis SDS-PAGE en gel de gradiente 4-15%**

#### **Reactivos e inmunorreactivos**

La Lp(a) fue proporcionada por Biorbyt (Cambridge, UK). La Lp(a) utilizada es un pool de un número indeterminado de pacientes, procedente de suero humano previamente desfibrinado y delipidado. el Ditiotreitól (DTT) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). El reactivo NuPAGE LDS 4x y los patrones de peso molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards* se adquirieron de Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA). La glicina se adquirió de GE Healthcare (Little Chalfont, UK). El SDS *UltraPure SDS 10%* se adquirió de Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). La sal de tris(hidroximetil)aminometano se adquirió de Roche (Basilea, Suiza). El ácido acético glacial se adquirió de Panreac (Barcelona, España). El metanol absoluto se adquirió, junto con el resto de sales utilizadas para la preparación de los diferentes tampones, en Merck (Darmstadt, Alemania).

Los geles de poliacrilamida de gradiente 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, se adquirieron de Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA).

### **Tampones y disoluciones**

Running Buffer es tampón Tris-HCl 0.25 M con glicina 1.92 M y SDS al 1% pH 8.3-8.7. Solución de azul de Coomassie al 0.8%. Destain Solution es metanol:ácido acético glacial 30:10.

### **Instrumentos y equipos**

El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midió mediante pH-metro 540 GLP y conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). La electroforesis en gel se llevó a cabo mediante el equipo adquirido a Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA).

### **Procedimiento experimental**

- ***Pretratamiento de la Lp(a)***

Se realizó un paso de digestión de la Lp(a) en presencia de DTT y calor. Para esto se preparó una disolución de Lp(a) a una concentración de 0.1 µg/µL a partir del stock a 0.992 µg/µL. Esta disolución se llevó a 95-100 °C en baño de agua durante 10 min, bajo agitación suave, en presencia de DTT 50 mM y reactivo NuPAGE LDS 4x a una dilución final ¼. Transcurrido ese tiempo, se dejó atemperar las muestras, y seguidamente se centrifugaron 3 min 3220 x g, RT. Finalmente se sonicaron 5 min.

- ***Electroforesis SDS-PAGE***

Se sembraron 10 µL de muestra por cada carril, lo que correspondió a 1 µg de proteína. Del patrón de pesos moleculares se sembraron también 10 µL. La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 v, deteniendo la migración de las proteínas al cabo de 75 min (cuando el frente de Bromofenol migró fuera del gel) o bien de 5h, dependiendo del experimento. Seguidamente, se tintó la membrana con Coomassie Blue 0.8% durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el exceso de Coomassie Blue mediante la

realización de diferentes lavados con Destain Solution, hasta que se vislumbraron las bandas de forma clara.

### **6.6.8 Inmunoensayo tipo Western blot**

#### **Reactivos e inmunorreactivos**

Los anticuerpos monoclonales contra diferentes secuencias peptídicas de el *kringle* 4 tipo 1 y el *kringle* 4 tipo 2, y el anticuerpo policlonal 307 anti apoB100 utilizados en esta sección, fueron los producidos en el grupo. El anticuerpo policlonal anti Lp(a) AD3 fue proporcionado por AUDIT Diagnostics (Cork, Ireland). La Lp(a) fue proporcionada por Biorbyt (Cambridge, UK). La Lp(a) utilizada es un pool de un número indeterminado de pacientes, procedente de suero humano previamente desfibrinado y delipidado. El anti ratón marcado con HRP (GAM-PO) , el anticuerpo de conejo anti cabra marcado con HRP (RAG-PO), el anticuerpo de cabra anti conejo marcado con HRP (GAR-PO) y el Ditiotreititol (DTT) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). El sustrato quimioluminiscente ECL Primer Western Blotting Detection Reagent se adquirió de Amersham, GE Healthcare (Little Chalfont, UK). El resto de sales utilizadas para la preparación de los diferentes tampones se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

Las membranas de nitrocelulosa, junto con los papeles de filtro se adquirieron de Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA).

#### **Tampones y disoluciones**

Running Buffer es tampón Tris-HCl 0.25 M con glicina 1.92 M y SDS al 1% pH 8.3-8.7. Tampón de transferencia es tampón Running:Metanol absoluto 10:20. Solución de azul de Comassie al 0.8%. Solución desteñidora es metanol:ácido acético glacial 30:10. Ponceau S 10%. Tampón fosfato 10 mM con una disolución salina al 0.8% (137 mM en NaCl, 2.7 M KCl), pH 7.5. PBST es PBS con 0.05% Tween 20. Tampón de bloqueo es tampón PBS 10 mM al 5% en leche desnatada en polvo. Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

## Instrumentos y equipos

El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midió mediante pH-metro 540 GLP y conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Se utilizó un escáner C-DiGit® Blot Scanner de LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Alemania) para la adquisición de los resultados. La etapa de transferencia se llevó a cabo mediante el equipo adquirido a Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA, USA).

## Procedimiento experimental

Tras la realización de la electroforesis SDS-PAGE en gel de gradiente, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, se procedió a la realización de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Para esto se realizó el montaje de transferencia según el procedimiento descrito por Bio-Rad. En todo momento se mantuvieron tanto el gel, como la membrana de nitrocelulosa, las esponjas de transferencia y los papeles de filtro, sumergidos en tampón de transferencia, evitando que se secaran. Seguidamente se realizó la transferencia a un amperaje constante de 350 mA a 4 °C, durante 2 h y bajo agitación suave.

Transcurrido el tiempo establecido, el gel y la membrana de nitrocelulosa se separaron. El gel se sumergió en una disolución de azul de Coomassie 0.8% durante 5 min y bajo agitación constante. Al cabo del tiempo descrito, se destiñó realizando tantos lavados con solución desteñidora hasta que se apreciaron bandas. Este paso tras la transferencia se realizó como control, con el fin de que si se observaba alguna banda tras la tinción, significaba que la transferencia no había transcurrido de forma 100% eficiente. De un modo semejante, la membrana de nitrocelulosa se sumergió durante 3 min en una disolución de Ponceau S 1/10 en H<sub>2</sub>O Ultrapura. Tras este tiempo y la realización de 3 lavados con H<sub>2</sub>O Ultrapura, se observaron bandas, indicando que la etapa de transferencia se había llevado a cabo exitosamente. Mediante este tinte, se marcó la membrana con el fin de rotarla y así incubar cada fracción de esta con los anticuerpos que se desease. Seguidamente, la membrana se incubó a 4 °C durante 16 h y bajo agitación constante en 20 mL de tampón de bloqueo de bloqueo. A la mañana siguiente, se cortó la membrana, y cada fracción se incubó con 6 mL de una disolución 4 µg/mL del anticuerpo correspondiente, preparada en tampón de bloqueo. Las diferentes membranas se incubaron a RT durante 1 h y bajo agitación suave. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de las

membranas PBST. Cada lavado se realizó sumergiendo la membrana en 8 mL de PBST y agitando suavemente durante 5 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante, repitiéndose la misma acción 2 veces, y se incubó cada membrana en 6 mL de una disolución 1/6000 de anticuerpo secundario marcado con HRP (GAM-PO, RAG-PO o GAR-PO, según correspondiese) preparada en PBST, durante 60 min RT y a agitación suave. Tras retirar el sobrenadante, se realizaron diferentes pasos de lavado tal y como se indica a continuación, 1x 8 mL PBST 15 min y agitación, 2x 8 mL PBST 5 min y agitación, 1x 8 mL PBS 10 mM 15 min. Finalmente, cada membrana se sumergió en la disolución de sustrato quimioluminiscente ECL, incubándose 5 minutos en ausencia de luz. Transcurrido ese tiempo, se escanearon las membranas, adquiriéndose las imágenes correspondientes.

## **6.7 Inmunosensores electroquímicos**

### **6.7.1 Inmunosensor amperométrico**

#### **Reactivos e inmunorreactivos**

Los bioconjugados MP-pAb220 y pAb221-B, ambos anti cTnI, fueron preparados en el laboratorio (Sección 6.4.5 y 6.4.4, respectivamente). La cTnI humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). La Estreptavidina marcada con HRP (Sav-HRP), fue adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

#### **Tampones y disoluciones**

Tampón citrato-KCl es 0.04 M en citrato de sodio y 0.1 M KCl a pH 5.5. La solución de sustrato preparada en el tampón citrato-KCl, contiene 0.01% en 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y 0.004% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **Instrumentos y equipos**

Las medidas amperométricas se realizaron con el potenciostato Ivium Compactstat.h® adquirido en Ivium Technologies (Eindhoven, Países Bajos).

Electrodo 8x SPE C110, serigrafiado de carbono, se adquirió en Dropsens (Asturias, España). Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrífuga adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

### Procedimiento experimental

Se preparó una disolución de MP-pAb220 a 0.1 mg/mL en PBST. Se realizaron 2 lavados en 1000  $\mu$ L de PBST y finalmente se volvieron a resuspendieron en volumen correspondiente de PBST. Se preparó la recta de calibrado a partir del stock de cTnI y en PBST se relizaron 5 diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  y un cero, empezando por la concentración de 125 ng/mL. Se preparó una disolución en PBST de pAb221-B a 0.5  $\mu$ g/mL. Se preparó una disolución de Sav-HRP 1/500 en PBST. Finalmente, se mezclaron 100  $\mu$ L de cada inmunorreactivo con cada punto de la recta (100  $\mu$ L), y se incubó cada tubo durante 30 min a RT y agitación 750 rpm. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de cada tubo con PBST 800  $\mu$ L, retirando el sobrenadante y dejando las partículas secas. Tras realizar un pretratamiento de limpieza del electrodo con corriente de ozono, 10 min, se depositó en cada electrodo 50  $\mu$ L del tampón citrato-KCl. Seguidamente se resuspendió el contenido de cada tubo en 50  $\mu$ L de tampón citrato-KCl, y depositándolo en cada electrodo. Seguidamente se procedió a la adquisición de la corriente tras la adición de 10  $\mu$ L de disolución sustrato en cada electrodo transcurridos 100 s. La intensidad de la señal electroquímica obtenida era directamente proporcional a la concentración de cTnI presente en la muestra. La recta de calibrado se ajustaron a una ecuación lineal  $y = mx + n$ , siendo m la pendiente y n la ordenada en el origen. Si no se indica lo contrario, cada punto de la recta se estudió por triplicado. El límite de detección y el de cuantificación se establecieron mediante la variación de los blancos,

$$LOD = \bar{x}_{blancos} + 3 \times SD_{blancos}$$

$$LOQ = \bar{x}_{blancos} + 10 \times SD_{blancos}$$

## 6.7.2 Inmunosensor voltamperométrico

- Inmunosensor voltamperométrico con nanopartículas de CdS

### Reactivos e inmunorreactivos

Los bioconjugados MP-pAb220 y CdSNP-pAb221 ambos anti cTnI, fueron preparados en el laboratorio (Sección 6.4.5 y 6.4.7, respectivamente). La cTnI humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania), exceto el acetato de sodio, junto con los reactivos utilizados durante las medidas electroquímicas, que se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

### Tampones y disoluciones

Tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5 1 µg/mL Bi(III).

