

# Máster en Biotecnología Avanzada

## Especialidad sanitaria



### Trabajo Fin de Máster

Desarrollo de microarrays de anticuerpos en formato esfera  
para la validación de biomarcadores de artrosis

Desenvolvimento de microarrays de anticorpos en formato  
esfera para a validación de biomarcadores de artrose

Development of antibody microarrays in beads format for  
the validation of osteoarthritis biomarkers

Rocío Paz González

Febrero, 2018



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



D. <sup>a</sup> Cristina Ruiz Romero y D. <sup>a</sup> Valentina Calamia informan que la presente memoria de Trabajo fin de Máster con título:

Desarrollo de *microarrays* de anticuerpos en formato esfera para la validación de biomarcadores de artrosis

Desenvolvemento de *microarrays* de anticorpos en formato esfera para a validación de biomarcadores de artrose

Development of antibody microarrays in beads format for the validation of osteoarthritis biomarkers

Ha sido realizado en el área de Proteómica del grupo de Reumatología del INIBIC por D. <sup>a</sup> Rocío Paz González bajo la dirección de la Dra. Cristina Ruiz Romero y la Dra. Valentina Calamia, que autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador en la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

A Coruña, a 1 de Febrero de 2018

Fdo. Cristina Ruiz Romero

Fdo. Valentina Calamia

# Índice

---

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
2.1. La artrosis.....	2
2.1.1. Diagnóstico de la artrosis.....	2
2.1.2. Tratamiento de la artrosis.....	3
2.2. Biomarcadores.....	3
2.3. Proteómica.....	6
2.3.1. Técnicas proteómicas.....	6
2.3.2. Aportación de la proteómica a la artrosis.....	12
<b>3. Objetivos</b> .....	13
<b>4. Material y métodos</b> .....	14
4.1. Tecnología XMAP de Luminex.....	14
4.2. Protocolos.....	17
4.2.1. Activación de las microesferas.....	18
4.2.2. Acoplar el anticuerpo de captura a una población de esferas.....	18
4.2.3. Verificación el acoplamiento.....	19
4.2.4. Inmunoensayo en formato sándwich.....	19
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	21
5.1. THBS1.....	22
5.2. COMP.....	25
5.3. RBP4.....	26
5.4. VDBP.....	28
5.5. Optimización de la concentración de anticuerpo de detección.....	30
5.6. Reactividad cruzad entre RBP4 y VDBP.....	30
<b>6. Conclusiones</b> .....	33
<b>7. Bibliografía</b> .....	34

# 1. Resumen

---

La artrosis es la enfermedad reumática con mayor prevalencia en la población adulta. Los daños causados en la articulación por esta patología, silente en sus estadios iniciales, son irreversibles. A pesar de su elevado impacto en la sociedad, en la actualidad carece de tratamiento efectivo por lo que es muy importante su diagnóstico en estadios tempranos.

Una buena estrategia para un diagnóstico precoz en la práctica clínica consistiría en el desarrollo de un panel de biomarcadores proteicos asociados a la artrosis, que idealmente permitiera la monitorización precisa de la enfermedad y la evaluación de la efectividad de nuevas estrategias terapéuticas.

En este trabajo se pretende desarrollar un *microarray* analítico de anticuerpos en formato sándwich frente a proteínas con potencial biomarcador de artrosis que han sido identificadas en estudios previos del grupo de investigación. Dicho *microarray* permitirá el análisis múltiple del panel de proteínas en muestras de suero de pacientes artrósicos y controles. Para este desarrollo se trabajará con la tecnología xMAP de Luminex, basada en *arrays* en formato esfera con propiedades magnéticas.

**Palabras clave: biomarcadores, artrosis, *array* de anticuerpos, análisis múltiple.**

## 2. Introducción

---

### 2.1. La artrosis

En la actualidad la artrosis (o osteoartritis, OA) es la enfermedad reumática más prevalente en la población, presentándose por lo tanto como un problema de salud público y ligada íntimamente con el envejecimiento y la obesidad (Ruiz-Romero et al., 2015). Se trata de una compleja patología multifactorial, degenerativa e irreversible que afecta a todos los componentes de la articulación. Como se ilustra en la figura 1, la artrosis se caracteriza por la pérdida progresiva del cartílago articular, repercutiendo esto en el hueso subcondral y provocando la inflamación de la membrana sinovial (Dray y Read, 2007).



Figura 1: Diferencia entre una articulación normal y una afectada por la artrosis.

#### 2.1.1. Diagnóstico de la artrosis

A pesar del elevado impacto de la OA en la sociedad, las herramientas para su diagnóstico son muy limitadas. En la actualidad, el diagnóstico de esta enfermedad, silente en sus estadios iniciales, se basa en manifestaciones clínicas y radiológicas presentes en el paciente una vez que la enfermedad ya está avanzada y los daños en la articulación son irreparables.

Dolor e inflamación son los primeros síntomas clínicos del avance de la enfermedad. La confirmación del diagnóstico se basa principalmente en signos radiológicos como: pérdida

localizada del espacio articular, esclerosis del hueso subcondral, proliferación osteofítica y quistes subcondrales (Moragues y Valls, 2010).

Siendo la radiografía una tecnología limitada y poco sensible a la hora de ofrecer un diagnóstico precoz o evaluar el progreso de la enfermedad, se requiere el desarrollo de nuevas estrategias que cubran estas necesidades (Lourido et al., 2017).

### 2.1.2. Tratamiento de la artrosis

Una vez establecido el diagnóstico de OA, el tratamiento se basa de modo general en aliviar el dolor con analgésicos, reducir la inflamación con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Poley et al., 2011) y retrasar el avance de la enfermedad con la intención de mejorar las limitaciones funcionales del paciente. En última instancia, para los casos más avanzados se recurre a la cirugía para sustituir la articulación dañada por una prótesis.

## 2.2. Biomarcadores

En base a lo expuesto anteriormente, queda reflejada la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico temprano para esta enfermedad. Para ello, la aplicación de tecnologías proteómicas para la búsqueda de nuevos biomarcadores serviría para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la artrosis (Ruiz-Romero et al., 2015).

Un biomarcador es una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Kraus et al., 2011). El biomarcador ideal debe cumplir unos requisitos muy estrictos: Ha de ser **específico** de un tejido o una enfermedad concreta. Además, los biomarcadores suelen aparecer a muy bajas concentraciones en los fluidos biológicos, por lo que es muy importante medirlos con una alta **sensibilidad**. También ha de poseer un elevado **poder predictivo** (>80%), de modo que puede ser realmente útil para predecir cambios y monitorizar las diferentes fases de una enfermedad. Para que un biomarcador sea empleado en la práctica clínica debe ser fácilmente detectable en muestras de uso rutinario en un hospital. La sangre es, por lo tanto, una gran candidata por su fácil **accesibilidad**. Además es una excelente fuente de

biomarcadores, ya que recorre todo el cuerpo recogiendo proteínas circulantes secretadas por todos los tejidos (Casal y Vivanco, 2014).

La principal desventaja del suero es su elevado rango dinámico. El suero contiene proteínas muy abundantes que “*a priori*”, impiden la detección de las proteínas minoritarias. Esto es un problema, ya que los biomarcadores suelen aparecer en muy bajas concentraciones. Dada la elevada complejidad de enfermedades como la artrosis, hay que tener en cuenta todos los factores que puedan aumentar la variabilidad entre muestras, afectando a la **reproducibilidad** de las mediciones (edad, sexo, índice de masa corporal o severidad de la enfermedad, entre otras). Un marcador ideal sería aquel que tenga valor en todas las etapas del proceso patológico, permitiendo un diagnóstico temprano, el seguimiento de la enfermedad (marcador pronóstico) y que indique respuesta a tratamiento (marcador predictivo) (Matson et al., 2010; Kraus et al., 2015).

Durante los últimos años, diferentes ciencias *ómicas* como la genómica, proteómica o metabolómica han aumentado el interés por la búsqueda de estrategias alternativas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores. La estrategia más empleada hasta el momento se basa en la tecnología de *arrays* de ADN, que consiste en identificar genes involucrados en una enfermedad mediante análisis transcripcional. El problema de los estudios genómicos reside en que los niveles de expresión génica no siempre representan la realidad final en la célula. Como se observa en la figura 2, procesos como el *splicing* alternativo de ARN, modificaciones postraduccionales, interacciones entre proteínas o procesos de degradación, convierten la proteómica en una herramienta más eficaz que la genómica a la hora de encontrar nuevos biomarcadores (Ruiz-Romero y Blanco, 2010).

La proteómica es la disciplina encargada del estudio del proteoma. Este es un elemento altamente dinámico y complejo que puede ser estudiado por diferentes técnicas proteómicas. Por lo tanto, la exploración del proteoma ofrece oportunidades únicas para la búsqueda de biomarcadores proteicos que permitan avanzar en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Mustafa et al., 2011).

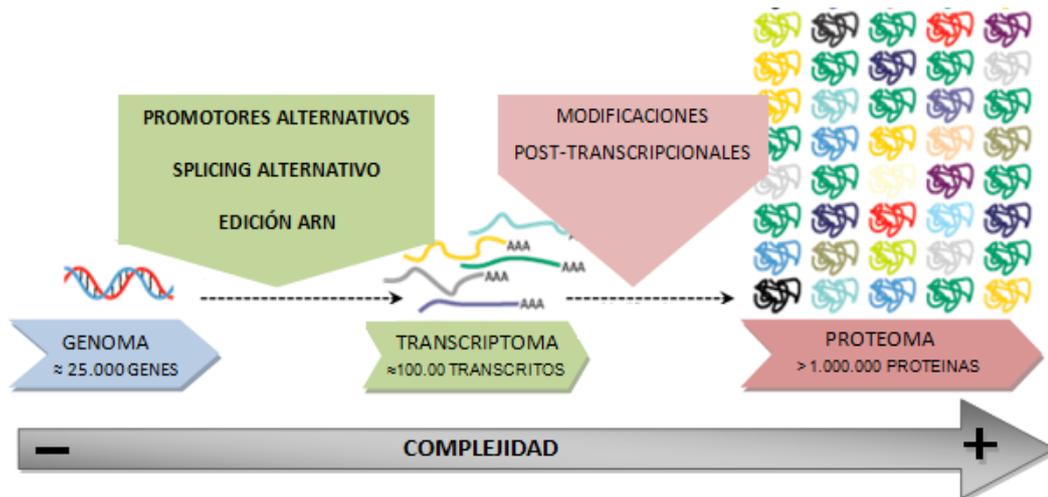


Figura 2: Procesos intermedios entre la información genética inicial y la proteína final convierten al proteoma en un componente mucho más dinámico y complejo que el genoma.

En el caso de la artrosis los mejores biomarcadores son proteínas del cartílago, hueso o membrana sinovial ya que son los componentes principales de la articulación.

Como se observa en la figura 3, para que un biomarcador llegue a ser utilizado de forma rutinaria en la práctica clínica ha de superar un largo proceso que va desde su descubrimiento hasta su entrada en el mercado (Ruiz-Romero y Blanco, 2010). Los experimentos de proteómica al azar para el descubrimiento de nuevas proteínas con potencial biomarcador deben ir seguidos del diseño de estrategias dirigidas, con el fin de poder verificar su utilidad biomarcadora en un número más amplio de muestras. Una vez seleccionados los posibles biomarcadores, se inicia una fase de desarrollo en la que se evalúan sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos. Si el candidato cumple todos los requisitos necesarios exigidos durante la fase clínica, será lanzado al mercado.



Figura 3: Fases de desarrollo de un biomarcador: desde su descubrimiento hasta su uso en la práctica clínica.

## 2.3. Proteómica

Como se ha comentado anteriormente, la proteómica es el área de la biología que estudia las proteínas a gran escala, proporcionando un conjunto de herramientas que permiten el estudio de su función, su estructura, su localización y sus interacciones.

La aplicación más común de esta disciplina es la identificación de proteínas en muestras biológicas. Sin embargo, ésta va mucho más allá y son muy diversos los estudios que puede abordar (Pando y Lanz-Mendoza, 2009). En líneas generales las aplicaciones de la proteómica son (Lourido, 2015):

- **Proteómica descriptiva o estructural:** tiene como objetivo la identificación y caracterización de las proteínas en una condición biológica determinada.
- **Proteómica de expresión diferencial o comparativa:** tiene como objetivo identificar los cambios en la expresión proteica asociados a una determinada condición biológica.
- **Proteómica funcional:** tiene como objetivo el estudio de la distribución de las proteínas así como sus interacciones.

### 2.3.1. Técnicas proteómicas

La proteómica se ha convertido en una disciplina muy prometedora para la búsqueda de biomarcadores. Para ello existen diferentes técnicas, por un lado aquellas basadas en la espectrometría de masas y por el otro las basadas en *arrays* de proteínas.

- **Técnicas basadas en espectrometría de masas**

El esquema básico de trabajo en proteómica se fundamenta en la separación de proteínas para su posterior identificación por espectrometría de masas y, en determinados casos, su cuantificación (absoluta o relativa).

La **separación de proteínas** es un paso crítico en proteómica, y los métodos más utilizados pueden dividirse en dos grupos: **métodos basados en gel** y **métodos basados en cromatografía líquida**. La electroforesis bidimensional (2-DE) es la técnica basada en gel más empleada y se basa en la realización de dos separaciones: la primera en función de la carga de las proteínas, y la segunda en función de su masa molecular. Alternativamente, se puede realizar una única separación solo en función de la masa molecular (1-DE). La

cromatografía líquida es un método no basado en gel cuyo fundamento es que un líquido (fase móvil) circule en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria). Cuando los analitos son introducidos en la corriente de la fase móvil, cada uno de ellos avanzará a lo largo del sistema con una velocidad determinada en función de su afinidad por cada fase. Esto implica, que una vez finalizado el recorrido de la muestra en la columna, cada analito eluye con un tiempo diferente, produciéndose su separación.

La **identificación de proteínas** se lleva a cabo mediante espectrometría de masas. Los espectrómetros de masas constan de cuatro componentes fundamentales:

- Fuente de ionización: donde se forman los iones (MALDI, ESI).
- Analizador de masas: analiza los iones según su relación masa/carga. Tipos:
  - Sencillos: TOF (time of flight).
  - Espectrómetros de masa en tándem: combinación de varios analizadores en el tiempo (TOF-TOF) o en el espacio (trampa de iones), que permiten fragmentar los péptidos en sus correspondientes iones y obtener secuencias peptídicas.
- Detector (Fotomultiplicadores).
- Sistema de adquisición y tratamiento de los datos.

La información obtenida por espectrometría de masas es esencialmente cualitativa, como es la determinación de la masa molecular o de la secuencia aminoacídica a partir de los fragmentos analizados, pero también se pueden realizar análisis cuantitativos utilizando patrones internos o externos con límites de detección desde picomoles a femtomoles.

En función del método empleado, la **cuantificación de proteínas** puede ser relativa o absoluta. Una cuantificación relativa señala diferencias en la abundancia de proteínas entre diferentes muestras. La mejor técnica cuantitativa basada en gel hasta la fecha es la electroforesis diferencial en gel (DIGE). Sin embargo, debido a sus limitaciones (baja posibilidad de automatización y difícil detección de proteínas poco abundantes), las técnicas basadas en gel no se suelen aplicar para el descubrimiento de biomarcadores en suero (Ruiz-Romero y Blanco, 2010). Las técnicas de cuantificación basadas en cromatografía líquida requieren el marcaje isotópico diferencial de las proteínas antes del análisis por espectrometría de masas (iTRAQ, acrónimo del inglés *Isobaric tags for relative*

*and absolute quantitation*). Para llevar a cabo una cuantificación absoluta se requiere dirigir el estudio hacia las proteínas de interés lo que se conoce como proteómica dirigida (MRM, acrónimo del inglés *Multiple Reaction Monitoring*). La cuantificación se logra proporcionando un estándar externo de concentración conocida contra el cual medir el nivel de proteína de interés (García y Ruiz-Romero, 2010).

- **Técnicas basadas en *arrays* de proteínas**

Un *array* (o matriz) de proteínas es un soporte en el que se inmovilizan proteínas. En esencia, se trata de un inmunoensayo en miniatura que permite el análisis masivo y simultáneo de un gran número de proteínas con una elevada sensibilidad.

Esta tecnología, aún en expansión, se presenta como una herramienta muy versátil en proteómica, debido a sus múltiples aplicaciones como el mapeo de proteínas en fluidos biológicos, la búsqueda de biomarcadores o ensayos de funcionalidad. No obstante, pese a un avance significativo en esta técnica, hoy en día siguen existiendo algunas limitaciones (Tabla 1) (Ruiz-Romero y Blanco, 2010; Lourido et al., 2014).

En comparación con las técnicas más tradicionales y mejor conocidas, como la espectrometría de masas, los *arrays* de proteínas presentan la gran ventaja de no necesitar un fraccionamiento previo de la muestra. Además, al compararlos con los ensayos ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) clásicos, técnica de referencia para la validación de biomarcadores, los *arrays* de proteínas mantienen la misma sensibilidad utilizando menos cantidad de muestra (Blackburn y Shoko, 2011) y siendo mucho más rápidos gracias a la posibilidad de realizar ensayos frente a múltiples analitos a la vez.

VENTAJAS	PROBLEMAS
Miniaturización	Perdida de funcionalidad de las proteínas
Automatización	Dificultad para la impresión de proteínas
No fraccionamiento de la muestra	Falta de Anticuerpos específicos
Menor consumo de muestra	Deshidratación de las proteínas en el <i>array</i>
Menor consumo de reactivos	Reactividad cruzada
Alta sensibilidad y especificidad	Falsos positivos
Ensayos multiplex	Instrumentación muy específica
Rapidez	

**Tabla1: Ventajas e inconvenientes de los *arrays* de proteínas.**

Hasta la fecha, se han desarrollado dos formatos de *arrays* de proteínas: *arrays* planos y *array* en formato esfera (o *array* en suspensión). Los **arrays planos** se generan inmovilizando un gran número de proteínas en una superficie sólida, habitualmente vidrio. La impresión de las proteínas en la superficie puede seguir dos estrategias (Lourido, 2015):

- Contacto: las agujas captan la muestra por capilaridad y la depositan en la superficie del *array* por contacto directo.
- Inyección: las gotas de muestra son propulsadas en la superficie del *array* sin contacto.

En cuanto a la generación y detección de la señal, el método más usado es la fluorescencia. Debido a su alta sensibilidad y a que abarca un gran rango dinámico es un buen método para la detección de biomarcadores en muestras de suero.

Los **arrays en formato esfera o arrays en suspensión** se basan en poblaciones de microesferas individuales que actúan como soporte en el *array*. Las esferas llevan unidos grupos funcionales como carboxilos, que favorecen la unión covalente de las proteínas por el extremo amino. Las diferentes poblaciones de microesferas se identifican mediante citometría de flujo gracias a diferentes combinaciones de fluorocromos en su interior. Por lo tanto, cada población podrá ser identificada al estar asociada a un color diferente mediante un perfil de emisión característico derivado de la mezcla interna de fluorocromos. Esto permite asociar cada población a una proteína específica y poder mezclarlas para llevar a cabo un ensayo multiplex (análisis de múltiples analitos simultáneamente). Como se observa en la figura 4, la detección de la fluorescencia se basa en el empleo de dos láseres, uno para el análisis cualitativo y otro para el análisis cuantitativo. El primero a 650nm excita el fluorocromo interno de la esfera para identificar a que población pertenece, y por lo tanto a que proteína en concreto está asociada. Para el análisis cuantitativo, otro láser a 532nm, identifica la intensidad media de fluorescencia emitida por un fluorocromo reportero.

La tecnología puntera en este campo es comercializada por Luminex con el nombre de tecnología xMAP (acrónimo del inglés *multi-analyte profiling*) para ensayos multiplex.

Luminex ha desarrollado también la tecnología MagPlex, en la que se emplean sistemas de microesferas magnéticas acopladas con anticuerpos para la detección de proteínas diana. El hecho de que las esferas sean magnéticas permite la captura de proteínas solubles con una alta reproducibilidad gracias a un aumento en la automatización del ensayo (Angeloni et al., 2014; Reslova et al., 2017).

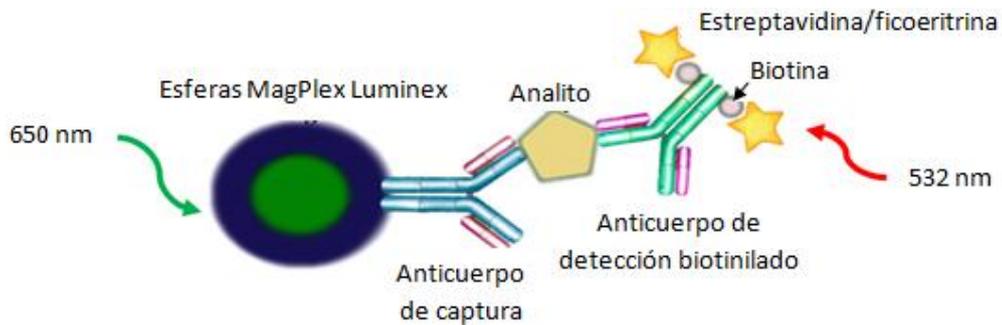


Figura 4: Esquema de la tecnología MagPlex de Luminex. Esta tecnología basada en los *arrays* de anticuerpos en formato esfera, permite en empleo simultáneo de diferentes poblaciones de microesferas magnéticas, marcadas con diferentes combinaciones de fluorocromos y asociadas cada una a un anticuerpo diferente. Tras la incubación con la muestra y el anticuerpo secundario marcado, la detección cualitativa y cuantitativa se lleva a cabo mediante dos láseres diferentes.

Existen múltiples clasificaciones de los *arrays* de proteínas en función de sus características. Una de las más empleadas los clasifica según la proteína inmovilizada sobre la superficie: *arrays* de antígenos y *arrays* de anticuerpos.

- **Microarrays de antígenos**

Esta tecnología permite realizar tanto ensayos analíticos que permiten ver la abundancia de la proteína de interés en la muestra, como ensayos funcionales para la detección de interacciones, modificaciones postraduccionales o actividad enzimática (Hu et al., 2011). Los antígenos son inmovilizados en el *array*, y la interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta que permita amplificar la señal de fluorescencia.

- **Microarrays de anticuerpos**

Para la creación de este tipo de *array*, una colección de anticuerpos de captura se fija sobre una superficie sólida con el fin de detectar los antígenos. Los *microarrays* de

anticuerpos pueden clasificarse en función del número de anticuerpos utilizado para detectar la proteína diana:

- Directos: se usa un único anticuerpo de captura, y la señal se detecta a través del marcaje de la muestra. La muestra puede ser marcada directamente con un fluorocromo, o indirectamente a través de una molécula intermedia afín a un compuesto fluorescente encargado de amplificar la señal (figura 5).