### Instrumentos y equipos

Las medidas voltamperométricas se realizaron con el potenciostato µ-STAT8000P adquirido en Dropsens (Asturias, España). Electrodo 8x SPE C110, serigrafiado de carbono, se adquirió en Dropsens (Asturias, España). Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrifuga adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

### Procedimiento experimental

#### *Evaluación de la relación señal/ruido*

Inicialmente se preparó la dilución correspondiente del bioconjugado MP-pAb220 en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-pAb220 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-pAb220 se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 100 µL de bioconjugado por tubo, y se añadió 100 µL de cTnI a las concentraciones establecidas de 1 y 0 µg/mL, 30 minutos RT 750 rpm. Seguidamente se realizó el

lavado de las partículas 3x 600  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución correspondiente de anticuerpo de detección marcado con CdSNP, en PBST (100  $\mu\text{L}$ /tubo), y se incubaron 30 min RT 750 rpm. De nuevo, se realizó una etapa de lavado, y el contenido de cada tubo se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III). Los electrodos se lavaron mediante la realización de una ciclovoltagperometría en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, 80  $\mu\text{L}$ /electrodo. Se trasvasó de esta forma el contenido de cada tubo a la superficie del electrodo de trabajo, y tras esperar 60 s a que las MPs fueran capturadas por el imán, se realizó la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.20 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 V y una frecuencia de 20 Hz.

- **Inmunosensor voltamperométrico con QDs de CdSe/ZnS-PMA**

### **Reactivos e inmunorreactivos**

Los bioconjugados MP-pAb220, pAb221-B, QD-pAb221 y QD-Sav, fueron preparados en el laboratorio (Sección 6.4.5, 6.4.4, 6.4.7, respectivamente). La cTnl humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania), excepto el acetato de sodio, junto con los reactivos utilizados durante las medidas electroquímicas, que se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

### **Tampones y disoluciones**

Tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III). HCl 1 M.

### **Instrumentos y equipos**

Las medidas voltamperométricas se realizaron con el potenciostato  $\mu$ -STAT8000P adquirido en Dropsens (Asturias, España). Electrodo 8x SPE C110, serigrafiado de carbono, se adquirió en Dropsens (Asturias, España). Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrifuga adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

## **Procedimiento experimental**

### ***Evaluación de la actividad de los bioconjugados***

Inicialmente se preparó la dilución correspondiente de cada bioconjugado MP-BSA, MP-BSA-Biotina y MP-BSA-SIA-Cys(24-40) en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente para cada bioconjugado a 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, cada bioconjugado se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 20  $\mu$ L de bioconjugado por tubo, y se añadió 20  $\mu$ L de bioconjugado QD-Sav sobre los 20  $\mu$ L de MP-BSA y MP-BSA-Biotina. Del mismo modo, se añadieron 20  $\mu$ L del bioconjugado QD-pAb221 sobre los 20  $\mu$ L de MP-BSA y MP-BSA-SIA-Cys(24-40). Se realizó una incubación durante 30 minutos, RT 750 rpm. Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 400  $\mu$ L PBST mediante separación magnética. En este punto, con el fin de liberar el Cd encapsulado en los QDs, se realizó una etapa de digestión en medio ácido del contenido de cada tubo. Para esto, se resuspendió el contenido de cada tubo en 20  $\mu$ L de HCl 0.5 M y se incubaron durante 5 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se tomó el sobrenadante mediante separación magnética y se depositó en la celda electroquímica que contenía 50  $\mu$ L de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu$ g/mL Bi(III), realizándose la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.20 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 V y una frecuencia de 20 Hz. Los electrodos se lavaron previamente mediante la realización de una ciclovoltamperometría en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M, 80  $\mu$ L/electrodo.

### ***Evaluación de la relación señal/ruido***

Inicialmente se preparó la dilución correspondiente del bioconjugado MP-pAb220 en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-pAb220 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-

pAb220 se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 20  $\mu\text{L}$  de bioconjugado por tubo, y se añadió 20  $\mu\text{L}$  de cTnI a las concentraciones establecidas de 1 y 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 minutos RT 750 rpm. Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 400  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución correspondiente de pAb221-B o de QD-pAb221 sin dilución previa, según el caso, en PBST (20  $\mu\text{L}/\text{tubo}$ ), y se incubaron 30 min RT 750 rpm. De nuevo, se realizó una etapa de lavado, y el contenido de aquellos tubos donde se había dispuesto el anticuerpo biotinilado, se adicionaron 20  $\mu\text{L}/\text{tubo}$  del bioconjugado QD-Sav. Estos tubos se incubaron durante 30 min RT, 750 rpm. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar una etapa de lavado. En este punto, con el fin de liberar el  $\text{Cd}^{2+}$  encapsulado en los QDs, se realizó una etapa de digestión en medio ácido del contenido de cada tubo. Para esto, se resuspendió el contenido de cada tubo en 20  $\mu\text{L}$  de HCl 0.5 M y se incubaron durante 5 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se tomó el sobrenadante mediante separación magnética y se depositó en la celda electroquímica que contenía 50  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III), realizándose la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.20 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 V y una frecuencia de 20 Hz. Los electrodos se lavaron previamente mediante la realización de una ciclovoltamperometría en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, 80  $\mu\text{L}/\text{electrodo}$ .

### ***Realización de la curva de calibrado para la cTnI con conjugados QD-Sav***

Inicialmente se preparó una dilución 0.8 mg/mL del bioconjugado MP-pAb220 en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-pAb220 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-pAb220 se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 20  $\mu\text{L}$  de bioconjugado por tubo. Se prepararon las diferentes concentraciones de cTnI evaluadas, de 1, 0.1, 0.01 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas sobre cada tubo que contenía el bioconjugado MP-pAb220, 30 minutos RT 750 rpm.

Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 400  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución de pAb221-B de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparada en PBST (20  $\mu\text{L}$ /tubo), y se incubaron 30 min RT 750 rpm. De nuevo, se realizó una etapa de lavado, y el contenido de cada tubo se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  del bioconjugado QD-Sav (1:2). Estos tubos se incubaron durante 30 min RT, 750 rpm. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar una etapa de lavado. En este punto, con el fin de liberar el Cd encapsulado en los QDs, se realizó una etapa de digestión en medio ácido del contenido de cada tubo. Para esto, se resuspendió el contenido de cada tubo en 20  $\mu\text{L}$  de HCl 0.5 M y se incubaron durante 5 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se tomó el sobrenadante mediante separación magnética y se depositó en la celda electroquímica que contenía 50  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu\text{g/mL}$  Bi(III), realizándose la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.20 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 v y una frecuencia de 20 Hz. Los electrodos se lavaron previamente mediante la realización de una ciclo voltamperometría en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, 80  $\mu\text{L}$ /electrodo.

- **Inmunosensor voltamperométrico con Quantum Dots comerciales**

### **Reactivos e inmunorreactivos**

Los bioconjugados MP-pAb220, pAb221-B, fueron preparados en el laboratorio (Sección 6.4.5 y 6.4.4, respectivamente). La cTnI humana nativa proporcionada por Life Diagnostics (West Chester, Pennsylvania). Los Qdot<sup>®</sup> 585 Streptavidin se adquirieron de Molecular Probes, Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). La albúmina de suero bovina, la caseína y la gelatina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). La leche en polvo desnatada se adquirió del supermercado. Todas las sales utilizadas para la preparación de los tampones se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania), exceto el acetato de sodio, junto con los reactivos utilizados durante las medidas electroquímicas, que se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

## Tampones y disoluciones

Tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III). HCl 1 M.

## Instrumentos y equipos

Las medidas voltamperométricas se realizaron con el potenciostato  $\mu$ -STAT8000P adquirido en Dropsens (Asturias, España). Electrodo 8x SPE C110, serigrafiado de carbono, se adquirió en Dropsens (Asturias, España). Rack Magnético MagnaRack para microtubos de centrifuga adquirido en Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

## Procedimiento experimental

### *Evaluación de la relación señal/ruido*

Inicialmente se preparó la dilución correspondiente del bioconjugado MP-pAb220 en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-pAb220 40 mg/mL, en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-pAb220 se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 100  $\mu\text{L}$  de bioconjugado por tubo, y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de cTnl a las concentraciones establecidas de 1 y 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 minutos RT 750 rpm. Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 600  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución correspondiente de pAb221-B o de QD-pAb221 sin dilución previa, según el caso, en PBST (100  $\mu\text{L}/\text{tubo}$ ), y se incubaron 30 min RT 750 rpm. De nuevo, se realizó una etapa de lavado, y se resuspendió el contenido de cada tubo en 80  $\mu\text{L}$  de tampón PBST, seguidamente se adicionaron 20  $\mu\text{L}/\text{tubo}$  del bioconjugado QdotStrep585 a 5 nM, preparados en el medio correspondiente. Estos tubos se incubaron durante 30 min RT, 750 rpm. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar una etapa de lavado. En este punto, con el fin de liberar el Cd encapsulado en los QDs, se realizó una etapa de digestión en medio ácido del contenido de cada tubo. Para esto, se resuspendió el contenido de cada tubo en 20  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M y se incubaron durante 30 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se tomó el sobrenadante mediante separación magnética y se depositó en la celda electroquímica que

contenía 40  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III), realizándose la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.40 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 V y una frecuencia de 20 Hz. Los electrodos se lavaron previamente mediante la realización de una ciclovoltamperometría en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, 80  $\mu\text{L}/\text{electrodo}$ .

### ***Realización de la curva de calibrado para la cTnl con conjugados QdotStrep585***

Inicialmente se preparó una dilución 1.0 mg/mL del bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub> en PBST. Para esto, se resuspendió el volumen correspondiente de MP-pAb220<sub>mPEG</sub> (40 mg/mL), en 1 mL de tampón PBST, y seguidamente se retiró el sobrenadante mediante separación magnética. Este proceso de lavado del bioconjugado se realizó un total de 3 veces. Finalmente, el bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub> se resuspendió en el volumen correspondiente de tampón PBST hasta obtener la concentración deseada. Seguidamente se distribuyeron 100  $\mu\text{L}$  de bioconjugado por tubo. Se prepararon las diferentes concentraciones de cTnl evaluadas, de 1, 0.25, 0.125 y 0.03125 y 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas sobre cada tubo que contenía el bioconjugado MP-pAb220<sub>mPEG</sub>, 30 minutos RT 750 rpm. Seguidamente se realizó el lavado de las partículas 3x 600  $\mu\text{L}$  PBST mediante separación magnética. Los conjugados se resuspendieron en la dilución de pAb221-B de 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparada en PBST (100  $\mu\text{L}/\text{tubo}$ ), y se incubaron 30 min RT 750 rpm. De nuevo, se realizó una etapa de lavado, y el contenido de cada tubo se resuspendió en 80  $\mu\text{L}$  de tampón PBST. Seguidamente, se preparó una dilución de QdotStrep585 a 5 nM, y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de esta disolución a cada tubo, incubándose durante 30 min RT, 750 rpm. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar una etapa de lavado. En este punto, con el fin de liberar el Cd encapsulado en los QDs, se realizó una etapa de digestión en medio ácido del contenido de cada tubo. Para esto, se resuspendió el contenido de cada tubo en 20  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M y se incubaron durante 30 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se tomó el sobrenadante mediante separación magnética y se depositó en la celda electroquímica que contenía 40  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio 0.5 M pH 5.5, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bi(III), realizándose la voltamperometría de onda cuadrada según los parámetros de potencial de deposición, -1.40 V durante 180 s. Seguidamente y tras dejar un tiempo de

equilibrio de 15 s, se realizó el barrido de potenciales de -1.20 a -0.60 V adquiriendo un valor de corriente cada 0.01 V y a una amplitud de 0.05 V y una frecuencia de 20 Hz. Los electrodos se lavaron previamente mediante la realización de una ciclovoltamperometría en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M, 80 µL/electrodo. Las curvas de calibrado se ajustaron a la ecuación logarítmica de 4-parámetros, cuya fórmula es:  $y = [(A-B)/1-(x/C)^D] + B$ , donde A es la absorbancia máxima, mientras que B es la mínima. D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoideal y C es la concentración de analito a la cual la señal se inhibe un 50%. A no ser que se indique lo contrario, los datos mostrados corresponden a un promedio de dos réplicas por punto. La detectabilidad del ensayo se estableció por medio del cálculo de la IC<sub>10</sub>, que corresponde a la concentración de analito correspondiente a un 10% de la señal máxima.