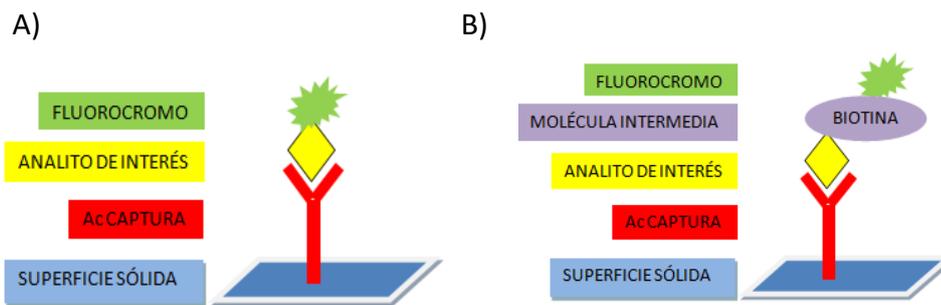


Figura 5: A) *Microarray* plano de anticuerpo con marcaje directo de la proteína con un fluorocromo. B) *Microarray* plano de anticuerpo con marcaje de la proteína a través de una molécula intermedia.

- Tipo sándwich: se usa un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección marcado que dará lugar a la señal (figura 6).

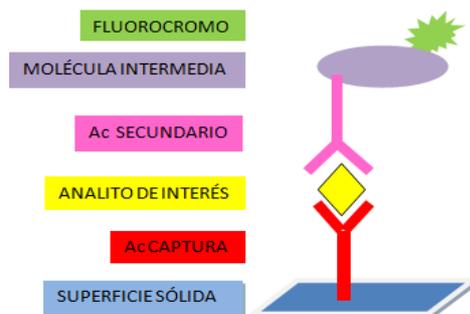


Figura 6: *Microarray* plano de anticuerpo en formato sándwich.

A pesar de que actualmente en el mercado se dispone de muchos anticuerpos comerciales, no todos ellos son funcionales en formato *array*. Entre las múltiples aplicaciones de los *arrays* analíticos de anticuerpos, destaca la identificación de biomarcadores en fluidos biológicos mediante la detección de proteínas diferencialmente expresadas entre muestras de pacientes y muestras control. Debido a sus características, algunas de ellas detalladas en la tabla 2 (Casal, 2014), este tipo de *arrays* representa la

técnica más comúnmente empleada en las fases de verificación y validación de nuevos biomarcadores aprobada por los organismos regulatorios internacionales como la FDA (acrónimo *Food & Drugs Administration*).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cuantificación absoluta	Sólo se puede incubar una muestra a la vez
Alta especificidad	Se necesitan parejas de anticuerpos específicos
Alta sensibilidad	Reactividad cruzada
No requiere marcaje de la muestra	

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de los *arrays* de anticuerpo.

### 2.3.2. Aportación de la proteómica a la artrosis

En la unidad de Proteómica del grupo de Reumatología del INIBIC llevan años trabajando en líneas relacionadas con la artrosis. Los primeros trabajos realizados empleando distintas aproximaciones de proteómica al azar han permitido avanzar mucho en el conocimiento de los mecanismos de patogénesis de esta enfermedad, y definir así un panel de posibles biomarcadores proteicos útiles para mejorar las estrategias diagnósticas y terapéuticas de la OA (Fernández-Puente et al., 2011; Lourido et al., 2014).

Aunque hasta la fecha la mayoría de las investigaciones en este campo han usado técnicas basadas en espectrometría de masas (Fernández-Puente et al., 2017) una estrategia alternativa y muy prometedora es el uso de *microarrays* de anticuerpos (De Ceuninck et al., 2004; Henjes et al., 2014).

En este trabajo hemos decidido emplear la tecnología MagPlex de Luminex para desarrollar un panel de potenciales biomarcadores de artrosis basado en *arrays* de anticuerpos tipo sándwich en formato esfera. Siendo la OA una enfermedad caracterizada por su origen multifactorial, es necesario encontrar una combinación de distintos biomarcadores cuyo análisis genere un perfil característico que permita el diagnóstico precoz, la monitorización o la elección de la estrategia terapéutica más adecuada para cada paciente (Casal y Vivanco, 2014).

### 3. Objetivos

---

Este trabajo tiene como objetivo principal el desarrollo de un *microarray* analítico tipo sándwich frente a potenciales biomarcadores proteicos de artrosis. Dicho proyecto se realizará a través del diseño de un *array* en formato esfera empleando la tecnología xMAP de Luminex, lo que permitirá llevar a cabo el análisis múltiple de un panel de proteínas en muestras de suero de pacientes artrósicos y controles sanos.

Para conseguir el objetivo principal, se plantean una serie de objetivos secundarios:

- Búsqueda de parejas de anticuerpos frente a proteínas potencialmente útiles como biomarcadores de artrosis, que funcionen en ensayos tipo sándwich.
- Desarrollo de sistemas de microesferas magnéticas para la detección y cuantificación de los biomarcadores de forma individual (*array* uniplex).
- Optimización de curvas estándar y diluciones de la muestra en función de cada analito.
- Comprobación de la reactividad cruzada entre diferentes parejas de anticuerpos.
- Desarrollo de un único ensayo múltiplex para la detección simultánea de distintos analitos.

## 4. Material y métodos

### 4.1. Tecnología XMAP de Luminex

La compañía Luminex ha desarrollado la tecnología xMAP que permite hacer inmunoensayos multiplex (Angeloni et al., 2014). Unas microesferas de poliestireno son las responsables de actuar como soporte sólido del *array*. Cada esfera lleva en su interior una combinación de hasta 3 fluorocromos que permite identificarla gracias a su perfil de emisión característico. Las esferas están recubiertas de grupos carboxilo que han de ser activados en un proceso mediado por EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) y sulfo-NHS (N-hydroxysuccinimide) para que se produzca la unión con el anticuerpo (figura 7). Los anticuerpos de captura formarán mediante un producto intermedio (carbodiimide) un enlace covalente entre sus grupos amino y los grupos carboxilo activados de la superficie de la esfera (figura 8).

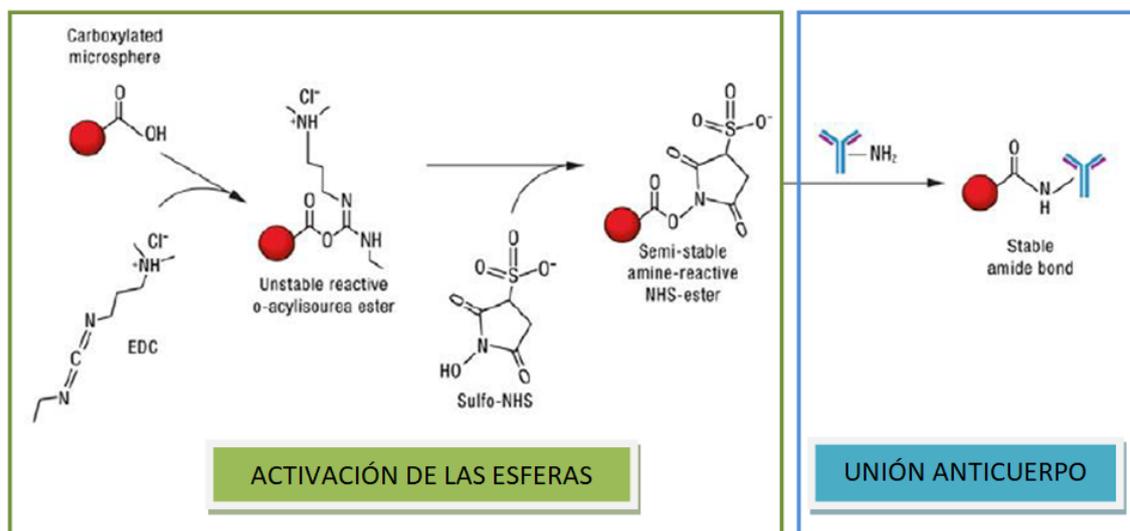


Figura 7: Esquema de activación de las microesferas y posterior unión del anticuerpo.

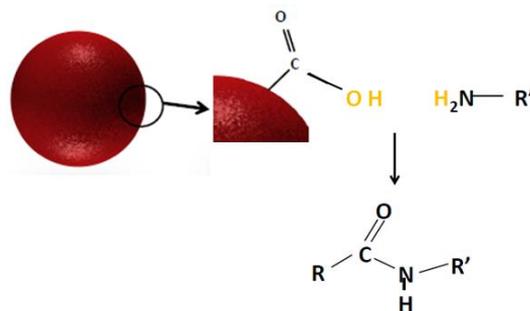
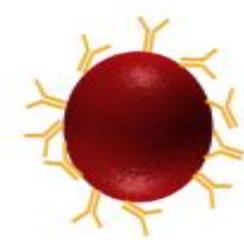


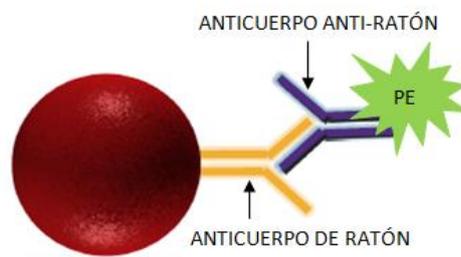
Figura 8: Formación de enlace covalente entre los grupos carboxilo activados de la superficie de las esferas y los grupos amino de las lisinas de los anticuerpos.

Esta asociación esfera-anticuerpo debe ser corroborada, ya que la unión de los anticuerpos se produce de un modo aleatorio a través de los grupos amino primarios de las lisinas (figura 9). Debido a la gran cantidad de lisinas presentes en los anticuerpos, hay que asegurarse de que una cantidad suficiente de anticuerpo se haya asociado a la superficie de las esferas en una disposición funcional para llevar a cabo el inmunoensayo.



**Figura 9: Disposición aleatoria de los anticuerpos acoplados a la superficie de la esfera.**

Un método para comprobar la eficacia de la unión del anticuerpo de captura a la esfera, consiste en incubar las esferas con un anticuerpo de detección anti-especie marcado con ficoeritrina (PE). Si la unión es correcta, el anticuerpo de detección se unirá al de captura y la ficoeritrina dará señal (figura 10). En general, un acoplamiento correcto debería producir al menos una intensidad media de fluorescencia (MFI) de 10000.



**Figura 10: Esquema del método empleado para comprobar el correcto acoplamiento del anticuerpo de captura a la esfera.**

Luminex cuenta con varios tipos de microesferas en el mercado. En este trabajo se emplean las microesferas supermagnéticas MagPlex. Esta característica le confiere al ensayo una serie de ventajas derivadas del uso de imanes: se recorta el tiempo de protocolo en los pasos de lavado y se minimiza la pérdida de esferas, consiguiendo así resultados con una elevada reproducibilidad.

Para llevar a cabo la lectura del inmunoensayo se usa el equipo MAGPIX, un lector de placas de 96 pocillos. La tecnología xMAP permite ensayos multiplex gracias a la

identificación de cada población de esferas, ya que cada una lleva en su interior una combinación de fluorocromos característica que las sitúa dentro de una región específica. Un láser a 635nm es el encargado de identificar el perfil de emisión de cada esfera para poder asociarla a una población específica y así poder identificarla. Ya que cada población de esferas ha sido acoplada con un anticuerpo específico, varias poblaciones podrán incubarse simultáneamente con la misma muestra biológica.

En este trabajo, el inmunoensayo se desarrolla en formato sándwich. Por ello, tras la incubación de las esferas acopladas al anticuerpo de captura con la muestra biológica, se añade un anticuerpo de detección marcado con biotina, cuya señal se amplificará con el sistema estreptavidina/ficoeritrina (SAPE). La señal del SAPE será detectada por un láser a 525nm (figura 11).

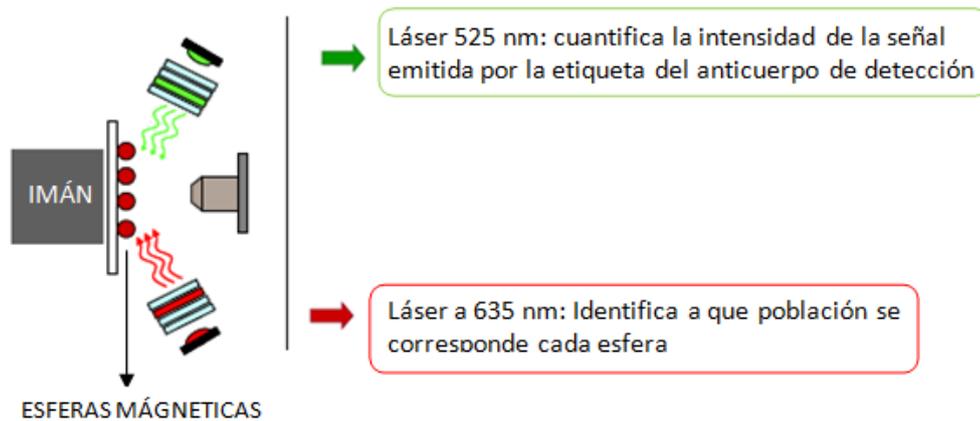


Figura 11: Esquema representativo del sistema de detección de un equipo MAGPIX.

Para obtener resultados fiables, el equipo MAGPIX debe ser calibrado una vez por semana. En lo que respecta a su mantenimiento, cada vez que se inicia el equipo se ejecuta una rutina de lavado con agua, sosa 0.1N y etanol 70% llamada *System initialization*. Antes de apagar el equipo, se ejecuta otra rutina de lavado con agua y lejía al 20% llamada *System shutdown*. Si fuera necesario, existen rutinas de lavado más agresivas para casos de contaminación o acumulación de restos de esferas en el equipo.

En la figura 12, se resume de forma esquemática el flujo de trabajo para realizar un inmunoensayo mediante *arrays* de anticuerpo en formato esfera (MagPlex) tipo sándwich.



Figura 12: Esquema del flujo del trabajo para llevar a cabo un inmunoensayo con la tecnología xMAP de Luminex.

## 4.2. Protocolos

A continuación se detallan los protocolos seguidos en este trabajo. Como consecuencia de trabajar con esferas magnéticas, hay que tener en cuenta que todos los protocolos de lavado han de realizarse sobre soportes especiales imantados para tubos (figura 13) o placas de 96 pocillos (figura 14).



Figura 13: Soporte imantado para lavados de tubos (tipo eppendorf).

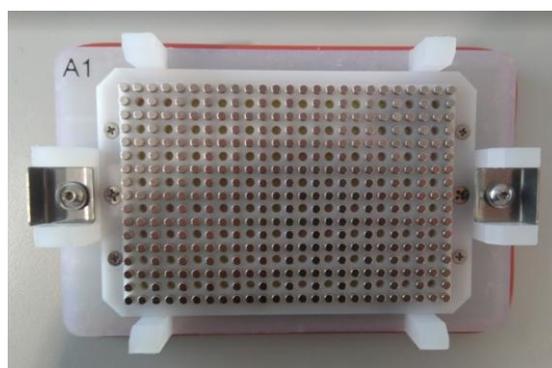


Figura 14: Soporte imantado para lavados de placas de 96 pocillos.

#### 4.2.1 Activación de las microesferas

La activación de las esferas se basa en la actuación del EDC y el sulfo-NHS, ambos fácilmente hidrolizables. Por ello, la rápida adición de la solución activadora a las esferas es un punto crítico en este paso.

- Añadir a un eppendorf  $5 \times 10^5$  esferas (*beads*) de cada región. Colocar el eppendorf en el imán para poder retirar el tampón de almacenaje (PBS, 1% BSA, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4).
- Retirar el eppendorf del imán y lavar las esferas con 80  $\mu\text{l}$  del tampón de activación (0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.2). Retirar el tampón en el imán y añadir de nuevo 50  $\mu\text{l}$  de tampón de activación. Guardar en oscuridad hasta su uso.
- Preparar la solución de activación a una concentración final de 10mg/ml en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Para ello pesar preparar 50 mg de NHS y 50 mg de EDC y enrasar hasta un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  con el tampón de activación.
- Añadir 50  $\mu\text{l}$  de la solución de activación a los 50  $\mu\text{l}$  de tampón de activación donde están preparadas las *beads*. Incubar durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.

#### 4.2.2. Acoplar el anticuerpo de captura a una población de esferas

Una vez activadas las esferas, se añade la cantidad de anticuerpo de captura que se desea acoplar (generalmente 1,6  $\mu\text{g}$ ). Para ello se siguen estos pasos:

- Hacer dos lavados con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de acoplamiento [50mM Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MES), pH 5] asegurándose de eliminarlo todo antes de añadir el anticuerpo.
- Añadir 1,6 $\mu\text{g}$  de anticuerpo de captura diluido en tampón de ensayo (PBS-TWEEN al 0,05%) hasta un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Incubar 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
- Realizar un lavado con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado (PBS-TWEEN al 0,05%).
- Conservar en 50  $\mu\text{l}$  de tampón de bloqueo (PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN-20, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4). Mantener en oscuridad entre -2 °C y 8 °C.

#### 4.2.3. Verificar el acoplamiento

Para comprobar que el anticuerpo de captura se ha acoplado correctamente con las esferas se usa un anticuerpo de detección anti especie marcado con estreptavidina. En general, un acoplamiento correcto debería producir al menos una intensidad media de fluorescencia (MFI) de 10000.

Al ensayo se añade un control negativo en el que se sustituye el anticuerpo de detección por PBS-TWEEN 0,05%.

Todas las condiciones se hacen por triplicado.

- Las esferas acopladas se preparan a una dilución 1:50 en tampón del bloqueo. Sonicar las esferas durante 2 minutos antes de su uso.
- Preparar el anticuerpo de detección a una dilución 1:1000 en PBS-TWEEN 0,05%.
- Añadir a cada pocillo de la placa 5  $\mu$ l de la dilución de esferas ( $10^3$  esferas) y 50  $\mu$ l del anticuerpo de detección. Para la condición de control negativo se sustituyen los 50  $\mu$ l de la dilución de anticuerpo de detección por PBS-TWEEN 0,05%. Incubar durante 20 minutos en agitación y oscuridad.
- Lavar 3 veces con 100  $\mu$ l de tampón de lavado.
- Añadir 100  $\mu$ l de PBS-TWEEN 0,05% y leer en el equipo MAGPIX.

#### 4.2.4. Inmunoensayo en formato sándwich

Para llevar a cabo una cuantificación absoluta se necesita crear una curva estándar de concentraciones conocidas de la proteína recombinante frente a la que poder comparar los resultados obtenidos de la muestra biológica. En este tipo de ensayo se incorpora como control negativo una región de esferas que han sido activadas pero a las que no se les ha acoplado ningún anticuerpo por lo que no pueden dar ninguna señal.

- Preparar una dilución 1:50 con todas las regiones de esferas que se deseen analizar simultáneamente en tampón de bloqueo. Sonicar durante 2 minutos las esferas. Añadir 5  $\mu$ l de esta dilución a cada pocillo ( $10^3$  esferas de cada región).
- Preparar cada punto de la curva estándar en un volumen final de 45  $\mu$ l.

- Añadir 45 µl de suero a la dilución oportuna a cada pocillo.
- Incubar la placa durante 2 horas y 30 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado.
- Añadir el anticuerpo de detección biotinilado a cada pocillo en un volumen final de 45µl. La concentración óptima de anticuerpo de detección debe ser ajustada, generalmente 1µg/mL. Incubar la placa durante 1 hora en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado. Añadir 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE SA1004) a una dilución 1:1000 en PBS-TWEEN 0,05%. Incubar la placa durante 20 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado.
- Añadir 100 µl a cada pocillo de PBS-TWEEN 0,05%. Introducir la placa en el equipo MAGPIX para leer la fluorescencia.

Para la lectura de los datos el equipo usa el software xPONENT. Finalmente, los datos se exportan a Excel y GraphPad para su posterior análisis.

## 5. Resultados y discusión

---

Los estudios de proteómica al azar realizados por la unidad de Proteómica del grupo de Reumatología del INIBIC han conducido a la definición de un panel de 20 proteínas que pueden tener potencial utilidad biomarcadora para el diagnóstico precoz, pronóstico o desarrollo de fármacos para el tratamiento de la artrosis.

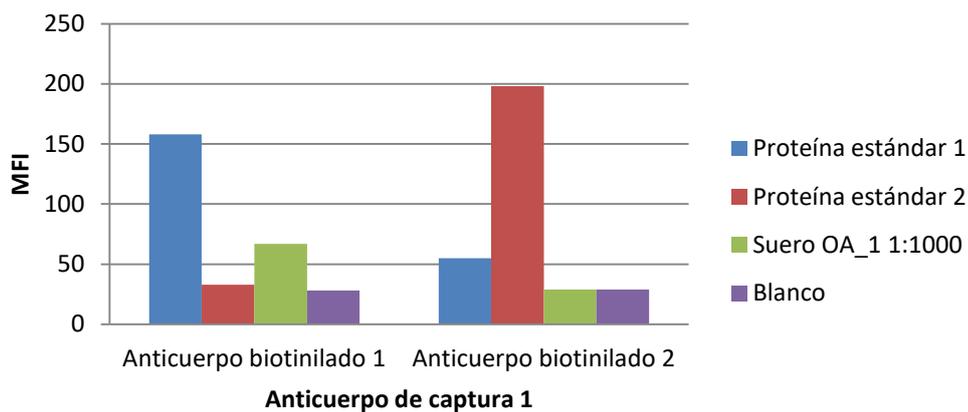
Siguiendo los objetivos marcados al principio (página 3), testamos la posibilidad de incluir 4 de las 20 proteínas candidatas en un ensayo multiplex para poder validarlas en cohortes amplias de pacientes, con el fin de avanzar en el flujo de desarrollo de nuevos biomarcadores y cualificar su uso en clínica. Las 4 proteínas detalladas a continuación son: trombospondina 1 (**THBS1**), proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (**COMP**), proteína de unión a retinol (**RBP4**), y proteína de unión a la vitamina D (**VDBP**). La THBS1 es una proteína de la matriz celular capaz de modular la angiogénesis (Poon et al., 2004). La COMP influye en la organización de las fibrillas de colágeno, contribuyendo así a la estructura del tejido (Calvo et al., 2005). Se encuentra principalmente en las capas de cartílago en desarrollo (Hoch et al., 2011). La RBP4 pertenece a la familia de las lipocalinas y es el portador específico del retinol (alcohol de vitamina A) en la sangre (Liu et al., 2017). La proteína sérica VDBP es una glicoproteína plasmática conocida por su papel en el transporte de metabolitos de la vitamina D (Malik et al., 2013). Desarrolla múltiples funciones importantes como la modulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias, la unión de ácidos grasos y el control del desarrollo óseo (Speeckaert et al., 2014).