## **7 Bibliografía**

---

1. Lanktree, M. B.; Rajakumar, C.; Brunt, J. H.; Koschinsky, M. L.; Connelly, P. W.; Hegele, R. A., Determination of lipoprotein(a) kringle repeat number from genomic DNA: copy number variation genotyping using qPCR. *Journal of Lipid Research* **2009**, *50* (4), 768-772.
2. Ministerio de Sanidad, S. S. e. I., La salud y el sistema sanitario en 100 tablas. **2016**.
3. Mendis S., P. P., and B. Norrving, Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. *World Health Organization* **2011**.
4. Mathers, C. D.; Loncar, D., Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine* **2006**, *3* (11), e442.
5. Yang, Z.; Min Zhou, D., Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry* **2006**, *39* (8), 771-780.
6. MEMBERS, N. W. G.; Morrow, D. A.; Cannon, C. P.; Jesse, R. L.; Newby, L. K.; Ravkilde, J.; Storrow, A. B.; Wu, A. H. B.; Christenson, R. H., National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Characteristics and Utilization of Biochemical Markers in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* **2007**, *115* (13), e356-e375.
7. Kyaw Thu Moe, P. W., Current Trends in Diagnostic Biomarkers of Acute Coronary Syndrome. *Annals Academy of Medicine Singapore* **2010**, *39* (3), 210-215.
8. Lee, T. H.; Rouan, G. W.; Weisberg, M. C.; Brand, D. A.; Acampora, D.; Stasiulewicz, C.; Walshon, J.; Terranova, G.; Gottlieb, L.; Goldstein-Wayne, B.; et al., Clinical characteristics and natural history of patients with acute myocardial infarction sent home from the emergency room. *Am J Cardiol* **1987**, *60* (4), 219-24.
9. McCarthy, B. D.; Beshansky, J. R.; D'Agostino, R. B.; Selker, H. P., Missed diagnoses of acute myocardial infarction in the emergency department: results from a multicenter study. *Annals of emergency medicine* **1993**, *22* (3), 579-82.
10. Rusnak, R. A.; Stair, T. O.; Hansen, K.; Fastow, J. S., Litigation against the emergency physician: common features in cases of missed myocardial infarction. *Annals of emergency medicine* **1989**, *18* (10), 1029-34.
11. Pelberg, A. L., Missed myocardial infarction in the emergency room. *Quality assurance and utilization review : official journal of the American College of Utilization Review Physicians* **1989**, *4* (2), 39-42.
12. Anderson, J. L.; Adams, C. D.; Antman, E. M.; Bridges, C. R.; Califf, R. M.; Casey, D. E., Jr.; Chavey, W. E., 2nd; Fesmire, F. M.; Hochman, J. S.; Levin, T. N.; Lincoff, A. M.; Peterson, E. D.; Theroux, P.; Wenger, N. K.; Wright, R. S.; Smith, S. C., Jr.; Jacobs, A. K.; Adams, C. D.; Anderson, J. L.; Antman, E. M.; Halperin, J. L.; Hunt, S. A.; Krumholz, H. M.; Kushner, F. G.; Lytle, B. W.; Nishimura, R.; Ornato, J. P.; Page, R. L.; Riegel, B., ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol* **2007**, *50* (7), e1-e157.
13. Savonitto, S.; Ardissino, D.; Granger, C. B.; Morando, G.; Prando, M. D.; Mafri, A.; Cavallini, C.; Melandri, G.; Thompson, T. D.; Vahanian, A.; Ohman, E. M.; Califf, R. M.; Van de Werf, F.; Topol, E. J., Prognostic value of the admission electrocardiogram in acute coronary syndromes. *Jama* **1999**, *281* (8), 707-13.
14. Kaul, P.; Newby, L. K.; Fu, Y.; Hasselblad, V.; Mahaffey, K. W.; Christenson, R. H.; Harrington, R. A.; Ohman, E. M.; Topol, E. J.; Califf, R. M.; Van de Werf, F.; Armstrong, P. W., Troponin T and quantitative ST-segment depression offer complementary prognostic information in the risk stratification of acute coronary syndrome patients. *J Am Coll Cardiol* **2003**, *41* (3), 371-80.

15. Forest, R. S.; Shofer, F. S.; Sease, K. L.; Hollander, J. E., Assessment of the standardized reporting guidelines ECG classification system: the presenting ECG predicts 30-day outcomes. *Annals of emergency medicine* **2004**, *44* (3), 206-12.
16. Kontos, M. C.; Roberts, B. D.; Tatum, J. L.; Roberts, C. S.; Jesse, R. L.; Ornato, J. P., Mortality based on the presenting electrocardiogram in patients with myocardial infarction in the troponin era. *Am J Emerg Med* **2009**, *27* (2), 146-52.
17. Ting, H. H.; Lee, T. H.; Soukup, J. R.; Cook, E. F.; Tosteson, A. N.; Brand, D. A.; Rouan, G. W.; Goldman, L., Impact of physician experience on triage of emergency room patients with acute chest pain at three teaching hospitals. *The American journal of medicine* **1991**, *91* (4), 401-8.
18. Lee, T. H.; Cook, E. F.; Weisberg, M.; Sargent, R. K.; Wilson, C.; Goldman, L., Acute chest pain in the emergency room. Identification and examination of low-risk patients. *Arch Intern Med* **1985**, *145* (1), 65-9.
19. Grijseels, E. W.; Deckers, J. W.; Hoes, A. W.; Boersma, E.; Hartman, J. A.; van der Does, E.; Simoons, M. L., Implementation of a pre-hospital decision rule in general practice. Triage of patients with suspected myocardial infarction. *Eur Heart J* **1996**, *17* (1), 89-95.
20. Friess, U.; Stark, M., Cardiac markers: a clear cause for point-of-care testing. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *393* (5), 1453-62.
21. Marco, M.-P.; Gee, S.; Hammock, B. D., Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1995**, *14* (8), 415-425.
22. Mathias, P. C.; Ganesh, N.; Cunningham, B. T., Application of Photonic Crystal Enhanced Fluorescence to a Cytokine Immunoassay. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (23), 9013-9020.
23. Pultar, J.; Sauer, U.; Domnanich, P.; Preininger, C., Aptamer-antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (5), 1456-1461.
24. Raj, V.; Hari, P. R.; Antony, M.; Sreenivasan, K., Selective estimation of C-reactive protein in serum using polymeric formulations without antibody. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *146* (1), 23-27.
25. Meyer, M. H. F.; Hartmann, M.; Keusgen, M., SPR-based immunosensor for the CRP detection—A new method to detect a well known protein. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21* (10), 1987-1990.
26. Park, J. P.; Cropek, D. M.; Banta, S., High affinity peptides for the recognition of the heart disease biomarker troponin I identified using phage display. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, *105* (4), 678-686.
27. Dutra, R. F.; Kubota, L. T., An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. *Clinica Chimica Acta* **2007**, *376* (1-2), 114-120.
28. Tang, L.; Kang, K. A., Preliminary Study of Fiber Optic Multi-Cardiac-Marker Biosensing System for Rapid Coronary Heart Disease Diagnosis and Prognosis. In *Oxygen Transport to Tissue XXVII*, Cicco, G.; Bruley, D. F.; Ferrari, M.; Harrison, D. K., Eds. Springer US: Boston, MA, 2006; pp 101-106.
29. Suprun, E. V.; Shilovskaya, A. L.; Lisitsa, A. V.; Bulko, T. V.; Shumyantseva, V. V.; Archakov, A. I., Electrochemical Immunosensor Based on Metal Nanoparticles for Cardiac Myoglobin Detection in Human Blood Plasma. *Electroanalysis* **2011**, *23* (5), 1051-1057.
30. Zhuo, Y.; Yi, W.-J.; Lian, W.-B.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Chen, A.; Hu, C.-M., Ultrasensitive electrochemical strategy for NT-proBNP detection with gold nanochains and horseradish peroxidase complex amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (5), 2188-2193.
31. Zhou, F.; Lu, M.; Wang, W.; Bian, Z.-P.; Zhang, J.-R.; Zhu, J.-J., Electrochemical Immunosensor for Simultaneous Detection of Dual Cardiac Markers Based on a Poly(Dimethylsiloxane)-Gold Nanoparticles Composite Microfluidic Chip: A Proof of Principle. *Clinical Chemistry* **2010**, *56* (11), 1701-1707.