Para comenzar, cada proteína será testada de forma individual. En primer lugar, se buscará una pareja de anticuerpos que sea funcional en formato sándwich. A continuación, se optimizará la curva estándar con la proteína recombinante y se probará un rango amplio de diluciones de 2 muestras de suero (OA\_1 y OA\_2) para buscar la que mejor se adapte a la curva. Por último, si las diluciones de suero lo permiten, se llevarán a cabo pruebas de reactividad cruzada entre proteínas para comprobar si podrían unirse en un ensayo multiplex.

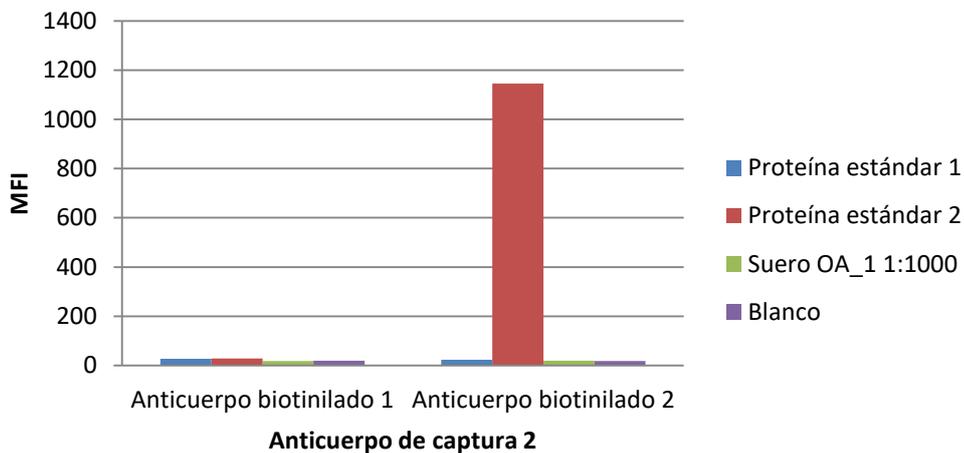
A continuación, se detallarán los pasos seguidos con cada proteína en cada una de las fases de ensayo.

## 5.1 THBS1

En la fase de búsqueda de una pareja de anticuerpos funcionales para esta proteína se probaron dos anticuerpos de captura (ab1823 y sc-65612) y dos anticuerpos de detección (LAA611Hu71 y EHTHBS1). Todas las combinaciones posibles se testaron frente a dos proteínas recombinante diferentes (RPA611Hu01 y EHTHBS1), ambas a  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  y empleando una muestra de suero diluida 1:1000. Como se observa en las gráficas 15 y 16 los resultados fueron negativos debido a la baja señal de fluorescencia (MFI) obtenida.



**Figura 15:** Combinación del anticuerpo de captura 1 con los dos anticuerpos biotinilados frente a dos proteínas recombinantes y un suero.



**Figura 16:** Combinación del anticuerpo de captura 2 con los dos anticuerpos biotinilados frente a dos proteínas recombinantes y un suero.

A la vista de estos resultados se probó un kit comercial Duo Set ELISA (DY3074). Como se observa en la figura 17 se obtuvieron señales mayores de 10000 MFI para los puntos más altos de la curva.

Inicialmente para la curva estándar de la THBS1 se probaron 8 concentraciones que partían de 160 ng/mL hasta 1,25 ng/mL haciendo diluciones seriadas (1:2). Como se observa en la figura 18 a partir de 40 ng/mL la curva se satura y las medidas de MFI pierden reproducibilidad.

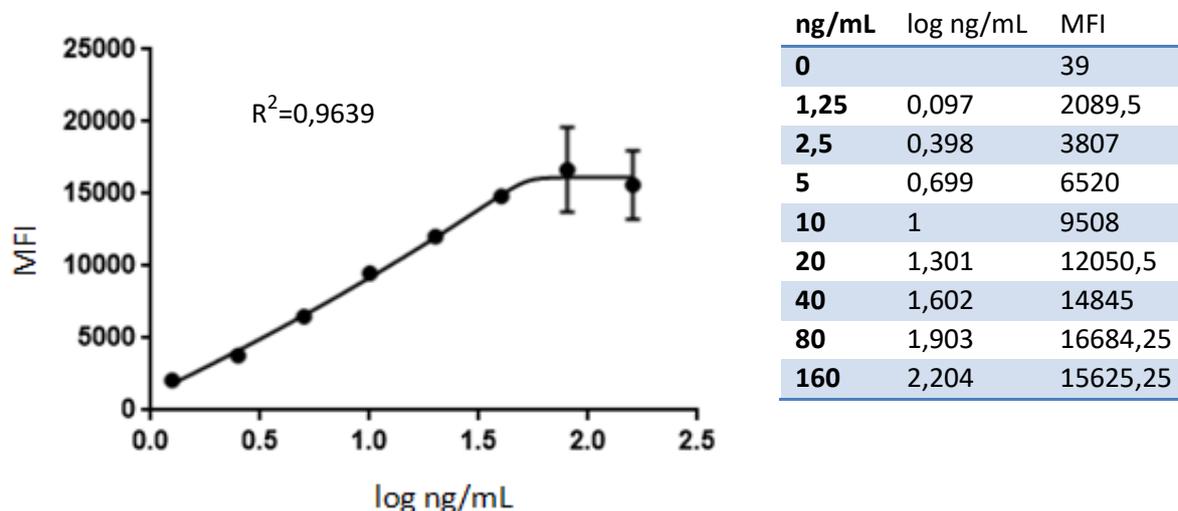


Figura 17: Curva estándar para THBS1 desde 160ng/mL hasta 1,25 ng/mL.

En base a los resultados anteriores, se acota la curva estándar partiendo de 40 ng/mL haciendo diluciones 1:2 hasta 0,31 ng/mL y se observa como la curva mejora pasando de un  $R^2=0,9639$  a un  $R^2=0,9981$  (figura 18).

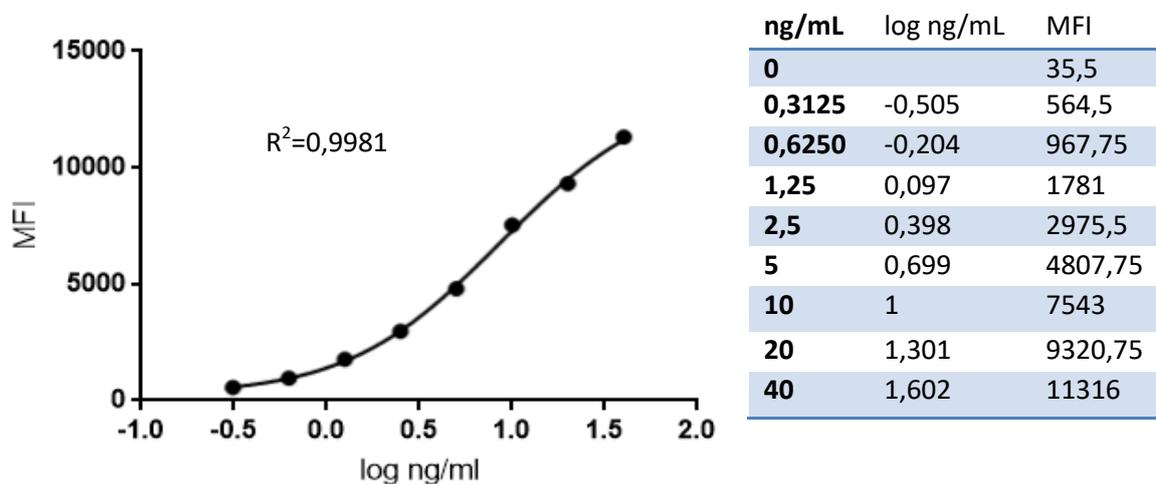
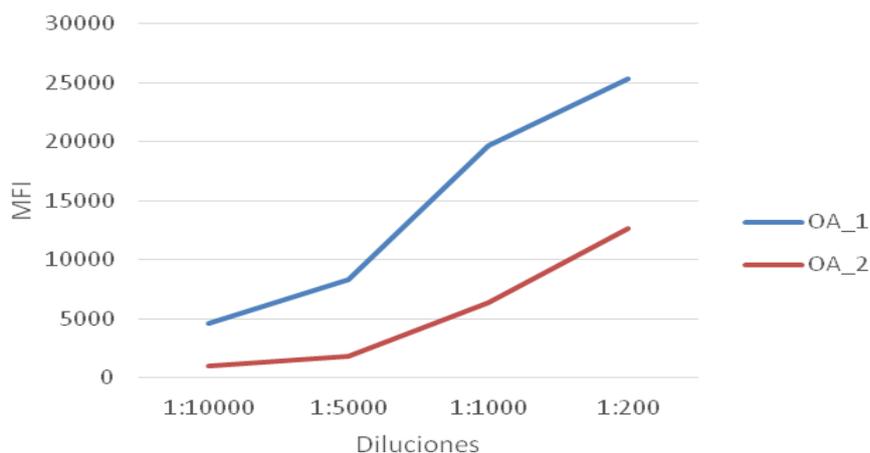


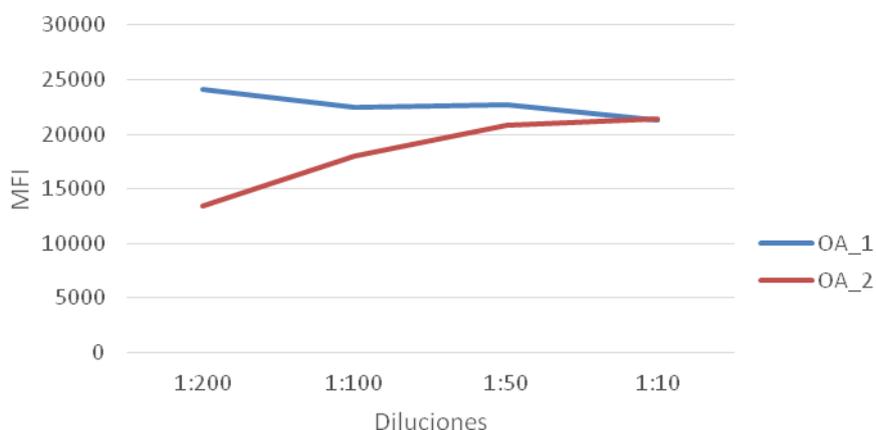
Figura 18: Curva estándar para THBS1 desde 40ng/mL hasta 0,31 ng/mL.

Una vez optimizada la curva estándar se prueba un rango amplio de diluciones de suero partiendo de 1:200 hasta 1:10000. Como se observa en la figura 19, a una dilución 1:200 la señal MFI sigue aumentando por lo que se prueban diluciones de suero más concentradas.



**Figura 19: Inmunoensayo frente a THBS1 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:200 hasta 1:10000.**

Se probaron diluciones desde 1:10 hasta 1:200 y como se observa en la figura 20 en función de la concentración de THBS1 en diferentes sueros, a una dilución 1:200 la señal ya está saturada para OA\_1 o aún está creciendo para OA\_2.



**Figura 20: Inmunoensayo frente a THBS1 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:10 hasta 1:200.**

Finalmente, debido a la variabilidad observada entre las 2 muestras se prueban diluciones entre 1:250 y 1:1000 (figura 21) y se concluye que para la THBS1 una dilución del suero entre 1:500 y 1:1000 sería la más adecuada debido a que la señal entre estos puntos aún está creciendo y cae dentro de la curva estándar.

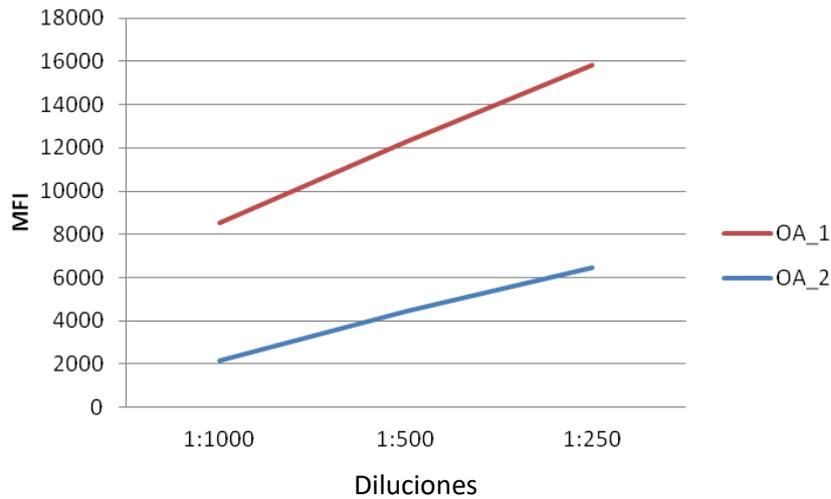


Figura 21: Inmunoensayo frente a THBS1 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:250 hasta 1:1000.

## 5.2. COMP

Debido a los buenos resultados obtenidos con el Duo Set ELISA para la proteína THBS1, para la COMP se testa directamente la pareja comercial (DY3134).

Inicialmente la curva estándar de la COMP se probó con 8 puntos que partían de 40 ng/mL en dilución 1:2 hasta 0,31 ng/mL. Como se observa en la figura 22 a partir de 20 ng/mL la curva se satura y las medidas de MFI pierden la reproducibilidad.

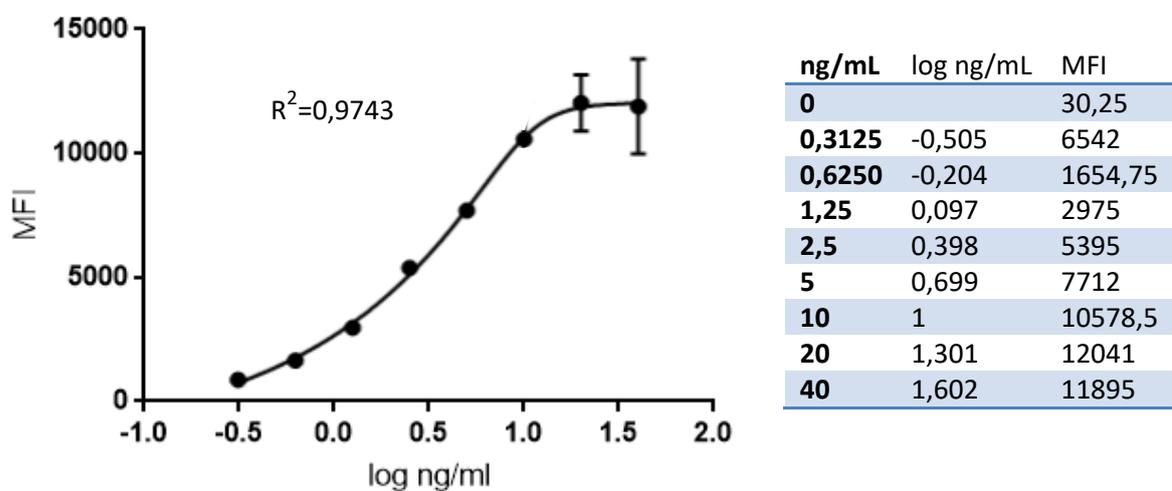


Figura 22: Curva estándar para COMP desde 40 ng/mL hasta 0,31 ng/mL.

En base a estos resultados, se acota la curva estándar partiendo de 20 ng/mL y haciendo diluciones 1:2 hasta 8 puntos y se observa como la  $R^2$  de la curva mejora pasando de un  $R^2=0,9743$  a un  $R^2=0,9994$  (figura 23).

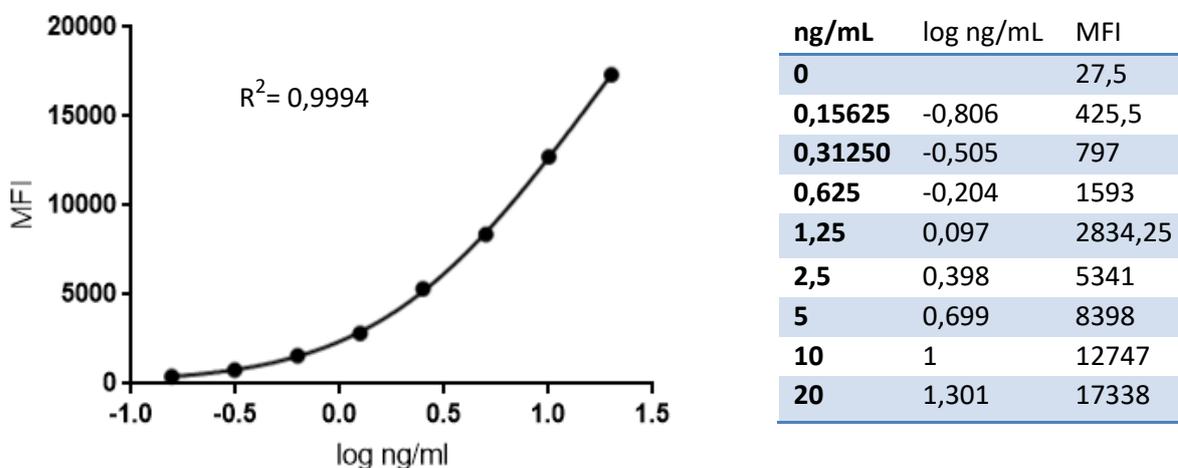


Figura 23: Curva estándar para COMP desde 20ng/mL hasta 0,15 ng/mL.

Una vez optimizada la curva se prueba un rango amplio de diluciones de suero partiendo de 1:5 hasta 1:1000. Como se observa en la figura 24 una dilución de suero entre 1:50 y 1:250 sería la más adecuada debido a que la señal entre estos puntos crece y cae dentro de la curva estándar.

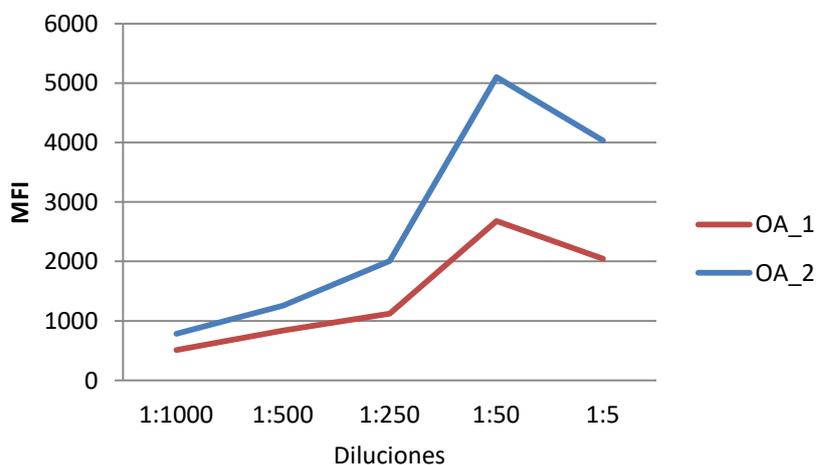


Figura 24: Inmunoensayo frente a COMP sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:5 hasta 1:1000.

### 5.3. RBP4

En estudios previos a este trabajo llevados a cabo por la unidad de Proteómica del INIBIC ya se había testado una pareja de anticuerpos funcionales en ensayos Luminex

(anticuerpo de captura MAA929Hu22, anticuerpo biotinilado LAA929Hu71 y proteína recombinante RPA929Hu01), por lo que se procedió directamente a la optimización de la curva estándar. En este caso la curva empieza en 100ng/mL y desciende con diluciones 1:2 hasta 8 puntos, obteniéndose una  $R^2=1$  (figura 25).

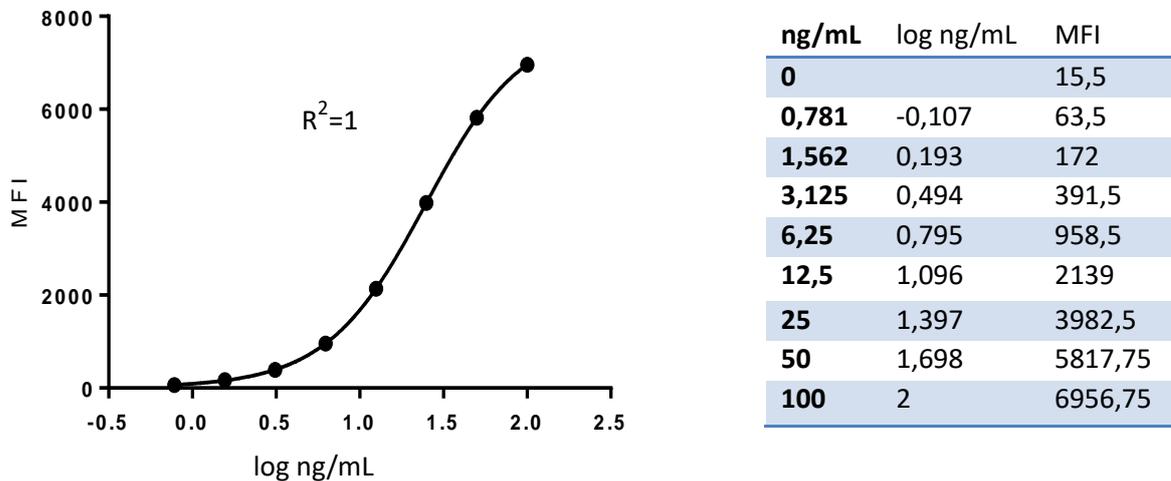


Figura 25: Curva estándar para RBP4 desde 100ng/mL hasta 0,78 ng/mL.

Una vez optimizada la curva se prueba un rango amplio de diluciones de suero. Como podemos observar en la figura 26, la región de exceso de anticuerpo (región óptima para un ensayo tipo ELISA) en la que la señal crece de forma exponencial está entre la dilución 1:1000 y 1:10000 para ambos sueros.

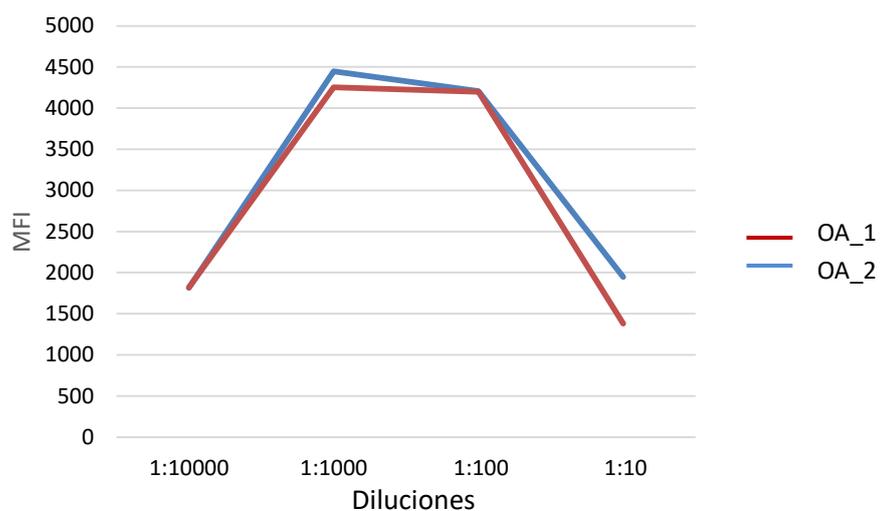


Figura 26: Inmunoensayo frente a RBP4 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:10 hasta 1:10000.