32. Prasad, S.; Selvam, A. P.; Reddy, R. K.; Love, A., Silicon Nanosensor for Diagnosis of Cardiovascular Proteomic Markers. *Journal of Laboratory Automation* **2013**, *18* (2), 143-151.
33. Danne, O.; Mockel, M.; Lueders, C.; Mugge, C.; Zschunke, G. A.; Lufft, H.; Muller, C.; Frei, U., Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* **2003**, *91* (9), 1060-7.
34. LeLeiko, R. M.; Vaccari, C. S.; Sola, S.; Merchant, N.; Nagamia, S. H.; Thoenes, M.; Khan, B. V., Usefulness of elevations in serum choline and free F2)-isoprostane to predict 30-day cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* **2009**, *104* (5), 638-43.
35. Hochholzer, W.; Morrow, D. A.; Giugliano, R. P., Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J* **2010**, *160* (4), 583-94.
36. Wollert, K. C.; Kempf, T.; Peter, T.; Olofsson, S.; James, S.; Johnston, N.; Lindahl, B.; Horn-Wichmann, R.; Brabant, G.; Simoons, M. L.; Armstrong, P. W.; Califf, R. M.; Drexler, H.; Wallentin, L., Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* **2007**, *115* (8), 962-71.
37. Kelly, D.; Squire, I. B.; Khan, S. Q.; Quinn, P.; Struck, J.; Morgenthaler, N. G.; Davies, J. E.; Ng, L. L., C-terminal provasopressin (copeptin) is associated with left ventricular dysfunction, remodeling, and clinical heart failure in survivors of myocardial infarction. *J Card Fail* **2008**, *14* (9), 739-45.
38. Staub, D.; Morgenthaler, N. G.; Buser, C.; Breidthardt, T.; Potocki, M.; Noveanu, M.; Reichlin, T.; Bergmann, A.; Mueller, C., Use of copeptin in the detection of myocardial ischemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2009**, *399* (1-2), 69-73.
39. Keller, T.; Tzikas, S.; Zeller, T.; Czyn, E.; Lillpopp, L.; Ojeda, F. M.; Roth, A.; Bickel, C.; Baldus, S.; Sinning, C. R.; Wild, P. S.; Lubos, E.; Peetz, D.; Kunde, J.; Hartmann, O.; Bergmann, A.; Post, F.; Lackner, K. J.; Genth-Zotz, S.; Nicaud, V.; Tiret, L.; Munzel, T. F.; Blankenberg, S., Copeptin improves early diagnosis of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **2010**, *55* (19), 2096-106.
40. R. González-Juanatey, J.; Lago Paz, F.; Eiras, S.; Teijeira-Fernández, E., Adipocitocinas como nuevos marcadores de la enfermedad cardiovascular. Perspectivas fisiopatológicas y clínicas. *Revista Española de Cardiología* **2009**, *62* (Supl.2), 9-16.
41. Kadowaki, T.; Yamauchi, T., Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews* **2005**, *26* (3), 439-51.
42. Wolk, R.; Berger, P.; Lennon, R. J.; Brilakis, E. S.; Davison, D. E.; Somers, V. K., Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *Eur Heart J* **2007**, *28* (3), 292-8.
43. Januzzi, J. L., Jr.; Peacock, W. F.; Maisel, A. S.; Chae, C. U.; Jesse, R. L.; Baggish, A. L.; O'Donoghue, M.; Sakhuja, R.; Chen, A. A.; van Kimmenade, R. R.; Lewandrowski, K. B.; Lloyd-Jones, D. M.; Wu, A. H., Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol* **2007**, *50* (7), 607-13.
44. Rehman, S. U.; Mueller, T.; Januzzi, J. L., Jr., Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* **2008**, *52* (18), 1458-65.
45. Breidthardt, T.; Balmelli, C.; Twerenbold, R.; Mosimann, T.; Espinola, J.; Haaf, P.; Thalmann, G.; Moehring, B.; Mueller, M.; Meller, B.; Reichlin, T.; Murray, K.; Ziller, R.; Benkert, P.; Osswald, S.; Mueller, C., Heart failure therapy-induced early ST2 changes may offer long-term therapy guidance. *J Card Fail* **2013**, *19* (12), 821-8.
46. Scanu, A. M.; Fless, G. M., Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. *The Journal of Clinical Investigation* **1990**, *85* (6), 1709-1715.
47. Garrido, J. A.; Garcés, C.; de Oya, M., [Diet and atherosclerosis]. *Revista española de cardiología* **1998**, *51* Suppl 6, 36-44.
48. Miles, L. A.; Fless, G. M.; Levin, E. G.; Scanu, A. M.; Plow, E. F., A POTENTIAL BASIS FOR THE THROMBOTIC RISKS ASSOCIATED WITH LIPOPROTEIN(A). *Nature* **1989**, *339* (6222), 301-303.

49. Thygesen, K.; Alpert, J. S.; Jaffe, A. S.; Simoons, M. L.; Chaitman, B. R.; White, H. D.; Katus, H. A.; Lindahl, B.; Morrow, D. A.; Clemmensen, P. M.; Johanson, P.; Hod, H.; Underwood, R.; Bax, J. J.; Bonow, R. O.; Pinto, F.; Gibbons, R. J.; Fox, K. A.; Atar, D.; Newby, L. K.; Galvani, M.; Hamm, C. W.; Uretsky, B. F.; Steg, P. G.; Wijns, W.; Bassand, J. P.; Menasche, P.; Ravkilde, J.; Ohman, E. M.; Antman, E. M.; Wallentin, L. C.; Armstrong, P. W.; Simoons, M. L.; Januzzi, J. L.; Nieminen, M. S.; Gheorghiade, M.; Filippatos, G.; Luepker, R. V.; Fortmann, S. P.; Rosamond, W. D.; Levy, D.; Wood, D.; Smith, S. C.; Hu, D.; Lopez-Sendon, J. L.; Robertson, R. M.; Weaver, D.; Tendera, M.; Bove, A. A.; Parkhomenko, A. N.; Vasilieva, E. J.; Mendis, S., Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation* **2012**, *126* (16), 2020-35.
50. Venge, P.; Johnston, N.; Lindahl, B.; James, S., Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* **2009**, *54* (13), 1165-72.
51. Mingels, A.; Jacobs, L.; Michielsen, E.; Swaanenburg, J.; Wodzig, W.; van Dieijen-Visser, M., Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays. *Clin Chem* **2009**, *55* (1), 101-8.
52. Ungerer, J. P. J.; Tate, J. R.; Pretorius, C. J., Discordance with 3 Cardiac Troponin I and T Assays: Implications for the 99th Percentile Cutoff. *Clinical Chemistry* **2016**, *62* (8), 1106-1114.
53. Frankenstein, L.; Wu, A. H. B.; Hallermayer, K.; Wians, F. H.; Giannitsis, E.; Katus, H. A., Biological Variation and Reference Change Value of High-Sensitivity Troponin T in Healthy Individuals during Short and Intermediate Follow-up Periods. *Clinical Chemistry* **2011**, *57* (7), 1068-1071.
54. Eggers, K. M.; Jaffe, A. S.; Lind, L.; Venge, P.; Lindahl, B., Value of Cardiac Troponin I Cutoff Concentrations below the 99th Percentile for Clinical Decision-Making. *Clinical Chemistry* **2009**, *55* (1), 85-92.
55. K., B., A New Serum Type System in Man: The LP System. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1963**, *59*, 14.
56. Harvie, N. R.; Schultz, J. S., Studies of Lp-Lipoprotein as a Quantitative Genetic Trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1970**, *66* (1), 99-103.
57. Albers, J. J.; Wahl, P.; Hazzard, W. R., Quantitative genetic studies of the human plasma Lp(a) lipoprotein. *Biochemical genetics* **1974**, *11* (6), 475-86.
58. Albers, J. J.; Hazzard, W. R., Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Lipids* **1974**, *9* (1), 15-26.
59. Guyton, J. R.; Dahlen, G. H.; Patsch, W.; Kautz, J. A.; Gotto, A. M., Jr., Relationship of plasma lipoprotein Lp(a) levels to race and to apolipoprotein B. *Arteriosclerosis* **1985**, *5* (3), 265-72.
60. Gaubatz, J. W.; Heideman, C.; Gotto, A. M.; Morrisett, J. D.; Dahlen, G. H., Human plasma lipoprotein [a]. Structural properties. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258* (7), 4582-9.
61. Fless, G. M.; Rolih, C. A.; Scanu, A. M., Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259* (18), 11470-8.
62. Utermann, G.; Weber, W., Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *FEBS Letters* **1983**, *154* (2), 357-361.
63. Armstrong, V. W.; Walli, A. K.; Seidel, D., Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a). *Journal of Lipid Research* **1985**, *26* (11), 1314-23.
64. Fless, G. M.; ZumMallen, M. E.; Scanu, A. M., Isolation of apolipoprotein(a) from lipoprotein(a). *Journal of Lipid Research* **1985**, *26* (10), 1224-9.
65. Fless, G. M.; ZumMallen, M. E.; Scanu, A. M., Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261* (19), 8712-8.

66. Seman, L. J.; Breckenridge, W. C., Isolation and partial characterization of apolipoprotein (a) from human lipoprotein (a). *Biochemistry and Cell Biology* **1986**, *64* (10), 999-1009.
67. Frank, S. L.; Klisak, I.; Sparkes, R. S.; Mohandas, T.; Tomlinson, J. E.; McLean, J. W.; Lawn, R. M.; Lusis, A. J., The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Human Genetics* **1988**, *79* (4), 352-356.
68. Rainwater, D. L.; Lanford, R. E., Production of lipoprotein(a) by primary baboon hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1989**, *1003* (1), 30-35.
69. Gaubatz, J. W.; Chari, M. V.; Nava, M. L.; Guyton, J. R.; Morrisett, J. D., Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein [a]. *Journal of Lipid Research* **1987**, *28* (1), 69-79.
70. Knott, T. J.; Pease, R. J.; Powell, L. M.; Wallis, S. C.; Rall, S. C.; Innerarity, T. L.; Blackhart, B.; Taylor, W. H.; Marcel, Y.; Milne, R.; Johnson, D.; Fuller, M.; Lusis, A. J.; McCarthy, B. J.; Mahley, R. W.; Levy-Wilson, B.; Scott, J., Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* **1986**, *323* (6090), 734-738.
71. Aguib, Y.; Al Suwaidi, J., The Copenhagen City Heart Study (Østerbrounderøgelsen). *Global Cardiology Science & Practice* **2015**, *2015* (3), 33.
72. Fless, G. M.; Pfaffinger, D. J.; Eisenbart, J. D.; Scanu, A. M., Solubility, immunochemical, and lipoprotein binding properties of apoB-100-apo[a], the protein moiety of lipoprotein[a]. *Journal of Lipid Research* **1990**, *31* (5), 909-18.
73. Ehnholm, C.; Garoff, H.; Renkonen, O.; Simons, K., Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry* **1972**, *11* (17), 3229-3232.
74. Eaton, D. L.; Fless, G. M.; Kohr, W. J.; McLean, J. W.; Xu, Q. T.; Miller, C. G.; Lawn, R. M.; Scanu, A. M., Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84* (10), 3224-8.
75. Albers, J. J.; Marcovina, S. M.; Lodge, M. S., The unique lipoprotein(a): properties and immunochemical measurement. *Clinical Chemistry* **1990**, *36* (12), 2019-26.
76. Guevara, J.; Knapp, R. D.; Honda, S.; Northup, S. R.; Morrisett, J. D., A structural assessment of the apo[a] protein of human lipoprotein[a]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **1992**, *12* (2), 188-199.
77. Hoek, Y. Y. v. d.; Wittekoek, M. E.; Beisiegel, U.; Kastelein, J. J. P.; Koschinsky, M., The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeat kringle are present in variably-sized isoforms. *Human Molecular Genetics* **1993**, *2* (4), 361-366.
78. Lackner, C.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H., Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Human Molecular Genetics* **1993**, *2* (7), 933-940.
79. Krempler, F.; Kostner, G.; Bolzano, K.; Sandhofer, F., Lipoprotein (a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. *Biochim Biophys Acta* **1979**, *575* (1), 63-70.
80. Bersot, T. P.; Innerarity, T. L.; Pitas, R. E.; Rall, S. C., Jr.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W., Fat feeding in humans induces lipoproteins of density less than 1.006 that are enriched in apolipoprotein [a] and that cause lipid accumulation in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* **1986**, *77* (2), 622-630.
81. Albers, J. J.; Cabana, V. G.; Warnick, G. R.; Hazzard, W. R., Lp(a) lipoprotein: relationship to sinking pre-beta lipoprotein hyperlipoproteinemia, and apolipoprotein B. *Metabolism: clinical and experimental* **1975**, *24* (9), 1047-54.
82. Cenarro, A.; Puzo, J.; Ferrando, J.; Mateo-Gallego, R.; Bea, A. M.; Calmarza, P.; Jarauta, E.; Civeira, F., Effect of Nicotinic acid/Laropiprant in the lipoprotein(a) concentration with regard to baseline lipoprotein(a) concentration and LPA genotype. *Metabolism-Clinical and Experimental* **2014**, *63* (3), 365-371.