A continuación, se prueban diluciones entre 1:1000 y 1:10000 para comprobar cual se adapta mejor a la curva estándar. Como se observa en la figura 27 la dilución 1:5000 sería la mejor ya que la señal está creciendo en este punto.

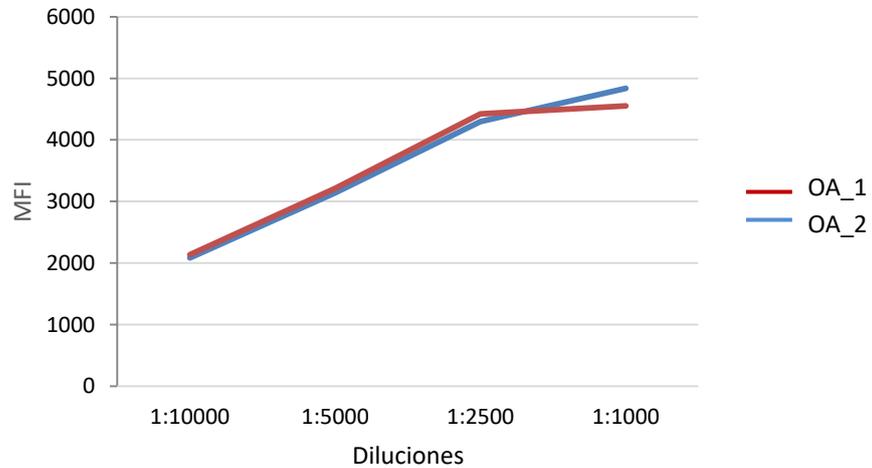


Figura 27: Inmunoensayo frente a RBP4 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:1000 hasta 1:10000.

#### 5.4. VDBP

Al igual que para la RBP4, en el caso de la VDBP al inicio de este trabajo ya se contaba con una pareja de anticuerpos funcionales (anticuerpo de captura NBP2-235337, anticuerpo biotinilado LAB810Hu71 y proteína recombinante RPB810Hu03). Por ello se pasa directamente a la optimización de la curva estándar. En este caso la curva empieza en 250ng/mL y desciende con diluciones 1:2 hasta 8 puntos. Como se observa en la figura 28, se consigue una buena curva con un  $R^2=0,998$ , aunque la señal de fluorescencia es muy baja (MFI= 866 para el punto más alto de la curva).

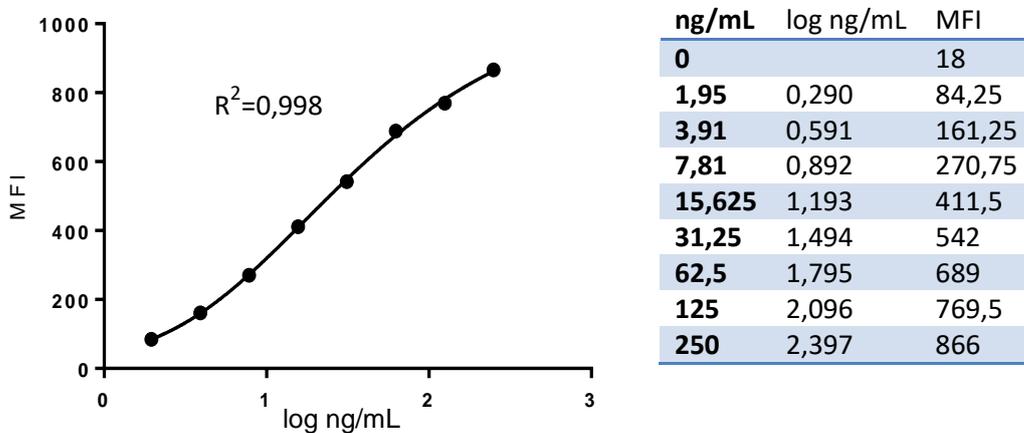


Figura 28: Curva estándar para VDBP desde 250ng/mL hasta 1,95 ng/mL.

Una vez optimizada la curva, se prueba un rango amplio de diluciones seriadas de suero. Como podemos observar en la figura 29, la región de exceso de anticuerpo en la que la señal crece está entre la dilución 1:1000 y 1:10000.

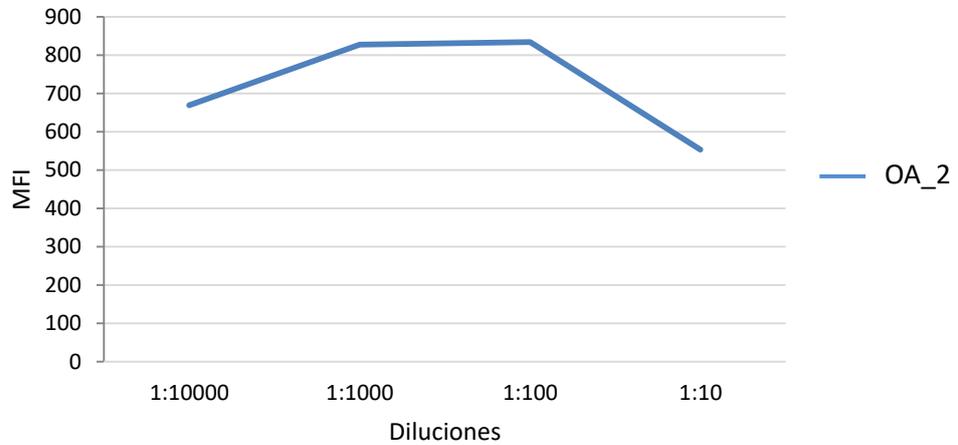


Figura 29: Inmunoensayo frente a RBP4 sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:10 hasta 1:10000.

A continuación, se prueban diluciones entre 1:1000 y 1:20000 para comprobar cuál se adapta mejor a la curva estándar. Como se observa en la figura 30, la dilución 1:10000 sería la mejor.

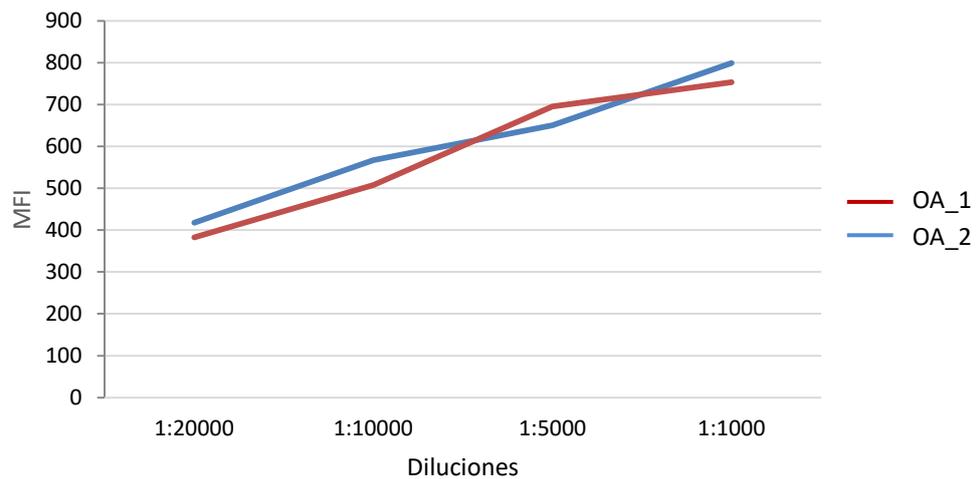


Figura 30: Inmunoensayo frente a VDBP sérica con diferentes diluciones de suero desde 1:1000 hasta 1:20000.

## 5.5 Optimización de la concentración de anticuerpo de detección

Hasta el momento todos los ensayos se llevaron a cabo con 1 µg/mL de anticuerpo biotinilado. Para mejorar la señal MFI de VDBP y RET4 se prueban diferentes cantidades de anticuerpo biotinilado y se comprueba si aumenta la señal en el punto más alto de la curva estándar. Como se observa en la figura 31 la señal con 4 µg/mL aumenta un 106% y un 174% respecto a 1 µg/mL para la RBP4 y VDBP respectivamente. Por lo tanto, en el ensayo multiplex se emplearán 4 µg/mL de los anticuerpos de detección.

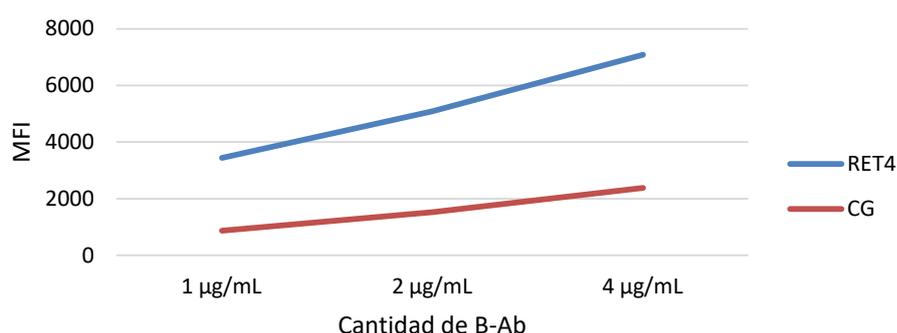


Figura 31: Inmunoensayo frente a 100ng/mL de RBP4 y 250 ng/mL de VDBP con diferentes cantidades de anticuerpo de detección.

## 5.6. Reactividad cruzada entre RBP4 y VDBP

La primera limitación que nos encontramos a la hora de combinar distintos analitos en un ensayo multiplex es que los anticuerpos a testar estén acoplados a distintas regiones de esferas magnéticas. Otra limitación es la diferencia de concentración de los analitos en muestras de suero. Por ello es necesario que la dilución de suero para cada proteína que se pretenda incluir en el panel coincida. En nuestro caso la RBP4 y la VDBP pueden unirse en un ensayo multiplex porque sus anticuerpos están acoplados a distintas regiones de esferas (región 13 para RBP4 y región 19 para VDBP) y podemos emplear la misma dilución de suero para ambas proteínas (1:10000).

El siguiente paso para el desarrollo de un ensayo multiplex es comprobar si existe reactividad cruzada entre los anticuerpos, tanto de captura como de detección (Urbanowska et al., 2006). Para ello se realiza un ensayo basado en tres pruebas que se resume en la figura 32.

En el primer test se determina la especificidad de la unión del anticuerpo de captura con su analito. Para ello se realizan dos inmunoensayos. En cada uno de ellos el sándwich se llevará a cabo con la pareja de proteína recombinante y anticuerpo biotinilado específicos, pero en ambos se incluyen las regiones de esferas acopladas a los 2 anticuerpos juntos (RBP4 y VDBP).

En el segundo test se determina la especificidad de la unión entre el anticuerpo biotinilado y su analito. Para ello se realizan dos inmunoensayos. En este caso, cada uno de ellos llevará la proteína recombinante por separado, pero el anticuerpo de captura y el de detección se juntan.

Por último, se realiza un ensayo multiplex entre la VDBP y la RBP4.