83. Albers, J. J.; Taggart, H. M.; Applebaum-Bowden, D.; Haffner, S.; Chesnut, C. H., 3rd; Hazzard, W. R., Reduction of lecithin-cholesterol acyltransferase, apolipoprotein D and the Lp(a) lipoprotein with the anabolic steroid stanozolol. *Biochim Biophys Acta* **1984**, *795* (2), 293-6.
84. Knight, B. L.; Perombelon, Y. F. N.; Soutar, A. K.; Wade, D. P.; Seed, M., Catabolism of lipoprotein(a) in familial hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis* **1991**, *87* (2), 227-237.
85. Sattler, W.; Kostner, G. M.; Waeg, G.; Esterbauer, H., Oxidation of lipoprotein Lp(a). A comparison with low-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1991**, *1081* (1), 65-74.
86. Utermann, G., The Mysteries of Lipoprotein(a). *Science* **1989**, *246* (4932), 904-910.
87. Utermann, G.; Hoppichler, F.; Dieplinger, H.; Seed, M.; Thompson, G.; Boerwinkle, E., Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein (a) levels: multiplicative interaction of two gene loci associated with premature atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86* (11), 4171-4174.
88. Gaubatz, J. W.; Ghanem, K. I.; Guevara, J.; Nava, M. L.; Patsch, W.; Morrisett, J. D., Polymorphic forms of human apolipoprotein[a]: inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein[a]. *Journal of Lipid Research* **1990**, *31* (4), 603-13.
89. Utermann, G.; Menzel, H. J.; Kraft, H. G.; Duba, H. C.; Kemmler, H. G.; Seitz, C., Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *Journal of Clinical Investigation* **1987**, *80* (2), 458-465.
90. Clarke, R.; Peden, J. F.; Hopewell, J. C.; Kyriakou, T.; Goel, A.; Heath, S. C.; Parish, S.; Barlera, S.; Franzosi, M. G.; Rust, S.; Bennett, D.; Silveira, A.; Malarstig, A.; Green, F. R.; Lathrop, M.; Gigante, B.; Leander, K.; de Faire, U.; Seedorf, U.; Hamsten, A.; Collins, R.; Watkins, H.; Farrall, M.; Consortium, P., Genetic Variants Associated with Lp(a) Lipoprotein Level and Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361* (26), 2518-2528.
91. Kronenberg, F.; Utermann, G., Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *Journal of Internal Medicine* **2013**, *273* (1), 6-30.
92. Rosengren, A.; Wilhelmsen, L.; Eriksson, E.; Risberg, B.; Wedel, H., Lipoprotein (a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *BMJ : British Medical Journal* **1990**, *301* (6763), 1248-1251.
93. Kraft, H. G.; Lingenhel, A.; Kochl, S.; Hoppichler, F.; Kronenberg, F.; Abe, A.; Muhlberger, V.; Schonitzer, D.; Utermann, G., Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1996**, *16* (6), 713-719.
94. Katsouras, C. S.; Karabina, S. A.; Tambaki, A. P.; Goudevenos, J. A.; Michalis, L. K.; Tsirois, L. D.; Stroumbis, C. S.; Elisaf, M. S.; Sideris, D. A.; Tselepis, A. D., Serum lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) isoforms: association with the severity of clinical presentation in patients with coronary heart disease. *Journal of Cardiovascular Risk* **2001**, *8* (5), 311-317.
95. Anurad, E.; Boffa, M. B.; Koschinsky, M. L.; Berglund, L., Lipoprotein(a): A unique risk factor for cardiovascular disease. *Clinics in Laboratory Medicine* **2006**, *26* (4), 751-+.
96. Hopewell, J. C.; Clarke, R.; Seedorf, U.; Farrall, M.; Hamsten, A.; Collins, R.; Watkins, H.; Consortium, P., Association of Apolipoprotein(a) Isoforms With Coronary Heart Disease is Mediated Through Plasma Lipoprotein(a) Levels. *Circulation* **2010**, *122* (21).
97. Hopewell, J. C.; Seedorf, U.; Farrall, M.; Parish, S.; Kyriakou, T.; Goel, A.; Hamsten, A.; Collins, R.; Watkins, H.; Clarke, R.; Consortium, P., Impact of lipoprotein(a) levels and apolipoprotein(a) isoform size on risk of coronary heart disease. *Journal of Internal Medicine* **2014**, *276* (3), 260-268.
98. Koschinsky, M. L., Novel insights into Lp(a) physiology and pathogenicity: more questions than answers? *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* **2006**, *6* (4), 267-78.
99. Koschinsky, M. L.; Marcovina, S. M., Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity. *Current opinion in lipidology* **2004**, *15* (2), 167-74.

100. Scanu, A. M., Lipoprotein(a) and the atherothrombotic process: mechanistic insights and clinical implications. *Curr Atheroscler Rep* **2003**, *5* (2), 106-13.
101. Brown, M. S.; Goldstein, J. L., Plasma lipoproteins: teaching old dogmas new tricks. *Nature* **1987**, *330* (6144), 113-4.
102. Nordestgaard, B. G.; Chapman, M. J.; Ray, K.; Borén, J.; Andreotti, F.; Watts, G. F.; Ginsberg, H.; Amarenco, P.; Catapano, A.; Descamps, O. S.; Fisher, E.; Kovonen, P. T.; Kuivenhoven, J. A.; Lesnik, P.; Masana, L.; Reiner, Z.; Taskinen, M.-R.; Tokgözoğlu, L.; Tybjaerg-Hansen, A., Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *European Heart Journal* **2010**, *31* (23), 2844-2853.
103. <http://www.lipoproteinafoundation.org/>.
104. Mortensen, M. B.; Afzal, S.; Nordestgaard, B. G.; Falk, E., Primary Prevention With Statins: ACC/AHA Risk-Based Approach Versus Trial-Based Approaches to Guide Statin Therapy. *Journal of the American College of Cardiology* **2015**, *66* (24), 2699-2709.
105. Deloukas, P.; Kanoni, S.; Willenborg, C.; Farrall, M.; Assimes, T. L.; Thompson, J. R.; Ingelsson, E.; Saleheen, D.; Erdmann, J.; Goldstein, B. A.; Stirrups, K.; König, I. R.; Cazier, J. B.; Johansson, A.; Hall, A. S.; Lee, J. Y.; Willer, C. J.; Chambers, J. C.; Esko, T.; Folkersen, L.; Goel, A.; Grundberg, E.; Havulinna, A. S.; Ho, W. K.; Hopewell, J. C.; Eriksson, N.; Kleber, M. E.; Kristiansson, K.; Lundmark, P.; Lyytikäinen, L. P.; Rafelt, S.; Shungin, D.; Strawbridge, R. J.; Thorleifsson, G.; Tikkanen, E.; Van Zuydam, N.; Voight, B. F.; Waite, L. L.; Zhang, W.; Ziegler, A.; Absher, D.; Altshuler, D.; Balmforth, A. J.; Barroso, I.; Braund, P. S.; Burgdorf, C.; Claudi-Boehm, S.; Cox, D.; Dimitriou, M.; Do, R.; Doney, A. S.; El Mokhtari, N.; Eriksson, P.; Fischer, K.; Fontanillas, P.; Franco-Cereceda, A.; Gigante, B.; Groop, L.; Gustafsson, S.; Hager, J.; Hallmans, G.; Han, B. G.; Hunt, S. E.; Kang, H. M.; Illig, T.; Kessler, T.; Knowles, J. W.; Kolovou, G.; Kuusisto, J.; Langenberg, C.; Langford, C.; Leander, K.; Lokki, M. L.; Lundmark, A.; McCarthy, M. I.; Meisinger, C.; Melander, O.; Mihailov, E.; Maouche, S.; Morris, A. D.; Muller-Nurasyid, M.; Nikus, K.; Peden, J. F.; Rayner, N. W.; Rasheed, A.; Rosinger, S.; Rubin, D.; Rumpf, M. P.; Schafer, A.; Sivananthan, M.; Song, C.; Stewart, A. F.; Tan, S. T.; Thorgeirsson, G.; van der Schoot, C. E.; Wagner, P. J.; Wells, G. A.; Wild, P. S.; Yang, T. P.; Amouyel, P.; Arveiler, D.; Basart, H.; Boehnke, M.; Boerwinkle, E.; Brambilla, P.; Cambien, F.; Cupples, A. L.; de Faire, U.; Dehghan, A.; Diemert, P.; Epstein, S. E.; Evans, A.; Ferrario, M. M.; Ferrieres, J.; Gauguier, D.; Go, A. S.; Goodall, A. H.; Gudnason, V.; Hazen, S. L.; Holm, H.; Iribarren, C.; Jang, Y.; Kahonen, M.; Kee, F.; Kim, H. S.; Klopp, N.; Koenig, W.; Kratzer, W.; Kuulasmaa, K.; Laakso, M.; Laaksonen, R.; Lee, J. Y.; Lind, L.; Ouwehand, W. H.; Parish, S.; Park, J. E.; Pedersen, N. L.; Peters, A.; Quertermous, T.; Rader, D. J.; Salomaa, V.; Schadt, E.; Shah, S. H.; Sinisalo, J.; Stark, K.; Stefansson, K.; Tregouet, D. A.; Virtamo, J.; Wallentin, L.; Wareham, N.; Zimmermann, M. E.; Nieminen, M. S.; Hengstenberg, C.; Sandhu, M. S.; Pastinen, T.; Syvanen, A. C.; Hovingh, G. K.; Dedoussis, G.; Franks, P. W.; Lehtimäki, T.; Metspalu, A.; Zalloua, P. A.; Siegbahn, A.; Schreiber, S.; Ripatti, S.; Blankenberg, S. S.; Perola, M.; Clarke, R.; Boehm, B. O.; O'Donnell, C.; Reilly, M. P.; Marz, W.; Collins, R.; Kathiresan, S.; Hamsten, A.; Kooner, J. S.; Thorsteinsdottir, U.; Danesh, J.; Palmer, C. N.; Roberts, R.; Watkins, H.; Schunkert, H.; Samani, N. J., Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics* **2013**, *45* (1), 25-33.
106. Thanassoulis, G.; Campbell, C. Y.; Owens, D. S.; Smith, J. G.; Smith, A. V.; Peloso, G. M.; Kerr, K. F.; Pechlivanis, S.; Budoff, M. J.; Harris, T. B.; Malhotra, R.; O'Brien, K. D.; Kamstrup, P. R.; Nordestgaard, B. G.; Tybjaerg-Hansen, A.; Allison, M. A.; Aspelund, T.; Criqui, M. H.; Heckbert, S. R.; Hwang, S. J.; Liu, Y.; Sjogren, M.; van der Pals, J.; Kalsch, H.; Muhleisen, T. W.; Nothen, M. M.; Cupples, L. A.; Caslake, M.; Di Angelantonio, E.; Danesh, J.; Rotter, J. I.; Sigurdsson, S.; Wong, Q.; Erbel, R.; Kathiresan, S.; Melander, O.; Gudnason, V.; O'Donnell, C. J.; Post, W. S., Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* **2013**, *368* (6), 503-12.
107. CDC reference: [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6321a3.html](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6321a3.html).
108. Albers, J. J.; Adolphson, J. L.; Hazzard, W. R., Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Journal of Lipid Research* **1977**, *18* (3), 331-8.

109. Molinari, E.; Pichler, P.; Krempler, F.; Kostner, G., A rapid screening method for pathological lipoprotein Lp(a) concentrations by counterimmunoelectrophoresis. *Clinica Chimica Acta* **1983**, *128* (2), 373-378.
110. Gaubatz, J. W.; Cushing, G. L.; Morrisett, J. D., Quantitation, isolation, and characterization of human lipoprotein (a). *Methods in enzymology* **1986**, *129*, 167-86.
111. Borque, L.; Rus, A.; Delcura, J.; Maside, C.; Escanero, J., AUTOMATED LATEX NEPHELOMETRIC IMMUNOASSAY FOR THE MEASUREMENT OF SERUM LIPOPROTEIN(A). *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1993**, *7* (2), 105-110.
112. Tiran, A.; Tiran, B.; Hojas, S.; Kostner, G. M.; Wilderstruschnig, M. M., IMMUNOQUANTIFICATION OF LIPOPROTEIN(A) - COMPARISON OF NEPHELOMETRY WITH ELECTROIMMUNODIFFUSION. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1993**, *7* (5), 256-262.
113. Abe, A.; Maeda, S.; Makino, K.; Seishima, M.; Shimokawa, K.; Noma, A.; Kawade, M., Enzyme-linked immunosorbent assay of lipoprotein(a) in serum and cord blood. *Clinica Chimica Acta* **1988**, *177* (1), 31-40.
114. Duvic, C. R.; Smith, G.; Sledge, W. E.; Lee, L. T.; Murray, M. D.; Roheim, P. S.; Gallaher, W. R.; Thompson, J. J., Identification of a mouse monoclonal antibody, LHLP-1, specific for human Lp(a). *Journal of Lipid Research* **1985**, *26* (5), 540-8.
115. Fless, G. M.; Snyder, M. L.; Scanu, A. M., Enzyme-linked immunoassay for Lp[a]. *Journal of Lipid Research* **1989**, *30* (5), 651-62.
116. Guo, H. C.; Armstrong, V. W.; Luc, G.; Billardon, C.; Goulinet, S.; Nustede, R.; Seidel, D.; Chapman, M. J., Characterization of five mouse monoclonal antibodies to apolipoprotein[a] from human Lp[a]: evidence for weak plasminogen reactivity. *Journal of Lipid Research* **1989**, *30* (1), 23-37.
117. Labeur, C.; Michiels, G.; Bury, J.; Usher, D. C.; Rosseneu, M., Lipoprotein(a) quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clinical Chemistry* **1989**, *35* (7), 1380-4.
118. Maerz, W.; Siekmeier, R.; Gross, E.; Gross, W., Determination of lipoprotein (a): Enzyme immunoassay and immunoradiometric assay compared. *Clinica Chimica Acta* **1993**, *214* (2), 153-163.
119. Marcovina, S. M.; Albers, J. J. New monoclonal antibody specific for lipoprotein a and apo-lipoprotein a|for specific and sensitive immunoassay without interference from plasminogen or low density lipoprotein, also new hybridoma. WO9619500-A; WO9619500-A1; AU9645257-A; US5712157-A.
120. Taddei-Peters, W. C.; Butler, S. M. New immuno:reactive peptide(s) of apo:lipoprotein|used for prodn. of antibodies and development of immunoassays, for the detection and quantification of apo(a). EP659765-A2; AU9481606-A; CA2138605-A; FI9405976-A; JP7324100-A; ZA9410145-A; EP659765-A3; US5597908-A; AU683508-B; US5708138-A; US5786156-A; US5874544-A.
121. Taddeipeters, W. C.; Butman, B. T.; Jones, G. R.; Venetta, T. M.; Macomber, P. F.; Ransom, J. H., QUANTIFICATION OF LIPOPROTEIN(A) PARTICLES CONTAINING VARIOUS APOLIPOPROTEIN(A) ISOFORMS BY A MONOCLONAL ANTI-APO(A) CAPTURE ANTIBODY AND A POLYCLONAL ANTI-APOLIPOPROTEIN-B DETECTION ANTIBODY SANDWICH ENZYME-IMMUNOASSAY. *Clinical Chemistry* **1993**, *39* (7), 1382-1389.
122. Vu Dac, N.; Mezdour, H.; Parra, H. J.; Luc, G.; Luyeye, I.; Fruchart, J. C., A selective bi-site immunoenzymatic procedure for human Lp[a] lipoprotein quantification using monoclonal antibodies against apo[a] and apoB. *Journal of Lipid Research* **1989**, *30* (9), 1437-43.
123. Wong, W. L.; Eaton, D. L.; Berloui, A.; Fendly, B.; Hass, P. E., A monoclonal-antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of lipoprotein(a). *Clinical Chemistry* **1990**, *36* (2), 192-7.
124. Sorell, L.; Rojas, G.; Rodríguez, M.; Ramos, C.; Torres, L.; Torres, M. B., A sandwich ELISA based on anti-apo(a) and anti-apo B monoclonal antibodies for lipoprotein(a) measurement. *Clinica Chimica Acta* **1995**, *236* (1), 59-70.

125. Bustos, P.; Muñoz, M.; Ulloa, N.; Godoy, P.; Calvo, C., An ELISA Procedure for Human Lp(a) Quantitation Using Monoclonal Antibodies. *Hybridoma and Hybridomics* **2002**, *21* (3), 211-216.
126. Labeur, C.; Shepherd, J.; Rosseneu, M., Immunological assays of apolipoproteins in plasma: methods and instrumentation. *Clinical Chemistry* **1990**, *36* (4), 591-7.
127. Marcovina, S. M.; Albers, J. J.; Gabel, B.; Koschinsky, M. L.; Gaur, V. P., Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clinical Chemistry* **1995**, *41* (2), 246-55.
128. Marcovina, S. M.; Albers, J. J., Lipoprotein (a) measurements for clinical application. *Journal of Lipid Research* **2016**, *57* (4), 526-537.
129. Tosheska, K.; Labudovic, D.; Alabakovska, S.; Spiroski, M.; Todorova, B., Determination of apolipoprotein(a) isoforms and lipoprotein(a) in children with diabetes mellitus type 1. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi* **2007**, *32* (4), 165-170.
130. Aveynier, E.; Peronnon, C.; Valenti, K.; Laporte, F., Apolipoprotein (a) isoform size determination, relevance and limits of high resolution phenotyping by agarose gel electrophoresis. *Annales De Biologie Clinique* **1998**, *56* (1), 73-78.
131. Pang, R. W. C.; Janus, E. D.; Lam, K. S. L.; Lingenhel, A.; Kraft, H. G., A modified sodium dodecyl sulphate-agarose gel immunoblotting method for apolipoprotein(a) phenotyping using alkaline phosphatase-linked chemiluminescent detection. *Annals of Clinical Biochemistry* **1997**, *34*, 314-316.
132. Lackner, C.; Boerwinkle, E.; Leffert, C. C.; Rahmig, T.; Hobbs, H. H., Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* **1991**, *87* (6), 2153-61.
133. Kraft, H. G.; Köchl, S.; Menzel, H. J.; Sandholzer, C.; Utermann, G., The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Human Genetics* **1992**, *90* (3), 220-230.
134. Kamstrup, P. R.; Tybjaerg-Hansen, A.; Steffensen, R.; Nordestgaard, B. G., Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *Jama* **2009**, *301* (22), 2331-9.
135. Erdel, M.; Hubalek, M.; Lingenhel, A.; Kofler, K.; Duba, H. C.; Utermann, G., Counting the repetitive kringle-IV repeats in the gene encoding human apolipoprotein(a) by fibre-FISH. *Nature genetics* **1999**, *21* (4), 357-8.
136. Lackner, C.; Boerwinkle, E.; Leffert, C. C.; Rahmig, T.; Hobbs, H. H., MOLECULAR-BASIS OF APOLIPOPROTEIN-(A) ISOFORM SIZE HETEROGENEITY AS REVEALED BY PULSED-FIELD GEL-ELECTROPHORESIS. *Journal of Clinical Investigation* **1991**, *87* (6), 2153-2161.
137. Marcovina, S. M.; Hobbs, H. H.; Albers, J. J., Relation between number of apolipoprotein(a) kringle 4 repeats and mobility of isoforms in agarose gel: Basis for a standardized isoform nomenclature. *Clinical Chemistry* **1996**, *42* (3), 436-439.
138. Cardoso, G.; Masso, F.; Montano, L. F.; Medina, A.; Posadas, R.; Zamora, J.; Posadas, C., Simplified method for the detection of Apo(a) isoforms. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **2001**, *31* (4), 401-410.
139. Rainwater, D. L.; Manis, G. S., Immunochemical characterization and quantitation of lipoprotein (a) in baboons. *Atherosclerosis* **1988**, *73* (1), 23-31.
140. Scanu, A. M.; Pfaffinger, D.; Fless, G. M.; Makino, K.; Eisenbart, J.; Hinman, J., Attenuation of immunologic reactivity of lipoprotein(a) by thiols and cysteine-containing compounds. Structural implications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1992**, *12* (4), 424-9.
141. Albers, J. J., The Measurement of Lp(a) and its clinical application. In *Lipoprotein (a)*, Scanu AM ed. ed.; Academic Press Inc.: San Diego, California, 1990.
142. Marcovina, S. M.; Albers, J. J.; Scanu, A. M.; Kennedy, H.; Giaculli, F.; Berg, K.; Couderc, R.; Dati, F.; Rifai, N.; Sakurabayashi, I.; Tate, J. R.; Steinmetz, A., Use of a Reference Material Proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to Evaluate Analytical Methods for the Determination of Plasma Lipoprotein(a). *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (12), 1956-1967.

143. Dati, F.; Tate Jillian, R.; Marcovina Santica, M.; Steinmetz, A., First WHO/IFCC International Reference Reagent for Lipoprotein(a) for Immunoassay – Lp(a) SRM 2B. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2004; Vol. 42, p 670.
144. Dominicczak, M. H.; Caslake, M. J., Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annals of Clinical Biochemistry* **2011**, *48* (6), 498-515.
145. Cordero, A.; Sirera, D.; Bertomeu-Martínez, V., Parámetros lipídicos y objetivos terapéuticos. *Revista Española de Cardiología* **2012**, *12* (Supl.C), 12-18.
146. Contois, J. H.; McConnell, J. P.; Sethi, A. A.; Csako, G.; Devaraj, S.; Hoefner, D. M.; Warnick, G. R., Apolipoprotein B and Cardiovascular Disease Risk: Position Statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clinical Chemistry* **2009**, *55* (3), 407-419.
147. Reisinger, H.; Strobl, W.; Hubrich, B.; Widhalm, K., Determination of serum apolipoprotein B by competitive enzyme-linked immunoassay. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **1991**, *14* (2), 247-252.
148. Hjertén, S., Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **1973**, *87* (2), 325-331.
149. Zangi, R.; Hagen, M.; Berne, B. J., Effect of Ions on the Hydrophobic Interaction between Two Plates. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (15), 4678-4686.
150. Healthcare, G., *Handbook of Affinity Chromatography. Principles and Methods*. 2007.
151. Consortium, U. [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).
152. Magrane, M.; Consortium, U., UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database* **2011**, *2011*, bar009-bar009.
153. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (1), 235-242.
154. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215* (3), 403-410.
155. Smith, T. F.; Waterman, M. S., Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *147* (1), 195-197.
156. Yamada, S.; Inoue, K.; Morishita, R.; Ogihara, T.; Kubono, K.; Kubo, N.; Abe, A.; Sakurabayashi, I., A new Lp(a) assay that is unaffected by apo(a) size polymorphism. *Clinica Chimica Acta* **1999**, *287* (1-2), 29-43.
157. Brunner, C.; Kraft, H. G.; Utermann, G.; Müller, H. J., Cys4057 of apolipoprotein(a) is essential for lipoprotein(a) assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90* (24), 11643-11647.
158. Koschinsky, M. L.; Cote, G. P.; Gabel, B.; Vanderhoek, Y. Y., IDENTIFICATION OF THE CYSTEINE RESIDUE IN APOLIPOPROTEIN(A) THAT MEDIATES EXTRACELLULAR COUPLING WITH APOLIPOPROTEIN-B-100. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (26), 19819-19825.
159. Gabel, B. R.; Koschinsky, M. L., Sequences within Apolipoprotein(a) Kringle IV Types 6–8 Bind Directly to Low-Density Lipoprotein and Mediate Noncovalent Association of Apolipoprotein(a) with Apolipoprotein B-100. *Biochemistry* **1998**, *37* (21), 7892-7898.
160. Frank, S.; Durovic, S.; Kostner, G. M., Structural requirements of apo-a for the lipoprotein-a assembly. *Biochemical Journal* **1994**, *304* (1), 27-30.
161. Frank, S.; Kostner, G. M., The role of apo-(a) kringle-IVs in the assembly of lipoprotein-(a). *Protein Engineering, Design and Selection* **1997**, *10* (3), 291-298.
162. Trieu, V. N.; McConathy, W. J., A Two-step Model for Lipoprotein(a) Formation. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (26), 15471-15474.
163. McCormick, S. P.; Ng, J. K.; Taylor, S.; Flynn, L. M.; Hammer, R. E.; Young, S. G., Mutagenesis of the human apolipoprotein B gene in a yeast artificial chromosome reveals the site of attachment for apolipoprotein(a). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (22), 10147-10151.