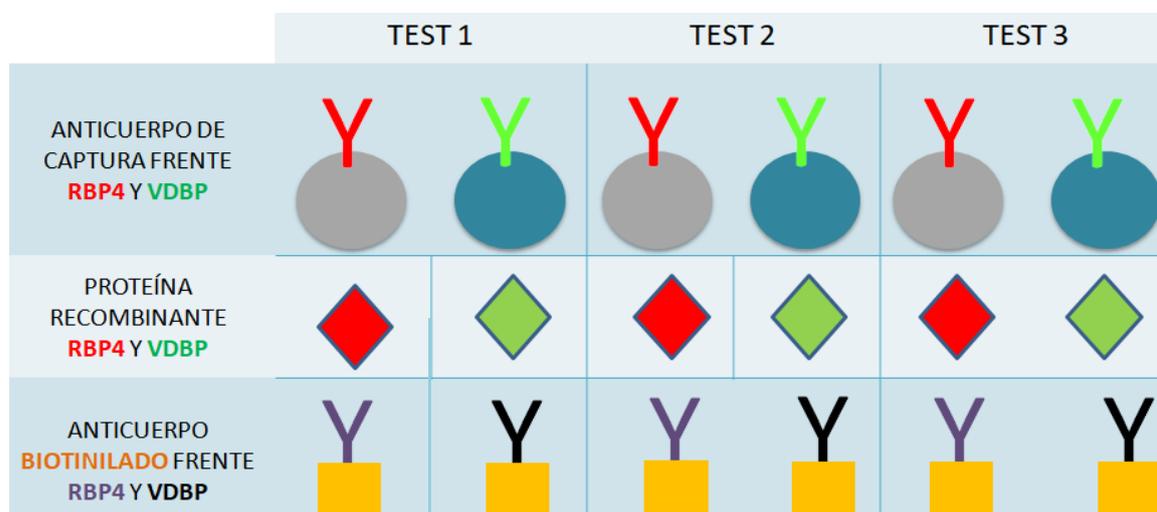


Figura 32: Pruebas para determinar la reactividad cruzada.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 3.

	$\alpha$ RBP4	$\alpha$ VDBP	Reactividad cruzada
<b>Test 1 RBP4</b>	13238,5	888,75	6,71%
<b>Test 1 VDBP</b>	41,75	2874,5	1,45%
<b>Test 2 RBP4</b>	12546	952,75	7,59%
<b>Test 2 VDBP</b>	50,5	2446	2,06%
<b>Test 3 VDBP+RBP4</b>	13159	2712,5	
<b>BLANCO</b>	57	57,6	

Tabla 3: Valores de MFI y porcentajes de reactividad cruzada entre las proteínas estándar (RBP4 y VDBP) y los anticuerpos ( $\alpha$ RBP4 y  $\alpha$ VDBP).

En el test 1 se comprueba que porcentaje de reactividad cruzada deriva de la unión inespecífica del anticuerpo de captura. Como se observa en la tabla 3, el anticuerpo de la VDBP se une inespecíficamente a la proteína recombinante de la RBP4 (MFI=888,75) de forma significativa dando una reactividad cruzada mayor del 5% (6,71%). Por otro lado, el anticuerpo de la RBP4 no se une de forma significativa a la proteína recombinante de la VDBP siendo la señal menor del 5% (1,45%).

En el test 2 se comprueba que porcentaje de reactividad cruzada deriva de la unión inespecífica del anticuerpo de detección. Para la proteína RBP4, se observa como la reactividad cruzada sube de un 6,71% a un 7,59%, lo cual indica que la mayoría de la señal inespecífica deriva del anticuerpo de captura de la VDBP (MFI=888,75) aunque el de detección también es algo inespecífico (MFI=952,75). Para la proteína VDBP, la señal sigue manteniéndose por debajo del 5% (2,06%) por lo cual se deduce que no hay reactividad cruzada ni con el anticuerpo de captura ni con el anticuerpo de detección de RBP4.

A pesar de la pequeña reactividad cruzada que detectamos en los test 1 y 2, quisimos probar igualmente el ensayo multiplex con estas 2 proteínas. En el test 3, se observa como la señal de la proteína VDBP (MFI=2712,5) se mantiene constante respecto a los test 1 (MFI=2874,5) y 2 (MFI=2466). Lo mismo ocurre para la señal de la proteína RBP4 (MFI=13159) en el test 3 con respecto a los test 1 (MFI=13238,5) y 2 (MFI=12546).

## 6. Conclusiones

---

En este trabajo se han desarrollado 4 *arrays* en suspensión tipo sándwich para la cuantificación absoluta de THBS1, COMP, VDBP y RBP4 en muestras humanas de suero. Para las 4 proteínas en estudio se han desarrollado ensayos uniplex. Finalmente, VDBP y RBP4 se han podido probar en un ensayo multiplex, que permite la cuantificación absoluta de ambas proteínas en la misma muestra de suero (diluida 1:10000).

Será necesario un estudio de validación en cohortes más grandes de muestras artrósicas y controles sanos para validar la utilidad de estos *arrays* en la práctica clínica y cualificar su uso para el diagnóstico precoz, monitorización o evaluación de terapias en OA.

## 7. Bibliografía

---

Angeloni, S., Cordes, R., Dunbar, S., Garcia, C., Gibson, G., Martin, C., Stone, V. (2014). xMAP® Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 2ª ed. Luminex Corporation.

Blackburn, JM., Shoko, A. (2011). Protein function microarrays for customized systems-oriented proteome analysis. Korf, U. (Ed.). En: Protein microarrays: methods and protocols, methods in molecular biology, pp. 305-306.

Calvo, KR., Liotta, LA., Petricoin, EF. (2005). Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. Bioscience reports. 25: 107-125.

Casal, JI. (2014). Microarrays de proteínas. Corrales, F. y Calvete, JJ. (Eds.). En: Manual de proteómica, pp. 687-700.

Casal, JI., Vivanco, F. (2014). Proteómica clínica. Biomarcadores y dianas terapéuticas. Corrales, F. Calvete, JJ. (Eds.). En: Manual de proteómica, pp. 583-601.

De Ceuninck, F., Dassencourt, L., Anract, P. (2004). The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. Biochem Biophys Res Commun. 323: 960-369.

Dray, A., Read, SJ. (2007). Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. Arthritis research & therapy. 9: 212.

Fernández-Puente, P., Mateos, J., Fernández, C., Oreiro, N., Fernández, C., Ruiz-Romero, C., Blanco, FJ. (2011). Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. J Proteome Res. 10: 5095-5101.

Fernández-Puente, P., Calamia, V., González, L., Lourido, L., Camacho, M., Oreiro, N., Ruiz-Romero, C., Blanco, FJ. (2017). Multiplexed mass spectrometry monitoring of biomarker candidates for osteoarthritis. J Proteomics. 152: 216-225.

García, Á., Ruiz-Romero, C. (2010). Sesión de proteómica de biomarcadores y patologías humanas. Proteómica. 6: 26-30.

Henjes, F., Lourido, L., Ruiz-Romero, C., Fernández, J., Schwenk, JM., Gonzalez, M., Blanco, FJ., Nilsson, P., Fuentes, M. (2014). Analysis of autoantibody profiles in osteoarthritis using comprehensive protein array concepts. J Proteome Res. 13: 5218-29.

Hoch, JM., Mattacola, CG., Medina, JM., Howard, JS., Latterman, C. (2011). Serum cartilage oligomeric matrix protein (sCOMP) is elevated in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. Osteoar Cart. 19: 1396- 1404.

Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S., Zhu, H. (2011). Functional Protein Microarray Technology. Systems biology and medicine. 3: 255-268.

Kraus, VB., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garner, P., Hardin, J., Henrotin, Y., Heinegård, D., Ko, A., Lohmander, LS., Matthews, G., Menetski, J., Moskowitz, R., Persiani, S., Poole, AR., Rousseau, JC., Todman, M. (2011). Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 19: 515-542.

Kraus, VB., Blanco, FJ., Englund, M., Henrotin, Y., Lohmander, LS., Losina, E., Önnarfjord, P., Persiani, S. (2015). OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis. Osteoarthritis and cartilage. 23: 686-697.

- Liu, L., Suzuki, T., Shen, J., Wakana, S., Araki, K., Yamamura, K., Lei, L., Li, Z. (2017). Rescue of retinal morphology and function in a humanized mouse at the mouse retinol-binding protein locus. *Lab Invest.* 97: 395-408.
- Lourido, L., Diez, P., Dasilva, N., Gonzalez, M., Ruiz-Romero, C., Blanco, F., Orfao, A., LaBaer, J., Fuentes, M. (2014). Protein Microarrays: Overview, Applications and Challenges. Marko-Varga, J. (Ed.). En: *Genomics and Proteomics for Clinical Discovery and Development*. Springer, pp. 5-24.
- Lourido, L. (2015). Búsqueda de biomarcadores de artrosis mediante técnicas proteómicas. Tesis doctoral.
- Lourido, L., Ayoglu, B., Fernández, J., Oreiro, N., Henjes, F., Hellström, C., Schwenk, JM., Ruiz-Romero, C., Nilsson, P., Blanco, FJ. (2017). Discovery of circulating proteins associated to knee radiographic osteoarthritis. *Sci Rep.*7: 137.
- Malik, S., Fu, L., Juras, DJ., Karmali, M., Wong, BYL., Gozdzik, A., (2013). Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 50: 1–22.
- Matson, E., Baliog, C., Reginato, AM. (2010). Papel de los biomarcadores en la artrosis. Alcocer, A. (Ed.). En: *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Médica Panamericana, pp. 327-353.
- Moragues, C., Valls, R. (2010). Técnicas complementarias en el diagnóstico de la artrosis. Alcocer, A. (Ed.). En: *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Médica Panamericana, pp. 305-326.
- Mustafa, SA., Hoheisel, JD., Alhamdani, MSS. (2011). Secretome profiling with antibody microarrays. *Molecular BioSystems.* 7: 1795-1801.
- Pando, RV., Lanz-Mendoza, H. (2009). The significance of proteomics in public health. *Salud pública México.* 51: 386-394.
- Poley, A., Ortega, JA., Pedregal, M., Martín, M., Hermosilla, C., Mora, F. (2011). Prevalencia de enfermedades osteoarticulares y consumo de recursos. Calidad de vida y dependencia en pacientes con artrosis. *SEMERGEN-Medicina de Familia.* 37: 462-467.
- Poon, RT., Chung, KK., Cheung, ST., Lau, CP., Tong, SW., Leung, KL. (2004). Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 10: 4150-4157.
- Reslova, N., Míchna, V., Kasny, M., Mikel, P., Kralik, P. (2017). xMAP technology: applications in detection of pathogens. *Frontiers in microbiology.* 8: 55.
- Ruiz-Romero, C., Blanco, FJ. (2010). Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage.* 18: 500-509.
- Ruiz-Romero, C., Fernández-Puente, P., Calamia, V., Blanco, FJ. (2015). Lessons from the proteomic study of osteoarthritis. *Expert Rev Proteomics.* 12: 1-11.
- Speeckaert, MM., Speeckaert, R., Van Geel, N., Delanghe, JR. (2014). Vitamin D binding protein: a multifunctional protein of clinical importance. *Adv Clin Chem.* 63: 1-57.
- Urbanowska, T., Mangialaio, S., Zickler, C., Cheevapruk, S., Hasler, P., Regenass, S., Legay, F. (2006). Protein microarray platform for the multiplex analysis of biomarkers in human sera. *Journal of immunological methods.* 316: 1-7.