164. Arnon, R.; Maron, E.; Sela, M.; Anfinsen, C. B., Antibodies Reactive with Native Lysozyme Elicited by a Completely Synthetic Antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1971**, *68* (7), 1450-1455.
165. Arnon, R.; Sela, M., ANTIBODIES TO A UNIQUE REGION IN LYSOZYME PROVOKED BY A SYNTHETIC ANTIGEN CONJUGATE. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1969**, *62* (1), 163-170.
166. Gabelli, C.; Stark, D. G.; Gregg, R. E.; Brewer, H. B., Separation of apolipoprotein B species by agarose-acrylamide gel electrophoresis. *Journal of Lipid Research* **1986**, *27* (4), 457-60.
167. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72* (1), 248-254.
168. Myrseth, L.-E.; Hagve, T. A.; Prydz, H., Separation and visualization of apolipoprotein B species by sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and immunoblotting. *Analytical Biochemistry* **1989**, *181* (1), 86-89.
169. Kane, J. P.; Hardman, D. A.; Paulus, H. E., Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77* (5), 2465-2469.
170. Curtiss, L. K.; Edgington, T. S., Immunochemical heterogeneity of human plasma apolipoprotein B. I. Apolipoprotein B binding of mouse hybridoma antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257* (24), 15213-21.
171. Eaton, D. L.; Fless, G. M.; Kohr, W. J.; McLean, J. W.; Xu, Q. T.; Miller, C. G.; Lawn, R. M.; Scanu, A. M., Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84* (10), 3224-3228.
172. Chulkova, T. M.; Tertov, V. V., Degradation of human apolipoprotein B-100 by apolipoprotein(a). *FEBS Letters* **1993**, *336* (2), 327-329.
173. Filatov, V. L., Troponin: Structure, Properties, and Mechanism of Functioning. *Biochemistry (Moscow)* **1999**, *64* (9).
174. Wu, A. H. B.; Feng, Y.-J.; Moore, R.; Apple, F. S.; McPherson, P. H.; Buechler, K. F.; Bodor, G.; for, f. t. A. A.; Standardization, C. C. S. o. c., Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clinical Chemistry* **1998**, *44* (6), 1198-1208.
175. Katrukha, A. G.; Bereznikova, A. V.; Filatov, V. L.; Esakova, T. V.; Kolosova, O. V.; Pettersson, K.; Lövgren, T.; Bulargina, T. V.; Trifonov, I. R.; Gratsiansky, N. A.; Pulkki, K.; Voipio-Pulkki, L.-M.; Gusev, N. B., Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clinical Chemistry* **1998**, *44* (12), 2433-2440.
176. Adams, J. E.; Bodor, G. S.; Dávila-Román, V. G.; Delmez, J. A.; Apple, F. S.; Ladenson, J. H.; Jaffe, A. S., Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* **1993**, *88* (1), 101-106.
177. Katrukha, A. G.; Bereznikova, A. V.; Esakova, T. V.; Pettersson, K.; Lövgren, T.; Severina, M. E.; Pulkki, K.; Vuopio-Pulkki, L.-M.; Gusev, N. B., Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clinical Chemistry* **1997**, *43* (8), 1379-1385.
178. Ferrieres, G.; Calzolari, C.; Mani, J.-C.; Laune, D.; Trinquier, S.; Laprade, M.; Larue, C.; Pau, B.; Granier, C., Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure. *Clinical Chemistry* **1998**, *44* (3), 487-493.
179. Katrukha, A.; Bereznikova, A.; Filatov, V.; Esakova, T., Biochemical Factors Influencing Measurement of Cardiac Troponin I in Serum. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1999; Vol. 37, p 1091.
180. Lippi, G.; Cervellin, G., Degradation of troponin I in serum or plasma: mechanisms, and analytical and clinical implications. *Semin Thromb Hemost* **2012**, *38* (2), 222-9.

181. Li, M. X.; Wang, X.; Sykes, B. D., Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* **2004**, *25* (7), 559-579.
182. Gerhardt, W.; Nordin, G.; Herbert, A.-K.; Linåker Burzell, B.; Isaksson, A.; Gustavsson, E.; Haglund, S.; Müller-Bardorff, M.; Katus, H. A., Troponin T and I Assays Show Decreased Concentrations in Heparin Plasma Compared with Serum: Lower Recoveries in Early than in Late Phases of Myocardial Injury. *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (6), 817-821.
183. Eriksson, S.; Halenius, H.; Pulkki, K.; Hellman, J.; Pettersson, K., Negative Interference in Cardiac Troponin I Immunoassays by Circulating Troponin Autoantibodies. *Clinical Chemistry* **2005**, *51* (5), 839-847.
184. Eriksson, S.; Junikka, M.; Laitinen, P.; Majamaa-Voltti, K.; Alfthan, H.; Pettersson, K., Negative Interference in Cardiac Troponin I Immunoassays from a Frequently Occurring Serum and Plasma Component. *Clinical Chemistry* **2003**, *49* (7), 1095-1104.
185. Hamm, C. W.; Braunwald, E., A classification of unstable angina revisited. *Circulation* **2000**, *102* (1), 118-22.
186. Myocardial infarction redefined—A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal* **2000**, *21* (18), 1502-1513.
187. Braunwald, E.; Antman, E. M.; Beasley, J. W.; Califf, R. M.; Cheitlin, M. D.; Hochman, J. S.; Jones, R. H.; Kereiakes, D.; Kupersmith, J.; Levin, T. N.; Pepine, C. J.; Schaeffer, J. W.; Smith, E. E.; Steward, D. E.; Theroux, P.; Gibbons, R. J.; Alpert, J. S.; Eagle, K. A.; Faxon, D. P.; Fuster, V.; Gardner, T. J.; Gregoratos, G.; Russell, R. O.; Smith, S. C., ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Executive Summary and Recommendations. *A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina)* **2000**, *102* (10), 1193-1209.
188. Panteghini, M.; Gerhardt, W.; Apple Fred, S.; Dati, F.; Ravkilde, J.; Wu Alan, H., Quality Specifications for Cardiac Troponin Assays. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2001; Vol. 39, p 175.
189. Melanson, S. E. F.; Tanasijevic, M. J.; Jarolim, P., Cardiac Troponin Assays. *Circulation* **2007**, *116* (18), e501-e504.
190. Cho, I.-H.; Paek, E.-H.; Kim, Y.-K.; Kim, J.-H.; Paek, S.-H., Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *632* (2), 247-255.
191. Hyytiä, H.; Järvenpää, M.-L.; Ristiniemi, N.; Lövgren, T.; Pettersson, K., A comparison of capture antibody fragments in cardiac troponin I immunoassay. *Clinical Biochemistry* **2013**, *46* (12).
192. Bodor, G. S.; Porter, S.; Landt, Y.; Ladenson, J. H., Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clinical Chemistry* **1992**, *38* (11), 2203-14.
193. Penttilä, K.; Penttilä, I.; Bonnell, R.; Kerth, P.; Koukkunen, H.; Rantanen, T.; Svanas, G., Comparison of the Troponin T and Troponin I ELISA Tests, as Measured by Microplate Immunoassay Techniques, in Diagnosing Acute Myocardial Infarction. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1997; Vol. 35, p 767.
194. Le Moal, E.; Giuliani, I.; Bertinchant, J.-P.; Polge, A.; Larue, C.; Villard-Saussine, S., Earlier detection of myocardial infarction by an improved cardiac TnI assay. *Clinical Biochemistry* **2007**, *40* (13-14), 1065-1073.
195. Zhang, G.-J.; Ning, Y., Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: A review. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *749*, 1-15.
196. Abdorahim, M.; Rabiee, M.; Alhosseini, S. N.; Tahriri, M.; Yazdanpanah, S.; Alavi, S. H.; Tayebi, L., Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for cardiac troponin recognition: An illustrated review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *82*, 337-347.

197. Pedrero, M.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M., Electrochemical Biosensors for the Determination of Cardiovascular Markers: a Review. *Electroanalysis* **2014**, *26* (6), 1132-1153.
198. O'Regan, T.; Pravda, M.; O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G., Development of Biosensor Array for Rapid Detection of Cardiac Markers: Immunosensor for Detection of Free Cardiac Troponin I. *Analytical Letters* **2003**, *36* (9), 1903-1920.
199. Horak, J.; Dincer, C.; Qelibari, E.; Bakirci, H.; Urban, G., Polymer-modified microfluidic immunochip for enhanced electrochemical detection of troponin I. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *209* (0), 478-485.
200. Ko, S.; Kim, B.; Jo, S.-S.; Oh, S. Y.; Park, J.-K., Electrochemical detection of cardiac troponin I using a microchip with the surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *23* (1), 51-59.
201. Purvis, D.; Leonardova, O.; Farmakovskiy, D.; Cherkasov, V., An ultrasensitive and stable potentiometric immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18* (11), 1385-1390.
202. Lee, I.; Luo, X.; Huang, J.; Cui, X. T.; Yun, M., Detection of Cardiac Biomarkers Using Single Polyaniline Nanowire-Based Conductometric Biosensors. *Biosensors* **2012**, *2* (2), 205.
203. Tuteja, S. K.; Kukkar, M.; Suri, C. R.; Paul, A. K.; Deep, A., One step in-situ synthesis of amine functionalized graphene for immunosensing of cardiac marker cTnl. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *66*, 129-135.
204. Guo, H.; He, N.; Ge, S.; Yang, D.; Zhang, J., Molecular sieves materials modified carbon paste electrodes for the determination of cardiac troponin I by anodic stripping voltammetry. *Microporous and Mesoporous Materials* **2005**, *85* (1-2), 89-95.
205. Bhalla, V.; Carrara, S.; Sharma, P.; Nangia, Y.; Raman Suri, C., Gold nanoparticles mediated label-free capacitance detection of cardiac troponin I. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *161* (1), 761-768.
206. Bhatnagar, D.; Kaur, I.; Kumar, A., Ultrasensitive cardiac troponin I antibody based nanohybrid sensor for rapid detection of human heart attack. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *95*, 505-510.
207. Tan, Y.; Wang, Y.; Li, M.; Ye, X.; Wu, T.; Li, C., Enhanced photoelectrochemical immunosensing of cardiac troponin I based on energy transfer between N-acetyl-L-cysteine capped CdAgTe quantum dots and dodecahedral Au nanoparticles. *Biosensors & bioelectronics* **2017**, *91*, 741-746.
208. Christenson, R. H.; Duh, S. H.; Apple, F. S.; Bodor, G. S.; Bunk, D. M.; Panteghini, M.; Welch, M. J.; Wu, A. H. B.; Kahn, S. E., Toward Standardization of Cardiac Troponin I Measurements Part II: Assessing Commutability of Candidate Reference Materials and Harmonization of Cardiac Troponin I Assays. *Clinical Chemistry* **2006**, *52* (9), 1685-1692.
209. Aakre, K. M.; Langlois, M. R.; Barth, J. H.; Misra, S.; Watine, J.; Oosterhuis, W. P., The quality of laboratory aspects of troponin testing in clinical practice guidelines and consensus documents needs to be improved. *Clinica Chimica Acta* **2014**, *437*, 58-61.
210. Andersson, P. O.; Karlsson, J.-E.; Landberg, E.; Festin, K.; Nilsson, S., Consequences of high-sensitivity troponin T testing applied in a primary care population with chest pain compared with a commercially available point-of-care troponin T analysis: an observational prospective study. *BMC Research Notes* **2015**, *8* (1), 210.
211. Fraga, O. R.; Sandoval, Y.; Love, S. A.; McKinney, Z. J.; Murakami, M. M.; Smith, S. W.; Apple, F. S., Cardiac Troponin Testing Is Overused after the Rule-In or Rule-Out of Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry* **2015**, *61* (2), 436-438.
212. Apple, F. S.; Ler, R.; Murakami, M. M., Determination of 19 Cardiac Troponin I and T Assay 99th Percentile Values from a Common Presumably Healthy Population. *Clinical Chemistry* **2012**, *58* (11), 1574-1581.
213. Buechler Novel Method for the Assay of Troponin I and T and complexes of Troponin I and T and Selection of Antibodies for use in Immunoassays. 2011.

214. Apple, F. S., Analytical issues for cardiac troponin. *Progress in cardiovascular diseases* **2004**, *47* (3), 189-95.
215. Colom Sanmartí, G. A Multiplexed diagnostic approach for cardiovascular disease biomarkers. University of Barcelona University of Barcelona, 2016.
216. Kim, D.-H.; Paek, S.-H.; Lim, G.-S.; Jeon, J.-W.; Paek, S.-H., Performance characteristics of monoclonal antibodies as recyclable binders to cardiac troponin I. *Analytical Biochemistry* **2012**, *431* (1), 11-18.
217. Hyytiä, H.; Heikkilä, T.; Hedberg, P.; Puolakanaho, T.; Pettersson, K., Skeletal troponin I cross-reactivity in different cardiac troponin I assay versions. *Clinical Biochemistry* (0).
218. Eigel, W. N.; Butler, J. E.; Ernstrom, C. A.; Farrell Jr, H. M.; Harwalkar, V. R.; Jenness, R.; Whitney, R. M., Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision1. *Journal of Dairy Science* **1984**, *67* (8), 1599-1631.
219. Modler, H. W., Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients - A Review. Modification of Products Containing Casein1,2. *Journal of Dairy Science* **1985**, *68* (9), 2195-2205.
220. Kenna, J. G.; Major, G. N.; Williams, R. S., Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods* **1985**, *85* (2), 409-419.
221. Rachel Pearce Pratt, B. R., Comparison of Blocking Agens for ELISA. *Thermo Scientific. Application Note* **2014**.
222. Bunk, D. M.; Welch, M. J., Characterization of a New Certified Reference Material for Human Cardiac Troponin I. *Clinical Chemistry* **2006**, *52* (2), 212-219.
223. Wu, A. H. B., Analytical Issues for Clinical Use of Cardiac Troponin. In *Cardiovascular Biomarkers: Pathophysiology and Disease Management*, Morrow, D. A., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2006; pp 27-40.
224. Wang, J., Nanoparticle-Based Electrochemical Bioassays of Proteins. *Electroanalysis* **2007**, *19* (7-8), 769-776.
225. Wang, J., Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. *Small* **2005**, *1* (11), 1036-1043.
226. Font, H.; Adrian, J.; Galve, R.; Estévez, M. C.; Castellari, M.; Gratacós-Cubarsí, M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P., Immunochemical Assays for Direct Sulfonamide Antibiotic Detection In Milk and Hair Samples Using Antibody Derivatized Magnetic Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (3), 736-743.
227. Pinacho, D.; Sánchez-Baeza, F.; Pividori, M.-I.; Marco, M.-P., Electrochemical Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk Using a Magneto Immunosensor. *Sensors* **2014**, *14* (9), 15965.
228. Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Pinacho, D. G.; Julio Reviejo, A.; Pilar Marco, M.; Pingarron, J. M., Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors & Bioelectronics* **2012**, *36* (1), 81-88.
229. Lermo, A.; Fabiano, S.; Hernández, S.; Galve, R.; Marco, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I., Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (7), 2057-2063.
230. Garcia-Febrero, R.; Valera, E.; Muriano, A.; Pividori, M.-I.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., An electrochemical magneto immunosensor (EMIS) for the determination of paraquat residues in potato samples. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (24), 7841-7849.
231. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Salvador, J. P.; Marco, M. P.; Pingarrón, J. M., Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *188*, 212-220.
232. Salvador, J. P.; Marco, M. P., Amperometric Biosensor for Continuous Monitoring Irgarol 1051 in Sea Water. *Electroanalysis* **2016**, *28* (8), 1833-1838.

233. Wu, H.; Liu, G.; Wang, J.; Lin, Y., Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 $\alpha$ . *Electrochemistry Communications* **2007**, *9* (7), 1573-1577.
234. Martín-Yerga, D.; González-García, M. B.; Costa-García, A., Electrochemical immunosensor for anti-tissue transglutaminase antibodies based on the in situ detection of quantum dots. *Talanta* **2014**, *130* (0), 598-602.
235. Luo, Y.; Zhang, B.; Chen, M.; Jiang, T.; Zhou, D.; Huang, J.; Fu, W., Sensitive and rapid quantification of C-reactive protein using quantum dot-labeled microplate immunoassay. *Journal of Translational Medicine* **2012**, *10*, 24-24.
236. Wang, J.; Liu, G.; Wu, H.; Lin, Y., Quantum-Dot-Based Electrochemical Immunoassay for High-Throughput Screening of the Prostate-Specific Antigen. *Small* **2008**, *4* (1), 82-86.
237. Valera, E.; Hernández-Albors, A.; Marco, M. P., Electrochemical coding strategies using metallic nanopores for biosensing applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *79*, 9-22.
238. Valera, E.; García-Febrero, R.; Pividori, I.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P., Coulombimetric immunosensor for paraquat based on electrochemical nanopores. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *194*, 353-360.
239. Valera, E.; Muriano, A.; Pividori, I.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P., Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *43* (0), 211-217.
240. Agostiano, A.; Catalano, M.; Curri, M. L.; Della Monica, M.; Manna, L.; Vasanelli, L., Synthesis and structural characterisation of CdS nanoparticles prepared in a four-components "water-in-oil" microemulsion. *Micron* **2000**, *31* (3), 253-258.
241. Mirgorod, Y. A.; Efimova, N. A., Relationship between size of cadmium sulfide nanoparticles and water pool diameter in reverse micelles. *Russ J Appl Chem* **2007**, *80* (9), 1558-1561.
242. Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A., Strategies for Organizing Nanoparticles into Aggregate Structures and Functional Materials. *Journal of Cluster Science* **1997**, *8* (2), 179-216.
243. Arben, M.; Luiz Humberto, M.-J.; Sergio, M.; Orlando, F.-F.; Salvador, A., Detection of cadmium sulphide nanoparticles by using screen-printed electrodes and a handheld device. *Nanotechnology* **2007**, *18* (3), 035502.
244. Lin, C. A.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M.; Chang, W. H.; Parak, W. J., Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small* **2008**, *4* (3), 334-41.
245. Høyer-Hansen, G.; Hamers, M. J. A. G.; Pedersen, A. N.; Nielsen, H. J.; Brüner, N.; Danø, K.; Stephens, R. W., Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* **2000**, *235* (1-2), 91-99.
246. Montenegro, J.-M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, J. M.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W. J., Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65* (5), 677-688.
247. Xing, Y.; Chaudry, Q.; Shen, C.; Kong, K. Y.; Zhau, H. E.; Chung, L. W.; Petros, J. A.; O'Regan, R. M.; Yezhelyev, M. V.; Simons, J. W.; Wang, M. D.; Nie, S., Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nat. Protocols* **2007**, *2* (5), 1152-1165.
248. Ma, L. L.; Tam, J. O.; Willsey, B. W.; Rigdon, D.; Ramesh, R.; Sokolov, K.; Johnston, K. P., Selective Targeting of Antibody Conjugated Multifunctional Nanoclusters (Nanoroses) to Epidermal Growth Factor Receptors in Cancer Cells. *Langmuir* **2011**, *27* (12), 7681-7690.
249. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495-7.
250. Nowinski, R. C.; Lostrom, M. E.; Tam, M. R.; Stone, M. R.; Burnette, W. N., The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses. *Virology* **1979**, *93* (1), 111-26.

## **8 Acrónimos y Abreviaciones**

---



GOx	Glucosa Oxidasa
HCH	Hemocianina de Cangrejo de Herradura
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
Hs-cTnI	Troponina I Cardíaca Ultrasensible
IACS	Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IA	Inmunoensayo
IFCC	International Federatino of Clinical Chemistry
IM	Infarto de Miocardio
LC	Límite de Cuantificación
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LFIC	Ensayo Inmuncromatográfico de Flujo Lateral
LD	Límite de Detección
LOCI	<i>Luminiscent Oxygen Channeling Immunoassay</i>
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LSR	Límite Superior de Referencia
MCPE	Electrodo de Pasta de Carbón Modificada
Min	Minutos
MP	Partícula Magnética
MSSSI	Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
NAC	N-acetil-L-Cisteína
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PANIN	Nanored de Polianilina
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEIL	Polietilenimina Lineal
PEIR	Polietilenimina Ramificada
QD	Quantum Dots
RIA	Radioinmunoensayo
pAb	Anticuerpo Policlonal
PAMAM	Poliamidoamina
PB-T	Tampón Fosfato con Tween-20
PBS	Tampón Fosfato Salino

PBS-T	Tampón Fosfato Salino con Tween-20
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PFGE	Electroforesis de Campo Pulsado
POC	Point -of-Care
PPy	Polipirrol
PVA	Polivinilalcohol
PVP	Polivinilpirrolidona
SAM	Monocapa Autoensamblada Mixta
Sav	Estreptavidina
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIA	Iodoacetato de Succinimidilo
SMCC	4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo
SPCE	Electrodo Serigrafiado de Carbono
SPGE	Electrodo Serigrafiado de Oro
SWV	Voltamperometría de Onda Cuadrada
TMB	3, 3',5, 5' - Tetrametilbenzidina
TnC	Troponina C
VCR	Valor de Cambio en la Referencia
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad
VRA	Voltamperometría de Redisolución Anódica

- **Código de Aminoácidos**

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ác. aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ác. glutámico	R	Arg	Arginina
F	Phe	Fenilalanina	Q	Gln	Glutamina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptófano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

